

FABIANO FLORIANI GARCIA

**BIODEGRADAÇÃO DE 2,4 – DICLOROFENOL E 2,4,6 – TRICLOROFENOL POR
FUNGOS DO GÊNERO *Pleurotus***

JOINVILLE – SC

2009

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**BIODEGRADAÇÃO DE 2,4 – DICLOROFENOL E 2,4,6 – TRICLOROFENOL POR
FUNGOS DO GÊNERO *Pleurotus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida Furlan.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Lima dos Santos Schneider

JOINVILLE – SC

2009

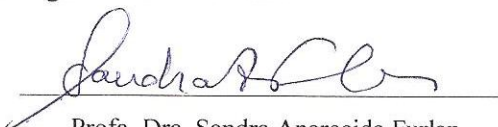
Termo de Aprovação

“Biodegradação de 2,4-diclorofenol e 2,4,6-triclorofenol por fungos do gênero *Pleurotus*”

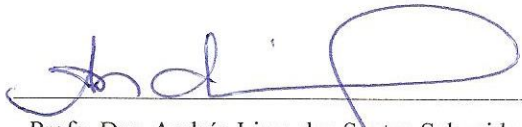
por

Fabiano Floriani Garcia

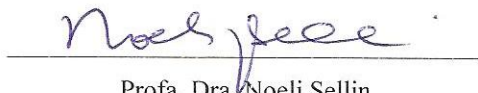
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.



Prof. Dra. Sandra Aparecida Furlan
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Co-Orientadora (UNIVILLE)

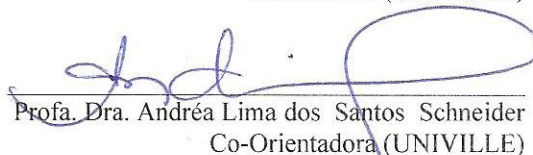


Prof. Dra. Noeli Sellin
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

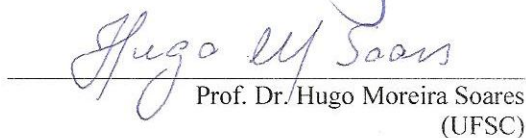
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Sandra Aparecida Furlan
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Co-Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
(UFSC)



Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck
(UNIVILLE)

Joinville, 28 de agosto de 2009.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Francisco e Áurea, e a minha
irmã Suzana que são à base da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Francisco, e a minha mãe, Áurea, pelo suporte dado em todos os momentos de minha vida;

A minha irmã, Suzana e ao meu cunhado Cristiano, pelo apoio e ajuda para a conquista deste sonho;

A toda minha família pelo incentivo, apoio e as orações, que deram forças para continuar na caminhada;

À minha orientadora, Professora Dra. Sandra Aparecida Furlan, minha eterna gratidão por me aceitar e ter pacientemente me orientado na execução e discussão deste trabalho;

À minha co-orientadora, Professora Dra. Andréia Lima dos Santos Schneider, pelo carinho, apoio e por todas as suas orientações ao longo deste trabalho;

À minha amiga, a Engenheira Ambiental Camila Carminatti Cherubini, por todo o apoio, ajuda e pelas várias horas de trabalho no laboratório, necessárias para a conclusão deste trabalho;

As Professoras Elisabeth Wisbeck e Regina Maria Miranda Gern, pela disponibilidade em esclarecer dúvidas;

Aos companheiros (as) de laboratório, por estarem sempre dispostos a ajudar;

Aos colegas da primeira turma do programa de mestrado em engenharia de processos pelos momentos de companheirismo no decorrer desta jornada;

A amiga Débora Jareta Magna por todo o incentivo e ajuda durante este percurso;

Aos amigos do movimento de Emaús pela compreensão, apoio e as orações;

A UNIVILLE, juntamente com todos os profissionais desta instituição, por viabilizarem o desenvolvimento deste trabalho;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos;

Agradeço infinitamente a Deus, este ser maior que comanda nossas vidas, e que permitiu desenvolver este trabalho.

“... O temor do Senhor, aí está a sabedoria;
Apartar-se do mal, eis a inteligência” (Jó, 28₂₈)

RESUMO

Por muito tempo os compostos organoclorados têm sido considerados como grandes responsáveis por problemas de contaminação ambiental, pois são, em geral, altamente tóxicos e de difícil degradação natural. A indústria de papel e celulose é uma das que mais contribuem ao processo de contaminação do meio ambiente por compostos organoclorados, sendo estes provenientes das etapas de branqueamento da polpa. Fungos da classe dos basidiomicetos como *Pleurotus* sp. têm-se mostrado capazes de degradar diversos compostos tóxicos e recalcitrantes. Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo estudar o crescimento e a capacidade das espécies *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* em degradar 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) e 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP), importantes poluentes encontrados nos resíduos da indústria de papel e celulose. Em ensaios preliminares conduzidos com ambos os microrganismos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio, o fungo *P. ostreatus* apresentou melhor desempenho em degradar estes organoclorados. Este microrganismo foi utilizado para a condução do processo em escala ampliada, em biorreator de 5L com 4L de volume de trabalho. Os organoclorados foram adicionados ao meio de cultivo, na forma de pulso no 6º dia, nas concentrações de 30 mg/L (15mg/L de 2,4-DCP e 15 mg/L de 2,4,6-TCP) e 225 mg/L (112,5 mg/L de 2,4-DCP e 112,5 mg/L de 2,4,6-TCP), conforme o experimento. Foram testados dois valores para o coeficiente volumétrico inicial de transferência de oxigênio ($K_L a$ inicial), da ordem de 15 h⁻¹ e 80 h⁻¹. Os resultados mostraram que valores elevados de $K_L a$ inicial comprometem o crescimento micelial, provavelmente em decorrência do cisalhamento do micélio. Utilizando um $K_L a$ inicial de 13,4 h⁻¹ e uma concentração inicial de 225 mg/L dos organoclorados, *P. ostreatus* foi capaz de degradar praticamente 100% do 2,4-DCP e 2,4,6-TCP em 3 dias de cultivo após o pulso. A atividade de lacase máxima obtida (157,2 U/mL) a partir dos pontos amostrados ocorreu no 3º dia de cultivo e caiu a valores muito próximos de zero imediatamente após o pulso dos organoclorados (6º dia). Testes realizados na presença e na ausência de luz revelaram que na presença de luz a degradação do 2,4-DCP e do 2,4,6-TCP foi 45,7% e 17,9% superior, respectivamente, àquela observada na ausência de luz. Os resultados confirmam a capacidade de *Pleurotus ostreatus* em degradar os compostos fenólicos testados, porém a associação da oxidação fotoquímica com a ação do fungo torna o processo mais eficiente. Os testes de toxicidade mostraram que os meios provenientes do cultivo de *Pleurotus ostreatus* tendo como substrato glicose e na presença dos organoclorados 2,4-DCP e 2,4,6-TCP, apresentaram efeito tóxico na concentração de 3,225%.

ABSTRACT

For a long time the, organochlorine compounds have been considered as great responsible for major problems of environmental contamination, because they are generally toxic and difficult to be naturally degraded. The cellulose and paper industry is one of the major contributors to the process of environmental contamination by organochlorine compounds, which are derived from the steps of pulp bleaching. Fungi of the class of basidiomycetes as *Pleurotus* sp. have been shown capable of degrading several toxic and recalcitrant compounds. Based on this, this work aimed to evaluate the ability of *P. ostreatus* and *P. sajor-caju* to grow and degrade 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), major pollutants which have been found in waste from cellulose and paper industry. In preliminary tests carried out with both species in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of culture medium, *P.ostreatus* showed better performance in degrading these organic compounds. This organism was used to perform the process in a large scale in the 5L bioreactor with working volume of 4L. The organochlorines were added to the culture medium as a pulse on the 6th day, at concentrations of 30 mg/L (15 mg/L of 2,4-DCP and 15 mg/L for 2,4,6 – TCP) and 225 mg/L (112.5 mg/L 2,4-DCP and 112.5 mg/L for 2,4,6 – TCP) according to the experiment. Two initial values of the volumetric coefficient of oxygen transfer (initial $K_La \sim 15 \text{ h}^{-1}$ and $\sim 80 \text{ h}^{-1}$) were tested. Results showed that high values of initial K_La difficult cell growth due to shear of mycelium. Using an initial K_La equal to 13.4 h^{-1} and an initial organochlorine concentration of 225 mg/L, *P. ostreatus* was able to degrade practically 100% of 2,4 – DCP and 2,4,6 – TCP in 3 days of cultivation after the pulse. The most laccase activity acquired (157.2U/mL) from the points sampled happened on the 3rd Day of cultivation and dropped its values close to zero right after the input organochlorine (6th Day). The tests carried out in the presence and absence of light showed that in the presence of light the degradation of 2,4 DCP and 2,4,6- TCP was 45.7% and 17.9% over to that observed in the presence of light. The results confirm the ability of *P. ostreatus* to degrade the fenolic compounds tested, however, the association of photochemistry oxidation with the fungs reaction make the process more effective. The toxicity tests show the the medium from *P. ostreatus* plantation having as glucose sustract and in the presence of organochlorine 2,4- DCP and 2,4-TCP, showed toxic effect in the concentration of 3.225%.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xii
INTRODUÇÃO.....	2
2 – REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 – A indústria de papel e celulose.....	4
2.1.1 – Composição e estrutura da madeira.....	5
2.1.2 – Processo de produção	8
2.1.3 – Resíduos gerados.....	10
2.2 – Clorofenóis: 2,4 diclorofenol (2,4-DCP) e 2,4,6 triclorofenol (2,4,6-TCP).....	12
2.2.1 – Limites individuais de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP para determinação dos padrões de qualidade das águas.....	13
2.2.2 – Teores de clorofenóis no efluente da indústria de papel e celulose	14
2.3 – Processos de tratamento de efluentes	15
2.3.1 – Processos físicos.....	15
2.3.2 – Processos químicos.....	16
2.3.3 – Processos biológicos.....	17
2.4 – Biodegradação de compostos fenólicos	19
2.4.1 – Bactérias na degradação de compostos fenólicos	20
2.4.2 – Fungos na degradação de compostos fenólicos	22
2.4.3 – Consórcios microbianos na degradação de compostos fenólicos	25
2.4.4 – Processos combinados na degradação de compostos fenólicos	26
2.5 – Enzimas ligninolíticas de fungos	28
2.5.1 – Peroxidases	28
2.5.2 – Fenol oxidases.....	30
2.6 – O Gênero <i>Pleurotus</i> e suas aplicações.....	32
2.6.1 – Fungos do gênero <i>Pleurotus</i> na degradação de compostos fenólicos	33
3 – METODOLOGIA	36
3.1 – Microrganismos e manutenção	36

3.2 – Ensaios realizados em frascos agitados	36
3.2.1 – Meio e condições de cultivo	37
3.3 – Ensaios realizados em biorreator.....	39
3.3.1 – Preparo do inóculo.....	39
3.3.2 – Meio e condições de cultivo	39
3.4 – Métodos analíticos	41
3.4.1 – Concentração de biomassa micelial	41
3.4.2 – Concentração de Glicose	42
3.4.3 – Concentração de Organoclorados.....	42
3.4.4 – Atividade de lacase.....	43
3.4.5 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La})	43
3.5 – Avaliação da toxicidade do meio tratado (testes ecotoxicológicos).....	45
3.5.1 – Cultivo e manutenção do organismos teste (<i>Daphnia similis</i>).....	45
3.5.2 – Teste de Toxicidade.....	46
3.6 – Métodos de cálculo	47
3.6.1 – Fator de conversão global de substrato em biomassa (g/g)	47
3.6.2 – Velocidade de crescimento micelial (g/L.dia)	48
3.6.3 – Velocidade de biodegradação (mg/L.dia).....	48
4 – RESULTADOS DISCUSSÃO	50
4.1 – Escolha do microrganismo	50
4.1.1 – Estudo da biodegradação de 2,4 diclorofenol por <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus sajor-caju</i>	50
4.1.2 – Estudo da biodegradação de 2,4,6 triclorofenol por <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus sajor-caju</i>	52
4.2 – Biodegradação em escala ampliada	56
4.2.1 – Estudo da influência da transferência de oxigênio	56
4.2.2 – Ensaios realizados em biorreator com concentração de 225 mg/L de organoclorados.....	58
4.3 – Degradação fotoquímica	61
4.4 – Toxicidade do meio tratado	63
CONCLUSÕES.....	65
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do processo Kraft de fabricação de celulose e papel da Klabin S.A	10
Figura 2 – Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S) e degradação de 2,4-DCP por <i>P. ostreatus</i> , para as condições de 10g/L de glicose inicial e 30mg/L de 2,4-DCP adicionados no 10º dia de cultivo	51
Figura 3 – Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S) e degradação de 2,4-DCP por <i>P. sajor-caju</i> , para as condições de 10g/L de glicose inicial e 30mg/L de 2,4-DCP adicionados no 10º dia de cultivo	51
Figura 4 – Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S) e degradação de 2,4,6-TCP por <i>P. ostreatus</i> , para as condições de 10g/L de glicose inicial e 30mg/L de 2,4,6-TCP adicionados no 10º dia de cultivo.....	53
Figura 5 – Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S) e degradação de 2,4,6-TCP por <i>P. sajor-caju</i> , para as condições de 10g/L de glicose inicial e 30mg/L de 2,4,6-TCP adicionados no 10º dia de cultivo	53
Figura 6 – Crescimento micelial (X) e consumo de glicose (S) por <i>P. ostreatus</i> , para as condições de 10g/L de glicose inicial e adição de 30mg/L de 2,4-DCP + 2,4,6-TCP no 10º dia de cultivo, com K_{La} inicial de 82 h^{-1}	57
Figura 7 – Crescimento micelial (X) e consumo de glicose (S) por <i>P. ostreatus</i> , para as condições de 10g/L de glicose inicial e adição de 30mg/L de 2,4-DCP + 2,4,6-TCP no 10º dia de cultivo, com K_{La} inicial de 15 h^{-1}	57
Figura 8 – Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S) e degradação de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP e atividade da lacase no cultivo de <i>P. ostreatus</i> , para as condições de 10g/L de glicose inicial e adição de 225mg/L de 2,4-DCP + 2,4,6-TCP no 6º dia de cultivo, com K_{La} inicial de $13,4\text{h}^{-1}$	59
Figura 9 – Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S) e degradação de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP e atividade da lacase no cultivo de <i>P. ostreatus</i> , para as condições de 10g/L de glicose inicial e adição de 225mg/L de 2,4 DCP + 2,4,6 TCP no 6º dia de cultivo, com K_{La} inicial de $13,4\text{h}^{-1}$, conduzido na ausência de luz ..	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de degradação dos organoclorados por <i>P. sajor-caju</i> em frascos agitados após o pulso	54
Tabela 2 – Porcentagem de degradação dos organoclorados por <i>P. ostreatus</i> em frascos agitados após o pulso	54
Tabela 3 – Resultados do teste (definitivo) de toxicidade com meio de cultivo (controle) e com meio de cultivo tratado	64

LISTA DE ABREVIACÕES

AOX – Organohalogenados absorvíveis

C – Concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol/L)

C* - Concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L)

CB – Clorobenzeno

4 CP – 4 clorofenol

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DCB – Diclorobenzeno

2,4 DCP – 2,4 diclorofenol

DQO – Demanda química de oxigênio

K_La – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h⁻¹)

LiP – Lignina peroxidase

MnP – Manganês Peroxidase

PCP – Pentacloro Fenol

PHA – Hidrocarboneto Aromático policíclico

POL – Meio de cultivo indicado para a produção de exopolissacarídeos

r_x – Velocidade global de crescimento micelial (g/L.dia)

r_x' - Velocidade máxima de crescimento micelial (g/L.dia)

TCF – Totalmente livre de cloro

2,4,6 TCP – 2,4,6 triclorofenol

TD – Meio de cultivo composto de trigo e dextrose

TDA – Meio de cultivo composto de trigo, dextrose e ágar.

t_f – Tempo final de processo (dia)

t_{Mx} – Tempo no qual a velocidade de crescimento micelial é máxima (dia)

TRFLP – Terminal restriction fragment length polymorphism

v/v – Volume/volume

X – Concentração de biomassa (g/L)

X_0 – Concentração inicial de biomassa (g/L)

X_f – Concentração final de biomassa (g/L)

X_M – Concentração de biomassa no ponto em que a velocidade de crescimento micelial é máxima (g/L)

$Y_{X/S}$ – Fator de conversão de substrato em células (g/g)

INTRODUÇÃO

As atividades humanas são responsáveis pela geração de sérios problemas ambientais, tendo como maior agravante o crescimento da população que acarreta o estabelecimento de conglomerados de alta densidade populacional. Consequentemente, a atividade industrial cresce acompanhando as necessidades da sociedade, contribuindo significativamente para o fenômeno de contaminação ambiental em função do aumento da quantidade de resíduos produzidos, muitas vezes contaminados por espécies químicas de caráter tóxico.

Dentre as atividades industriais, a indústria de papel e celulose é uma das mais importantes do mundo, sendo que o Brasil ocupa atualmente a sexta posição como produtor mundial de celulose e pasta. Porém, por utilizar grandes volumes de água, é uma das que mais contribuem para o processo de contaminação do ambiente por compostos organoclorados, oriundos do processo de branqueamento da polpa.

O ambiente natural por si só busca a auto-preservação, através da atuação dos microrganismos presentes no meio ambiente, degradando os contaminantes. No entanto, uma carga poluidora elevada excede a capacidade de autodepuração do ambiente, ocasionando impactos sobre os meios físico, biológico e social.

Acompanhando o desenvolvimento da industrialização e dos problemas ambientais, surgem novas alternativas tecnológicas buscando minimizar os impactos causados pela intervenção antropogênica ao ambiente.

A capacidade das bactérias e fungos de degradar compostos é denominada biodegradação e a técnica de utilização desta capacidade para remediação ambiental, transformando substâncias perigosas em substâncias menos tóxicas ou não tóxicas, chama-se biorremediação. Estes processos buscam acelerar o que a natureza levaria dezenas ou até mesmo centenas de anos para executar. O processo de biorremediação utilizando fungos da classe dos basidiomicetos para o tratamento de efluentes industriais contendo compostos clorados tem se mostrado eficiente em função do complexo enzimático presente nestes organismos.

Na busca de tecnologias mais limpas e menos onerosas, basidiomicetos saprófitas, dentre os quais os do gênero *Pleurotus*, têm sido estudados por diferentes grupos de pesquisa e tem se mostrado capazes de degradar compostos organoclorados como clorolignina e clorofenóis. No entanto, não foram encontrados relatos da biodegradação por *Pleurotus* de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP concomitantemente, substâncias recalcitrantes encontradas em resíduos do setor papelero.

Desse modo, este trabalho teve como objetivo geral estudar a capacidade de fungos do gênero *Pleurotus* em degradar compostos organoclorados, com vistas à sua posterior aplicação na biorremediação de efluentes clorados provenientes da indústria de papel e celulose. Os objetivos específicos deste trabalho foram: (a) estudar a cinética de crescimento micelial e de degradação de 2,4 diclorofenol (2,4-DCP) e de 2,4,6 triclorofenol (2,4,6-TCP) por *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* em frascos agitados a fim de identificar o melhor microrganismo para degradação destes compostos isoladamente; (b) avaliar, em biorreator de bancada, o efeito do $K_L a$ inicial e da concentração inicial de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP sobre o crescimento micelial e a capacidade de biodegradação pelo microrganismo selecionado em (a); (c) investigar a eventual existência de degradação não biológica dos organoclorados durante o bioprocessos; (d) investigar a possível toxicidade do meio biorremediado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A indústria de papel e celulose

A indústria de papel e celulose é atualmente uma das mais importantes do mundo. No ano de 2007 a produção mundial de celulose totalizou 194,21 milhões de toneladas, o que representa um crescimento de 51,75% em relação à produção alcançada em 1980 (MONTEBELLO e BACHA, 2007; BRACELPA, 2009).

O resultado da produção de celulose, em 2006, levou o Brasil a passar da sétima para a sexta posição, como produtor mundial, ultrapassando o Japão e aproximando-se do patamar dos grandes produtores europeus, Suécia e Finlândia (BRACELPA, 2009). A indústria brasileira encerrou o ano de 2008 com a produção de 12,8 milhões de toneladas de celulose. Com este resultado o setor registrou crescimento de 7,5% em relação as 11,9 milhões de toneladas de celulose produzidas em 2007 (BRACELPA, 2009). Embora estejam disponíveis os dados da produção de celulose para o ano de 2008 no Brasil, não são apresentados os dados de outros países não sendo possível verificar se o Brasil mudou sua posição no “ranking” mundial (BRACELPA 2009).

Os números da produção brasileira de papel em 2008 registraram um aumento de 1,6% em relação ao ano anterior. As empresas fecharam o ano com a fabricação de 9,15 milhões de toneladas de papéis de todos os tipos, volume que superou as 9,0 milhões de toneladas produzidas em 2007 (BRACELPA, 2009).

Os investimentos realizados por este segmento industrial nos últimos anos tornaram o Brasil o maior produtor mundial de celulose fibra curta branqueada, que passou de 1,4 para 7,7 milhões de toneladas/ano entre 1990 e 2007, superando, nesse tipo de celulose, a produção dos Estados Unidos (BRACELPA, 2007). Em relatório publicado em 2009 a rotação do plantio de eucalipto no Brasil é de 7 anos, o que permite ao país obter um rendimento de $41\text{m}^3/(\text{há.ano})$ (BRACELPA, 2009).

Apesar de sua indiscutível importância econômica, estas empresas apresentam um elevado potencial de contaminação ambiental, não só pela presença de compostos recalcitrantes, mas também pelo elevado volume de efluente gerado, que deve ser tratado antes de seu lançamento nos corpos aquáticos receptores (ALMEIDA *et al.*, 2004). Segundo Freire (2000), processos industriais que utilizam grandes volumes de água contribuem significativamente com a contaminação dos corpos d'água, principalmente pela ausência de sistemas de tratamento para os grandes volumes de efluentes produzidos. Estima-se que sejam liberados diariamente no ambiente mais de 62 milhões de metros cúbicos de efluentes produzidos na polpação e branqueamento da celulose por estas indústrias distribuídas ao redor do planeta (BERTAZZOLI e PELEGRINI, 2002).

2.1.1 Composição e estrutura da madeira

A grande disponibilidade de madeira no mundo e principalmente sua renovabilidade, fazem desse material um interessante foco de estudos (FERRAZ, 2001). A madeira é um biocomposto natural constituído principalmente por fibras. É um tecido biológico altamente organizado em nível celular e molecular. Sua composição química apresenta cerca de 20-30% de

lignina, 65-80% de polissacarídeos (dos quais 40-50% são celulose e 20-35% são hemiceluloses), 1-3% de outras substâncias de baixa massa molar, representadas essencialmente por extrativos (compostos alifáticos, incluindo alcanos, álcoois e ácidos graxos; terpenos e terpenóides, como esteróis e; compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, lenhanos e estilbenos), cinzas (menos que 1%) e compostos minerais presentes em pequenas quantidades. As quantidades relativas dos componentes da madeira variam com o tipo de madeira e com o tipo de parede celular. Geralmente, classifica-se a madeira em dois tipos: as *Gymnospermae* ou madeiras duras (*hardwood*), que são as folhosas e as *Angiospermae* ou moles (*softwood*), que são as resinosas (SJÖSTRÖM, 1981 *apud* TAVARES, 2006).

A celulose é um homopolímero linear constituído por unidades repetidas de celobiose β -D-glucopirranose, que são ligadas umas as outras por ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4). As suas cadeias apresentam entre 4000 e 10000 unidades de D-glucose anidra. A celulose está estruturalmente ligada à hemicelulose e à lignina, não sendo assim um substrato facilmente acessível. A forma cristalina é resistente ao ataque químico e à degradação microbiana enquanto a forma amorfa é primeiramente atacada e degradada (BIERMANN, 1996 *apud* TAVARES, 2006).

As hemiceluloses (ou polioses) são compostas pelos açúcares glicose, manose e galactose (hexoses) e xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira. Esses açúcares apresentam-se na forma de polímeros ramificados, de menor massa molecular que a celulose e podem ser homopolímeros, como a xilana, formada por unidades de xilose ou heteropolímeros, como é o

caso da glicomanana, formada por glicose e manose (FERRAZ, 2001). Os monossacarídeos ligam-se uns aos outros essencialmente por ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4), podendo-se, no entanto, encontrar outros tipos de ligações glicosídicas. Devido ao baixo grau de polimerização e à sua natureza amorfa, as hemiceluloses são degradadas mais facilmente do que a celulose. Apesar disso, ainda é necessário um sistema enzimático complexo para a sua degradação, devido à sua estrutura variável e ramificada (SJÖSTRÖM, 1981 *apud* TAVARES, 2006). Tal como a celulose, grande parte da função das hemiceluloses é dar resistência à parede celular, atuando como matriz de suporte para as microfibrilas de celulose (KIRK & FAREEL, 1987 *apud* TAVARES, 2006).

A lignina é o segundo maior componente celular da madeira. Ela estabelece as ligações entre as fibras da madeira, conferindo firmeza e rigidez às fibras. É encontrada entre as células e a parede celular e é resistente ao ataque biológico, uma vez que não apresenta ligações que sejam hidrolizáveis. É um polímero de estrutura amorfa, aromática, altamente ramificada e insolúvel em água. Apresenta-se sob uma rede tridimensional com ligações cruzadas (SJÖSTRÖM, 1981 *apud* TAVARES, 2006). É um heteropolímero complexo constituído por unidades de fenilpropano (C₉) que apresenta uma elevada massa molar (600-10000 kDa). Durante o tratamento químico, a sua remoção permite que as fibras de celulose e hemicelulose sejam separadas facilmente. Ela apresenta um carácter hidrofóbico, que na presença de pastas inibe a absorção de água e o inchamento das fibras (KIRK & CULLEN, 1998 *apud* TAVARES, 2006).

2.1.2 Processo de produção

Para a produção do papel é necessário separar a lignina da celulose na polpa da madeira. A lignina é uma macromolécula aromática tridimensional, de estrutura não uniforme, e sua eliminação se dá por oxidação, que fragmenta a estrutura original em diversas moléculas de diferentes tamanhos, muitas das quais apresentando maior toxicidade em relação à lignina (REID, 1998).

O processo mais empregado para separar a lignina da celulose é o processo Kraft, que remove aproximadamente 90% dessa macromolécula até a formação da polpa escura. Empregando-se uma combinação de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio a elevadas temperaturas ($\sim 170^{\circ}\text{C}$), a lignina é degradada efetivamente em fragmentos solúveis em água e fibras de polpa, predominantemente, compostas de celulose e hemicelulose (PERISSOTTO e RAMOS, 2002). Os 10% restantes têm que ser eliminados nos processos de branqueamento, que normalmente são realizados com cloro, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, conforme os estágios de branqueamento empregados (GARG e MODI, 1999).

A fabricação do papel envolve cinco passos básicos (ALI E SREEKRISHNAN, 2001 *apud* NETO, 2002) que são:

a) Picagem - conversão das árvores em pequenas peças chamadas cavacos e remoção da casca da planta. Neste passo, os materiais usados são todos naturais, podendo ser madeiras mais macias ou mais resistentes, ou ainda resíduos agroindustriais;

b) Polpação - transformação dos cavacos em polpa de celulose. Este processo remove a maior parte da lignina e da hemicelulose presentes no material bruto, resultando em uma polpa rica em celulose. A polpação pode ser efetuada por diversos métodos, como polpação mecânica, semiquímica, Kraft, por sulfeto etc. Nesta etapa acontece a transferência de ácidos graxos de cadeia longa e resinas para a água;

c) Branqueamento – retirada da cor amarelada da polpa de celulose, que é ocasionada pela presença de ligninas cromóforas. Diversos agentes são utilizados para o branqueamento da polpa, incluindo o cloro, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ozônio, oxigênio etc. Estes podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto para o branqueamento mais eficiente. Neste passo as ligninas, fenóis, resinas ácidas e outros compostos, acabam reagindo com o cloro presente no meio e propiciam a formação de compostos clorados de alta toxicidade e xenobióticos;

d) Lavagem - remoção dos agentes de branqueamento da polpa; geralmente um álcali (soda cáustica) é usado para extrair a cor e agentes de branqueamento da polpa;

e) Produção de papel e derivados - mistura da polpa lavada com cargas apropriadas (argilas, dióxido de titânio, carbonato de cálcio) e agentes para melhorar a qualidade e resistência do papel (amido, rosin).

Cada passo pode variar de acordo com a indústria e com o tipo de processo adotado e o efluente final é uma combinação dos efluentes gerados nas diversas etapas envolvidas (ALI E SREEKRISHNAN, 2001 *apud* NETO, 2002).

2.1.3 Resíduos gerados

A figura 1 apresenta, apenas de forma ilustrativa, o fluxograma de produção de celulose pelo processo Kraft, utilizado na Klabin S.A., com as respectivas saídas de efluente, conforme descrito por Barros e Nozaki (2002). Este tipo de processo, segundo Freire *et al.* (2000), é responsável pela geração de efluentes com alta demanda bioquímica de oxigênio, turbidez, cor e sólidos em suspensão.

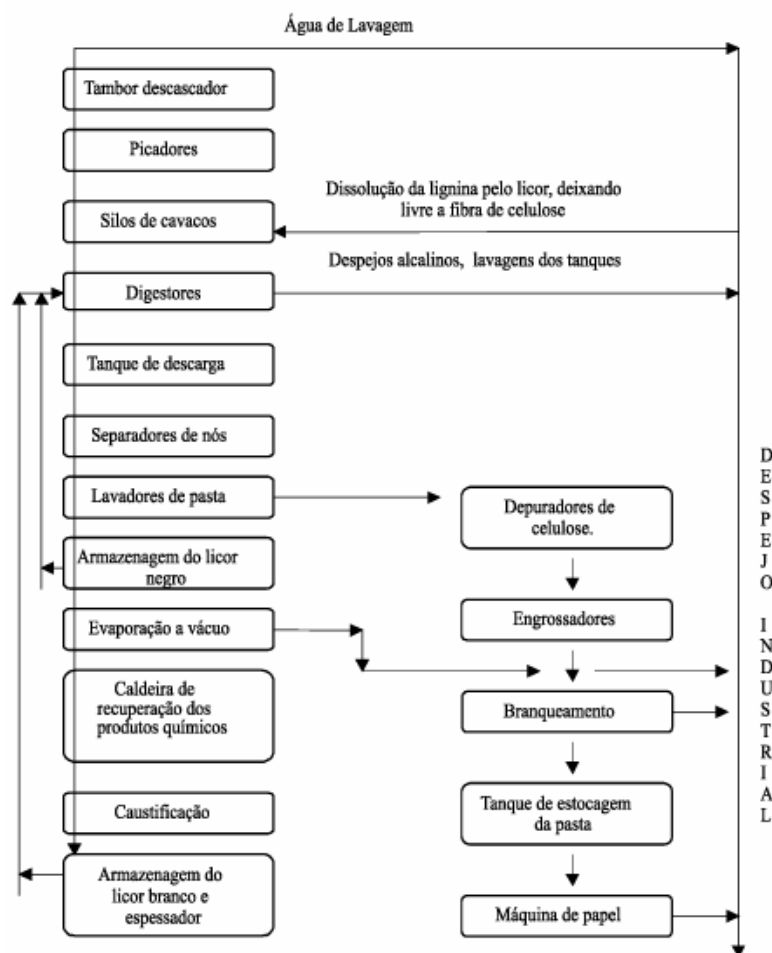


Figura 1 - Fluxograma do processo Kraft de fabricação de celulose e papel da Klabin S.A.
Fonte: BARROS e NOZAKI, 2002.

Embora o volume de efluente gerado durante a etapa de branqueamento seja significativamente pequeno (cerca de 10m³ por tonelada de polpa) em relação ao volume total gerado na indústria de papel e celulose (cerca de 80m³ por tonelada de polpa gerada), é nessa etapa que se formam os compostos mais deletérios para o ambiente. Durante o processo convencional de branqueamento, utiliza-se cloro para a remoção da lignina residual presente nas fibras celulósicas, sendo gerada uma enorme variedade e quantidade de substâncias organocloradas recalcitrantes e altamente tóxicas (ALMEIDA *et al.*, 2004), tais como dioxinas, clorocatecóis, cloroguaiacóis e clorofenóis (XIE *et al.*, 1986; ODENDAHL, 1994), destacando-se neste último grupo o 2,4 diclorofenol (2,4-DCP) e o 2,4,6 triclorofenol (2,4,6-TCP).

De acordo com Durán (2004), os efluentes originados da produção e do branqueamento das polpas Kraft podem causar toxicidade aguda ou crônica, mutagenicidade, deficiência de oxigênio, eutrofização nos corpos d'água receptores e, conseqüentemente, modificações nas comunidades de plantas e de animais. Em função dos impactos ambientais causados por estes efluentes, esforços têm sido realizados no sentido de reduzir ou eliminar o uso de compostos clorados nas etapas de branqueamento da polpa Kraft, buscando-se por meio de estudos, nos últimos anos, a substituição desses compostos por agentes à base de oxigênio (oxigênio, peróxido de hidrogênio e ozônio). A produção de polpa totalmente livre de cloro (TCF) permanece praticamente a mesma, o agravante é que o efluente das TCF tem apresentado toxicidade crônica e os compostos ainda não foram identificados. Dessa forma, novas alternativas têm sido buscadas e a tendência atual é a produção de polpas livres de cloro elementar (ECF), por meio de processo que emprega dióxido de cloro ao invés de cloro elementar. No entanto, segundo o autor, as

perspectivas são de que pelo menos nos próximos quinze anos, ainda se utilizem estes compostos convencionais.

2.2 Clorofenóis: 2,4 diclorofenol (2,4-DCP) e 2,4,6 triclorofenol (2,4,6-TCP)

O 2,4-DCP apresenta-se na forma de um sólido incolor, da família química do fenol, de fórmula molecular $C_6H_4Cl_2O$. Possui massa molar de 163,01 g, com ponto de fusão de 45°C e ponto de ebulição de 216°C. Sua solubilidade em água é de 0,46 g/100mL a 20°C e sua pressão de vapor é de 1 mm Hg a 53°C. Pode reagir violentamente com materiais oxidantes e sua demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é de 100% em 5 dias. É um composto biodegradável por culturas aclimatadas (99% de degradação por culturas aclimatadas e 98% de remoção da demanda química de oxigênio (DQO) em sistemas de lodos ativados aclimatados) (CETESB, 2008).

O 2,4,6-TCP apresenta-se na forma de um sólido entre incolor e amarelado, de fórmula molecular $C_6H_3Cl_3O$. Possui massa molar de 197,5 g, com ponto de fusão de 69,5°C e ponto de ebulição de 246°C. É insolúvel em água e sua pressão de vapor a 76,5°C é de 133 Pa (0,9976 mm Hg). Pode reagir violentamente com materiais oxidantes (International Chemical Safety Cards, 2008). Não foram encontrados dados na literatura sobre a eventual biodegradabilidade do 2,4,6-TCP isoladamente ou na presença de outros organoclorados. No entanto, segundo dados reportados pela CETESB (2008), o 2,4,5 triclorofenol apresenta-se na forma de um sólido de cor amarelada com um odor forte de desinfetante e sua degradabilidade é lenta, sendo, para fins de controle ambiental, considerado biorresistente.

2.2.1 Limites individuais de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP para determinação dos padrões de qualidade das águas

A Resolução do CONAMA nº. 357/2005 dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Conforme a legislação os limites máximos do 2,4-DCP e 2,4,6-TCP em cada classe são os seguintes:

a) Águas doces

Para as águas doces enquadradas como classe I, o limite máximo permitido para o 2,4-DCP é de 0,3 µg/L e para o 2,4,6-TCP é de 0,01 mg/L, sendo que para águas doces onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo o valor máximo permitido para o 2,4,6-TCP é de 2,4 µg/L. Já para as águas enquadradas como classe III, o valor máximo para o 2,4-DCP não é mencionado pela resolução, mas para o 2,4,6-TCP o limite máximo permitido é de 0,01 mg/L.

b) Águas salinas e salobras

Para as águas salinas e salobras enquadradas como classe I, o limite máximo permitido para o 2,4-DCP e 2,4,6-TCP não são mencionados, sendo que para águas onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo o valor máximo permitido para o 2,4-DCP é de 290 µg/L e para o 2,4,6-TCP é de 2,4 µg/L. Já para as águas enquadradas como classe II os valores máximos para o 2,4-DCP e o 2,4,6-TCP também não são mencionados na legislação.

Com relação às condições e padrões de lançamento de efluentes a resolução não se refere aos valores máximos permitidos de lançamento do 2,4-DCP e do 2,4,6-TCP.

No Estado de Santa Catarina a legislação que trata dos padrões de emissão de efluentes líquidos é o Decreto Estadual nº. 14.250/1981, que regulamenta dispositivos da Lei nº. 5.793/1980, referente à proteção e a melhoria da qualidade ambiental. Apesar de não mencionar especificamente o 2,4-DCP e o 2,4,6-TCP, os efluentes somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente nos corpos de águas interiores, lagunas, estuários e a beira-mar desde que obedeçam entre outros padrões a concentração máxima de 0,05 mg/L de compostos organoclorados.

2.2.2 Teores de clorofenóis no efluente da indústria de papel e celulose

No caso da indústria papeleira da região de Campinas-SP, são produzidos em média 250 m³/h de efluente no estágio de branqueamento, denominado de primeira extração alcalina, onde dentre os parâmetros físico-químicos analisados os clorofenóis e organoclorados de um modo geral foram medidos como organohalogenados absorvíveis (AOX), apresentando nas análises AOX = 60 mg/L e fenóis totais = 37 mg/L (BERTAZZOLI e PELEGRINI, 2002).

O AOX é reportado como a soma geral dos parâmetros de halogênios orgânicos absorvíveis, não sendo específico para o cloro, mas para todos os halogênios (F, Cl, Br, I), mas devido à origem das amostras, indústria de papel e celulose, os compostos orgânicos são quase na sua totalidade, ligados ao cloro (GUAGLIANONI e PIRES, 1997).

2.3 Processos de tratamento de efluentes

2.3.1 Processos físicos

Segundo Freire *et al.* (2000), os tratamentos físicos utilizados no tratamento de efluentes são caracterizados por processos de:

- Separação de fases: sedimentação, decantação, filtração, centrifugação e flotação;
- Transição de fases: destilação, evaporação, cristalização;
- Transferência de fases: adsorção, “air-stripping”, extração por solventes;
- Separação molecular: hiperfiltração, ultrafiltração, osmose reversa, diálise.

Estes processos, de maneira geral, permitem uma depuração dos efluentes, entretanto, as substâncias contaminantes não são degradadas ou eliminadas, mas apenas transferidas para uma nova fase. Embora o volume seja significativamente reduzido, nestas novas fases continua persistindo o problema, pois os poluentes encontram-se concentrados, sem serem efetivamente degradados (FREIRE *et al.*, 2000).

A utilização dos métodos físicos como etapas de pré-tratamento ou polimento do processo final possuem extrema importância em um tratamento efetivo. Nesse sentido, a tecnologia de filtração com membranas vem demonstrando um alto potencial, principalmente no tratamento e reaproveitamento de águas residuais de processos industriais (FREIRE *et al.*, 2000).

Segundo Braile e Cavalcante (1993), o tratamento terciário ou polimento é utilizado para conseguir remoções adicionais de poluentes das águas residuárias, antes da sua descarga. Dentre os processos físicos do tratamento terciário dos efluentes estão a filtração para remoção adicional de DBO e DQO; remoção de sólidos inorgânicos através da eletrodialise, da osmose reversa e da troca iônica.

2.3.2 Processos químicos

Os tratamentos químicos vêm apresentando uma enorme aplicabilidade em sistemas de purificação de água e efluentes industriais. Dentre os processos químicos de eliminação de compostos poluentes, há métodos bastante utilizados como a precipitação e a incineração. A precipitação promove somente uma mudança de fase dos compostos, não eliminando completamente o problema ambiental. A incineração constitui-se em um dos procedimentos mais clássicos para a degradação de resíduos e espécies contaminantes, principalmente de organoclorados. No entanto, a sua utilidade é muito questionada, pois além do elevado custo pode levar à formação de compostos mais tóxicos do que o próprio efluente, tais como dioxinas e furanos (FREIRE *et al.*, 2000).

A aplicação do processo de ozonização na remediação do efluente papaleiro, especificamente, tem se mostrado bastante eficiente na descoloração do efluente, na oxidação de compostos refratários, na remoção da toxicidade e no aumento da biodegradabilidade do efluente. É capaz de converter compostos de alto massa molar em ácidos orgânicos de reduzida massa molar, além de promover alterações na estrutura química da molécula (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Dentre os processos oxidativos avançados, o processo fotoquímico tem demonstrado eficiência na degradação de inúmeras substâncias recalcitrantes ao tratamento biológico. Devido a isso, nas últimas duas décadas tem sido desenvolvidos trabalhos a fim de demonstrar a aplicação desta técnica (FREIRE *et al.*, 2000). Segundo os autores, apesar dos ótimos resultados alcançados, a implementação destes processos em escala industrial apresenta alguns problemas. O uso da luz ultravioleta, encareceria muito o tratamento. Por outro lado, construir estações de tratamento que utilizem luz solar continua sendo um desafio, assim como a busca de novos catalisadores que absorvam maior porcentagem da luz solar.

2.3.3 Processos biológicos

Sem dúvida, os tratamentos baseados em processos biológicos são os mais frequentemente utilizados, uma vez que permitem o tratamento de grandes volumes de efluente, transformando compostos orgânicos de alta massa molar em CO_2 e H_2O (ou CH_4 e CO_2), com custos relativamente baixos (FREIRE *et al.*, 2000).

Segundo Braile e Cavalcante (1993), os efluentes das fábricas de papel e celulose contêm substâncias em suspensão e dissolvidas, primeiramente sob a forma de componentes da madeira solubilizados e de fibras que, intencionalmente, foram descartadas durante as etapas do processo. De acordo com os autores, os tipos de tratamento biológico utilizados pelas indústrias de papel e celulose são: a) lagoas de estabilização, que são empregadas tanto para regularizar as descargas no corpo receptor como, também, para reduzir a carga de DBO. Este tipo de tratamento possui várias vantagens como segurança na eficiência, pequeno investimento e baixo custo operacional entre outras, porém tem como desvantagem a necessidade de grande extensão de terra; b) lagoas

aeradas, que evoluíram da necessidade de melhorar o funcionamento das lagoas de estabilização sobrecarregadas e tiveram uma ótima aceitação pelas indústrias de papel e celulose. As lagoas aeradas necessitam de menos espaço que as lagoas de estabilização; c) processo de lodo ativado, que compreende decantação primária, aeração, decantação secundária e retorno do lodo biológico ao tanque de aeração e, d) filtros biológicos, que não são muito utilizados nas indústrias de papel e celulose devido à preocupação com entupimento do meio filtrante.

Segundo Bento e Hoffmann (2007), os processos biológicos de tratamento de águas residuárias são protótipos artificiais, compactos e concentrados de processos naturais de depuração onde intervém uma população biológica variada, complexa e em competição constante, ou seja, um ecossistema em que cada organismo tem uma taxa de crescimento específico dependente de fatores bióticos e abióticos, controláveis ou não, como: disponibilidade de substrato, fatores ambientais e outros relativos ao dimensionamento e operação dos sistemas.

Bento e Hoffmann (2007) classificam, de maneira genérica, os microrganismos presentes nos reatores aeróbios em dois grandes grupos: a) os decompositores – constituindo cerca de 95% da população microbiana e sendo, na maioria, bactérias heterotróficas, além de alguns fungos e protozoários osmotróficos. São responsáveis pela degradação dos substratos presentes no efluente; b) os consumidores – compreendem os protozoários fagotróficos e os metazoários microscópicos, importantes na manutenção do equilíbrio ecológico do sistema.

Os processos enzimáticos também vêm sendo testados e correspondem a uma das mais recentes tecnologias para o tratamento biológico de efluentes. Dentro deste contexto, cabe às enzimas ligninolíticas, especialmente lignina peroxidase e manganês peroxidase, um papel de

destaque, em função da sua capacidade para degradar um grande número de substâncias tóxicas e persistentes. Estudos recentes têm mostrado uma grande potencialidade dos processos enzimáticos para a degradação de efluentes provenientes da indústria papelreira (FREIRE *et al.*, 2000). Segundo Karam e Nicell (1997), a lacase pode ser utilizada para polimerizar fenóis de baixa massa molar, facilitando dessa forma a remoção de clorofenóis e cloroligninas do efluente do processo de branqueamento da indústria de papel e celulose, apresentando-se como uma possível e eficiente forma de tratamento.

Segundo Freire *et al.* (2000), os tratamentos químicos podem ser utilizados para aumentar a biodegradabilidade de compostos recalcitrantes, diminuindo o tempo de tratamento dos tradicionais processos biológicos. Nesse sentido, vários trabalhos (MORAES *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2007; KASTANEK *et al.*, 2007) têm apontado para o emprego de processos combinados, fazendo uso das vantagens de diferentes métodos.

2.4 Biodegradação de compostos fenólicos

Segundo Durán (2004), as lagoas aeradas constituem o método mais comumente utilizado pelas indústrias papelreiras. Têm, aproximadamente, 2m a 6m de profundidade e um tempo de retenção de menos de dez dias. São mecanicamente aeradas com difusores de ar ou aeradores mecânicos. A eficiência depende do tempo de aeração, da temperatura e do tipo de efluente. Cerca de 80% da população microbiana das lagoas são bactérias Gram-negativas e apenas 1% são bactérias anaeróbias facultativas. Segundo o autor, o tratamento apresenta muitas

variações nas reduções de toxidade e AOX, parâmetro utilizado para estimativa do total de organoclorados.

No entanto, a degradação de compostos fenólicos pode ser conduzida não apenas por bactérias, mas também por leveduras (JIANG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008) e por fungos filamentosos (SEDARATI *et al.*, 2003; RUBILAR *et al.*, 2008).

2.4.1 Bactérias na degradação de compostos fenólicos

Somente poucas espécies de bactérias capazes de atacar a macromolécula de lignina são conhecidas. Entre elas, a mais estudada é *Streptomyces viridosporus*. Usualmente a extensão e velocidade da degradação causada por bactérias têm sido modestas comparadas com fungos de decomposição branca (GUTIERREZ, 1990).

Cupples e Sims (2007) investigaram microrganismos responsáveis pela degradação de herbicida contendo ácido 2,4-D diclorofenoxiacético em amostras de solo. A degradação completa do ácido 2,4-D diclorofenoxiacético ocorreu em 17 dias, enquanto em amostras sem microrganismo, no mesmo período, somente 10% foi degradado. Por meio do método TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), utilizando fragmento do DNA, identificou-se proteobactérias como as responsáveis pela degradação do ácido 2,4-D diclorofenoxiacético.

Estudos realizados por Ziagova e Liakopoulou-Kyriakides (2007), analisando a degradação de 2,4-DCP e 4 Cl-m-cresol por *Pseudomonas* sp., revelaram que este último

poluente apresentou maior inibição do crescimento microbiano ($\mu_{\max} = 0,154 \text{ h}^{-1}$) em relação ao primeiro ($\mu_{\max} = 0,181 \text{ h}^{-1}$). Os autores observaram também que a liberação de cloretos, no caso do 2,4-DCP, ocorre durante a fase exponencial de crescimento.

Yang e Lee (2008) isolaram uma linhagem de *Rhizobium sp.* 4-CP-20 a partir de uma cultura mista aclimatada. A linhagem foi capaz de degradar completamente 100 mg/L de 4 clorofenol (4-CP) em 3,95 dias. Os resultados obtidos pelos autores revelaram também que concentrações iniciais de 4-CP superiores a 240 mg/L inibiram o crescimento da bactéria e, conseqüentemente, sua capacidade de biodegradação.

A biodegradação aeróbia do 2,4-DCP por um consórcio de quatro espécies de *Bacillus* isolados de solo poluído, pelo enriquecimento com clorofenóis, foi estudada por Herrera *et al.* (2008). Duas fontes de nitrogênio, NH_4Cl e KNO_2 , foram testadas, resultando em concentrações máximas de biomassa de 350 e 450 mg/L, respectivamente. As quantidades de 2,4-DCP metabolizadas em 21 dias atingiram valores pico de 2,1 e 2,5 mM, representando, 70 e 85% de degradação, respectivamente. O cloro liberado durante o mesmo período foi de 4,7 mM e 5,3 mM com uso de NH_4Cl e KNO_2 , respectivamente, revelando a importância da presença do cloro livre no catabolismo do 2,4-DCP por estes microrganismos.

A bactéria *Acinetobacter sp.* isolada de solo agrícola foi capaz de metabolizar 4-CP como única fonte de carbono (WU *et al.*, 2008). O mecanismo de degradação proposto foi um ciclo de orto-clivagem modificado, sendo que a atividade da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase foi marcadamente induzida. A bactéria apresentou elevada capacidade de biodegradação em concentrações iniciais de 4-CP entre 2 e 8 mmol/L e foi capaz de sobreviver em até 8 mmol/L. Os

autores relatam que a bactéria isolada foi também capaz de degradar outros organoclorados como o 2,4-DCP.

2.4.2 Fungos na degradação de compostos fenólicos

a) Leveduras

Jiang *et al.* (2007) estudaram a degradação de fenol e 4 clorofenol (4-CP) por uma cultura pura de *Candida tropicalis* e os resultados mostraram que esta levedura foi capaz de degradar 2.000 mg/L de fenol em 66 horas e 350 mg/L de 4-CP em 55 horas quando cultivada na presença de apenas uma das duas substâncias. Na presença das duas substâncias, o 4-CP inibiu a degradação do fenol, fazendo com que o microrganismo chegasse a degradar no máximo 800 mg/L. Os autores observaram também que a adição de baixas concentrações de fenol (100 – 600 mg/L) foi capaz de suprir as necessidades de carbono e energia do microrganismo e acelerar a assimilação de 4-CP.

Já, Wang *et al.* (2008), investigaram a biodegradação de fenol e de 4-CP por uma cultura pura de *Candida albicans* em condições anaeróbias. Observou-se que baixas concentrações de fenol (25 a 150 mg/L) forneceram suficiente fonte de carbono e energia ao microrganismo no início da fase de biodegradação e levaram a uma aceleração da assimilação do 4-CP, resultando na degradação de 50 mg/L de 4-CP em menos tempo que na ausência de fenol.

b) Fungos filamentosos

Os caminhos atuais da biotecnologia indicam fungos da classe dos basidiomicetos, degradadores de lignina, como eficientes na degradação de grande variedade de compostos e de corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (KAMIDA E DURRANT, 2005).

Segundo Durán (2004), os fungos degradadores de materiais lignocelulósicos são responsáveis pela manutenção de um dos mais importantes ciclos biogeoquímicos na natureza, o ciclo do carbono. Devido à ação desses fungos, o complexo polimérico existente nos materiais lignocelulósicos é despolimerizado e, em seus estágios finais de decomposição, transformado em CO₂ e água. Dentre estes fungos encontram-se os de decomposição parda (que degradam principalmente polissacarídeos), os de decomposição branca (que degradam componentes lignocelulósicos) e, um terceiro grupo restrito de fungos (que degradam a lignina, mantendo a celulose praticamente intacta).

De acordo com Rubilar *et al.* (2008), os compostos fenólicos clorados, produzidos a partir da degradação parcial da lignina durante o processo de branqueamento, na produção de papel, são degradados por fungos de decomposição branca, organismos capazes de degradar a lignina a CO₂ e H₂O. Este grupo de microrganismos mostra-se muito interessante para a remoção de compostos fenólicos clorados do ambiente. São robustos, estão presentes em toda parte e sobrevivem na presença de elevadas concentrações de vários poluentes, mesmo em baixa biodisponibilidade. A atividade destes organismos está relacionada, principalmente, à ação das enzimas oxidoredutases,

como a lacase, a manganês peroxidase (MnP) e a lignina peroxidase (LiP), que são liberadas pelas células fúngicas no ambiente.

Phanerochaete chrysosporium é o fungo mais estudado para degradação de clorofenóis. Nesse caso, as lacases e peroxidases conduzem a primeira etapa da oxidação dos clorofenóis, formando para-quinonas e, conseqüentemente, liberando o átomo de cloro. As etapas degradativas subseqüentes, envolvendo várias enzimas e mediadores redox não específicos, altamente reativos, produzidos pelo fungo, tornam estes organismos capazes de degradar de forma eficiente vários compostos tóxicos (RUBILAR *et al.*, 2008).

Experimentos conduzidos por Valli e Gold (1991) revelaram que a degradação de 2,4-DCP por *Phanerochaete chrysosporium* depende da concentração de nitrogênio no meio. Em cultivos com limitação de nitrogênio (1,2 mM de tartarato de amônio), 50% do 2,4-DCP foi degradado a CO₂ em 24 dias de cultivo, enquanto apenas 8% de degradação foi observada com 12 mM da mesma fonte de nitrogênio. Com o objetivo de evitar a inibição do crescimento do fungo *P. chrysosporium* por 2,4-DCP, este organoclorado só foi adicionado ao meio no 6º dia de cultivo.

De acordo com Sedarati *et al.* (2003), a adição de clorofenóis (2,4-DCP e Pentaclorofenol - PCP) ao meio de cultivo, induziu a produção de lacase e de manganês peroxidase por *Trametes versicolor*, mas não induziu a formação de lignina peroxidase. Os autores compararam a degradação dos clorofenóis e a síntese das enzimas em biorreator com células livres e com células imobilizadas em nylon e observaram que o último processo proporcionou uma remoção mais eficiente dos clorofenóis. Níveis mais elevados de lacase foram mantidos em processo com

células imobilizadas, o que pode justificar a maior eficiência de degradação de clorofenóis observada neste tipo de processo, já que pesquisa de literatura feita pelos autores reporta que a atividade da lacase é a principal atividade enzimática responsável pela transformação de clorofenóis.

Entre os fungos de degradação branca, aqueles pertencentes ao gênero *Pleurotus* vêm se destacando por inúmeras características desejáveis para aplicação em processos de bioconversão (HESS *et al.*, 2006), incluindo a biodegradação de compostos fenólicos (SOARES e DURÁN, 2001; MUNARI *et al.*, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; SILVA, 2005), conforme descrito no item 2.5.

2.4.3 Consórcios microbianos na degradação de compostos fenólicos

Lee e Lee (2007) utilizaram culturas mistas em meio enriquecido com fenol ou com glicose, em processo contínuo para posterior teste de biodegradação de 4-CP. Todos os testes revelaram que a adição de fenol como substrato de crescimento foi preferível em relação à glicose, já que promoveu o aumento da degradação do 4-CP. No entanto, os autores alertam para os riscos da toxicidade do fenol.

Em trabalho realizado por Salmerón *et al.* (2007), foi estudada a biodegradação de uma mistura de clorofenóis por um consórcio de microrganismos também em processo contínuo. Usando fenol como fonte primária de carbono e energia, o consórcio microbiano cometabolicamente degradou mono-, di- e triclorofenóis, com eficiências globais variando entre 95 e 99,8% e remoção de DQO entre 85 e 97,8%. Em todas as culturas, os resultados obtidos com

o consórcio foi melhor do que os obtidos com culturas puras. Além disso, observou-se que misturas binárias dos clorofenóis promoveram aumento das taxas específicas de biodegradação dos substratos quando comparado com o uso de substrato simples.

Kargi e Konya (2007) estudaram a degradação de 4-CP numa unidade de lodo ativado com diferentes tempos de resistência hidráulica (TRH). Observaram que a remoção da DQO aumentou com o aumento do TRH de 5 para 15 horas. Nessa condição, aproximadamente 91% da DQO e 99% do 4-CP foram removidos. Os autores atribuem este resultado à elevada concentração microbiana em elevados valores de TRH. Assim, o efeito inibitório do 4-CP pode ser desprezado.

2.4.4 Processos combinados na degradação de compostos fenólicos

Segundo Barros e Nozaki (2002), a remoção de derivados de ligninas em efluentes das indústrias de papel e celulose pela floculação/coagulação e, a seguir, pela fotodegradação catalítica mostrou ser eficiente na remoção de aproximadamente 66% destes compostos refratários, neste caso o fenol.

Moraes *et al.* (2006) estudaram a aplicação da bactéria *Azotobacter vinellandi* no tratamento do efluente Kraft da indústria de celulose e papel. Foram utilizados vários tipos de tratamento: o tratamento biológico isolado e a combinação nos estágios de pré e pós-tratamento utilizando os processos de ozonização e fotocatalítico. No tratamento biológico, a produção de sideróforos por *A. vinellandi* teve um efeito importante sobre a eficiência da degradação dos efluentes. Entre os diferentes tratamentos combinados, o melhor resultado (45% de aumento na

mineralização do efluente Kraft) foi obtido ao se utilizar o processo fotocatalítico como pré-tratamento ao tratamento biológico.

Kastanek *et al.* (2007) obtiveram eficiência máxima de biodegradação de 4-CP por *Pandoraea sp.* (70%) após 42 dias de cultivo tanto com células livres como imobilizadas. No entanto, o uso combinado de um pré-tratamento com reagente de fenton antes da biodegradação duplicou a velocidade de degradação. A velocidade de degradação foi ainda maior quando se utilizou como pré-tratamento a descloração redutiva com paládio e ferro. Nesse caso, 44,44%, 90,48% e 99,2% do 4-CP inicial foram degradados em 7, 28 e 56 dias respectivamente. Os autores atribuem os resultados positivos ao efeito co-substrato do fenol, intermediário obtido durante o pré-tratamento.

A descloração com paládio e ferro foi também testada por Choi *et al.* (2007), nesse caso, como pré-tratamento para a biodegradação de 2,4,6-TCP. Apenas fenol foi detectado no efluente do pré-tratamento, indicando que houve descloração completa do 2,4,6-TCP. A biodegradação foi conduzida em processos descontínuo e contínuo com microrganismos anaeróbios. Em processo contínuo foi necessário um tempo de residência de 7 a 8 dias para a remoção completa de 100 μM de fenol.

Dantas *et al.* (2008) observaram que o pré-tratamento, por ozonização, de soluções contendo concentrações de 100 a 500 mg/L de 4-CP aumentaram sua biodegradabilidade (DBO_5 / DQO) de zero a 0,2 – 0,37. A combinação dos processos de ozonização com processos biológicos (aeróbio seguido de anaeróbio) promoveu a remoção de mais de 90% do carbono orgânico total (COT).

De acordo com Rahman *et al.* (2007), o uso combinado de processos de adsorção e biodegradação - reator de biofilme operando em bateladas seqüenciais (SBBR) com carvão ativado granular (GAC) – promoveu aproximadamente 70% de remoção de pentaclorofenóis em efluente secundário da indústria de papel.

2.5 Enzimas ligninolíticas de fungos

O sistema lignocelulolítico de fungos, tais como *Pleurotus* sp. tem sido extensivamente estudado (GARZILLO *et al.*, 1994). Duas famílias de enzimas ligninolíticas foram caracterizadas: peroxidases e fenol oxidases (KARAM e NICELL, 1997). Estas enzimas podem ser usadas para várias aplicações ambientais e biotecnológicas. *Pleurotus* sp. e suas enzimas servem como alternativa eficiente para a biorremediação de poluentes recalcitrantes e mostram habilidade em degradar e mineralizar substâncias químicas tóxicas, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHAs), atrazina, organofosforados etc. (NOVOTNÝ *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004).

2.5.1 Peroxidases

As peroxidases são produzidas por um grande número de microrganismos e plantas. Elas catalizam uma variedade de reações, mas todas elas requerem a presença de peróxidos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), para sua ativação. O peróxido de hidrogênio primeiro oxida a enzima, a qual oxida o substrato. As peroxidases, entre elas a lignina peroxidase, manganês

peroxidase e outras peroxidases de diferentes fontes, têm sido usadas em escala laboratorial para o tratamento de contaminantes aromáticos em meio líquido (KARAM e NICELL, 1997).

Segundo Durán (2004), no ano de 1983, dois grupos relataram a descoberta de uma enzima extracelular degradadora de lignina em culturas de *Phanerochaete chrysosporium*. A enzima, primeiramente chamada ligninase, é uma glicoproteína que contém ferro-protoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica. Estudos subseqüentes revelaram que esta enzima de *P. chrysosporium*, hoje chamada lignina peroxidase (LiP), apresenta múltiplas formas com ponto isoelétrico de 3,2 a 4,7 e massa molar de 38 a 43 kDa.

A lignina peroxidase (LiP), na presença de peróxido de hidrogênio, é capaz de degradar compostos fenólicos e não fenólicos. Também degrada anéis aromáticos alcoxilados do tipo da lignina, como também gera quebras de anéis em modelos da lignina diméricos como poliméricos e em cloroligninas (DURÁN, 2004).

A manganês peroxidase (MnP) é muito semelhante à lignina peroxidase (LiP). É extracelular, glicosilada, tem massa molar de 45-47 kDa e possui um grupo prostético heme (heme-proteínas). Entretanto, é dependente do peróxido do hidrogênio e do íon Mn^{+2} . Sabe-se, além disso, que os α -cetoácidos, como o lactato, estabilizam sua atividade oxidativa (DURÁN, 2004). Podem utilizar vários outros hidroperóxidos orgânicos como ácido peracético, ácido metacloroperoxibenzóico e ácido paranitro peroxibenzóico como aceptores de elétrons (ODIER e ARTAUD, 1992 *apud* KELLER, 2001).

2.5.2 Fenol oxidases

Lacases são fenol oxidases produzidas por fungos e por plantas e pertencem ao grupo de oxidases que complexam cobre. Essas enzimas são segregadas na maioria dos basidiomicetos e suas massas molares estão dentro da faixa de 60-100 kDa (DURÁN, 2004).

Diferentemente das peroxidases, as lacases não necessitam de peróxido de hidrogênio para oxidar o substrato. Em vez disso, o oxigênio molecular é o aceptor de elétrons, sendo reduzido até água. A enzima armazena quatro elétrons e não libera intermediários na rota oxidativa do oxigênio. Assim como as peroxidases, os radicais produzidos pela catálise com a lacase, sofrem várias polimerizações, clivagens e outras reações (KAWAI *et al.*, 1988 *apud* KELLER, 2001).

A lacase é capaz de diminuir a toxicidade de compostos fenólicos por meio do processo de polimerização. No entanto, em função da sua baixa especificidade, ela pode induzir o acoplamento cruzado de poluentes fenólicos com compostos fenólicos, que ocorrem naturalmente (KARAM e NICELL, 1997).

Os tratamentos enzimáticos com fenol oxidases apresentam maior potencialidade em relação aos métodos convencionais devido à sua aplicabilidade a materiais recalcitrantes, atuação em concentrações tanto elevadas quanto reduzidas dos contaminantes, atuação num amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, eliminação da etapa de aclimação de biomassa, fácil controle de processo e alta seletividade de degradação. Além disso, os processos são mais

rápidos, de maior confiança e mais simples de serem implementados (KARAM e NICELL, 1997).

No processo de clareamento da polpa, na indústria de papel e celulose, cerca de 5 a 8% de lignina modificada é liberada em efluentes com uma série de organoclorados e derivados. Este resíduo apresenta uma coloração marrom escura que inibe sistemas biológicos e constitui-se de grande quantidade de compostos clorados mutagênicos (KARAM e NICELL, 1997). Segundo Durán e Espósito (1997), tratamentos desses resíduos com fenol oxidases têm se mostrado eficientes na remoção desses compostos clorados.

Murugesan *et al.* (2006), produziram lacase por meio do cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* em biorreator com 5 L de volume útil. A síntese de lacase teve início após 2 dias de cultivo e atingiu seu máximo (5 U/mL) no 8º dia. Os autores observaram que a adição de 1 mM de xilidina promoveu o aumento da produção da enzima, que chegou a 14 U/mL em 8 dias. A síntese de MnP também foi monitorada e os níveis obtidos foram baixos (aproximadamente 0,4 U/mL após 10 dias) independentemente da adição de xilidina. A lacase foi isolada, purificada e testada para descoloração de três corantes “azo”. Os autores observaram que o processo de descoloração melhorou com o aumento da concentração de enzima, chegando a mais de 90% de descoloração após 24 horas de incubação dos corantes com 10 – 12 U/mL de lacase.

Zhang *et al.* (2008) estudaram a degradação de 2,4-DCP, 4-CP e 2-CP catalisada pela lacase. A enzima mostrou-se mais efetiva na oxidação do 2,4-DCP. Em 10 horas de processo enzimático, a eficiência de remoção de 2,4-DCP, 2-CP e 4-CP atingiu 94%, 75% e 69%, respectivamente. O pH ótimo para a atividade da lacase na degradação dos clorofenóis foi em

torno de 5,5. O aumento da concentração de lacase ou da temperatura resultou na melhoria do processo de biodegradação.

2.6 O gênero *Pleurotus* e suas aplicações

Segundo Garzillo *et al.* (1994), os fungos do gênero *Pleurotus* têm crescimento relativamente fácil proporcionado por seu sistema enzimático lignocelulolítico, que permite que ele seja cultivado em uma ampla variedade de resíduos agroindustriais e florestais que contêm celulose, hemicelulose e lignina, tais como palhas de cereais, polpa, serragem, entre outros. Além disso, esses fungos podem também ser cultivados em meio líquido, gerando biomassa micelial.

O gênero *Pleurotus* constitui um grupo cosmopolita de fungos com alto valor nutricional e propriedades terapêuticas (COHEN *et al.*, 2002). Além da aplicação direta como fonte de alimento de alto valor nutritivo (BONATTI *et al.*, 2004), os fungos deste gênero podem ser utilizados também em diferentes áreas, como por exemplo, na área farmacêutica, devido à sua capacidade antitumoral (WOLFF *et al.*, 2008) e na biorremediação de solos contaminados, na degradação de poluentes ambientais e no tratamento de efluentes industriais (MARQUEZ-ROCHA *et al.*, 2000).

Pleurotus sp. pode crescer em uma faixa de pH que varia de 5,0 a 8,0 (GO *et al.*, 1984; BUSWELL e CHANG, 1994; FURLAN *et al.*, 1997) e a temperatura ótima de cultivo está entre 30 e 35°C (OSO, 1977; BURLA *et al.*, 1992).

Muitas vias fermentativas são induzidas ou reprimidas pelo oxigênio dissolvido, que também pode afetar a composição da parede celular e, conseqüentemente, a flexibilidade das hifas (OLSVIK *et al.*, 1993, *apud* GERN, 2005). Wisbeck (2003) estudou a influência do coeficiente volumétrico inicial de transferência de oxigênio (K_{La} inicial = 15h^{-1} e K_{La} inicial = 27h^{-1}) sobre o crescimento de *Pleurotus ostreatus* em cultivo submerso, em meio POL (5,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L K_2HPO_4 , 2,0 g/L extrato de levedura, 1,0 g/L peptona, 1,0 g/L CaCO_3 , 20,0 g/L glicose, água destilada). Em pH inicial igual a 4,0, a autora obteve fatores de conversão de substrato em célula, iguais a 0,37 g/g e 0,34 g/g, para valores de K_{La} iniciais de 15h^{-1} e 27h^{-1} , respectivamente. Já em pH inicial igual a 6,0, não foi observado alteração no valor do fator de conversão, em função do K_{La} inicial, sendo igual a 0,30 g/g em ambas as condições (15h^{-1} e 27h^{-1}). Gern (2005), por sua vez, comparando dois diferentes valores de K_{La} inicial (10,2 e $19,3\text{h}^{-1}$) mostrou que o desempenho de *P. ostreatus* tanto em termos de produção de biomassa como produção de polissacarídeos é extremamente favorecido pelo K_{La} inicial de $10,2\text{h}^{-1}$ em meio contendo milhocina (água de maceração do milho) como fonte orgânica de nitrogênio e 40 g/L de glicose.

2.6.1 Fungos do gênero *Pleurotus* na degradação de compostos fenólicos

Fungos da degradação branca, como os do gênero *Pleurotus*, decompõem a lignina nativa da madeira, ligninas modificadas industrialmente, como a lignina Kraft e ligninas cloradas de alto massa molar do branqueamento da polpa (SOARES e DURAN, 2001). Vários estudos envolvendo fungos do gênero *Pleurotus* na biodegradação de compostos aromáticos de um modo geral (SANTOS, 1997) e fenóis-clorados especificamente (MUNARI *et al.*, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; SILVA, 2005) vêm sendo realizados.

Estudo feito por Santos (1997) demonstrou que a biodegradação de fenóis totais em efluentes produzidos na polpação e branqueamento da indústria de papel e celulose, com *Pleurotus ostreatoroseus*, proporcionou como resultado a remoção destes compostos em 99,9% após 96 horas. Nos experimentos de biodegradação foram utilizados biorreator com volume útil de 2 litros, concentração inicial de fenóis totais de 40,92 mg/L e fração de inóculo igual a 10% em volume.

A degradação de fenóis totais, assim como, a cinética de secreção de lacase e peroxidases, por *P. sajor-caju* foram estudadas por Munari *et al.* (2003), em cultivo submerso em frascos Erlenmeyer. Nos testes, foram utilizados efluentes da indústria de papel e celulose, totalizando 225 mg/L de fenóis totais. Observou-se que a atividade da lacase aumenta até o 7º dia de cultivo, onde atinge seu valor máximo (entre 200 e 270 U/mL pelo método ABTS). No 13º dia a atividade da enzima não foi mais detectada no meio. O pico de peroxidases ocorreu entre 7 e 9 dias de cultivo. A concentração de fenóis totais apresentou rápida queda até o 3º dia de cultivo, inclusive no controle abiótico, o que os autores atribuem à aeração dos meios. O cultivo foi conduzido por 20 dias, mas a partir do 13º dia, não houve mais redução na concentração de fenóis totais, que chegou a cerca de 50 mg/L nos meios inoculados (redução 58,9% maior que no controle abiótico).

Rodrigues *et al.* (2004) demonstraram que *Pleurotus pulmonarius* e *Pleurotus eryngii* foram capazes de biodegradar completamente 2,4-DCP, na concentração de 16mg/L, após 10 horas e 24 horas de cultivo, respectivamente.

Silva (2005) estudou a biodegradação do 2,4-DCP utilizando *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, visando posterior aplicação em processos de tratamento dos efluentes da indústria de papel e celulose. Os testes foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo meio de cultivo constituído de extrato de trigo acrescido de 30 mg/L de 2,4-DCP. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30 °C com agitação recíproca de 120min⁻¹, por 96 horas. Comparando-se o meio inoculado com *P. ostreatus* e o controle abiótico (sem inoculação do microrganismo), observou-se que em 96 horas de processo, 54,1% da degradação de 2,4-DCP pôde ser atribuída à presença de *P. ostreatus*, comprovando assim sua capacidade biodegradadora.

Cherubini *et al.* (2006) e Cherubini *et al.* (2007) avaliaram a capacidade de degradação de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP por *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de extrato de trigo acrescido de glicose nas concentrações 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L e de organoclorados nas concentrações de 5 mg/L, 17,5 mg/L e 30 mg/L. Os frascos foram inoculados com um disco de ágar contendo micélio fúngico e incubados a 30°C por 14 dias, em agitação recíproca. Os autores verificaram que as espécies *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* foram capazes de crescer em presença de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP. Mas, quando o 2,4,6-TCP foi utilizado, observaram uma ação inibitória sobre o crescimento do fungo.

3 METODOLOGIA

3.1 Microrganismos e manutenção

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 e *Pleurotus sajor-caju* CCB 019. Essas linhagens foram repicadas, em câmara de fluxo laminar, para placas de Petri, contendo meio TDA (trigo, dextrose e ágar). Para o preparo do meio TDA, grãos de trigo foram lavados em água corrente até que estivessem limpos sendo, então, acrescentada água destilada na proporção 1:2 (Kg de grãos : L de água). Após 10 minutos de fervura, a mistura foi filtrada em papel filtro e então adicionados 20g de dextrose e 15g de ágar por litro de meio resultante da filtração. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C, durante 20 minutos e, após resfriamento, transferido para as placas de Petri. As placas foram inoculadas com um disco de ágar de 15 mm de diâmetro, contendo micélio de *Pleurotus*, e incubadas em estufa microbiológica, à temperatura de 30°C. Após a colonização de toda a superfície do meio pelo micélio fúngico, as placas foram armazenadas em refrigerador a 4°C para uso posterior.

3.2 Ensaio realizados em frascos agitados

Estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa em Processos Biotecnológicos da Univille (CHERUBINI *et al.*, 2006; CHERUBINI *et al.*, 2007) comprovaram a capacidade de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* crescerem na presença de 2,4-DCP. Estes estudos

permitiram concluir também que a presença de 2,4,6-TCP inibiu fortemente o crescimento do fungo.

Paralelamente, Boyle (2006) estudou a mineralização de pentaclorofenóis (PCP) e clorofenóis relacionados e concluiu que, em decorrência do amplo espectro biocida dos PCP, que inibem o crescimento dos microrganismos capazes de degradá-los, é necessário um equilíbrio entre o crescimento do microrganismo (e portanto as enzimas em quantidades suficientes para degradar os compostos) e a presença destes compostos, para que haja uma remediação eficiente.

Desta forma decidiu-se conduzir os experimentos adicionando-se os compostos organoclorados ao meio de cultivo na fase de desaceleração do crescimento celular, pois a produção máxima de enzima ocorre entre o 3º e 6º dia, início da fase exponencial de crescimento.

3.2.1 Meio e condições de cultivo

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de volume total de 500 mL, contendo 100 mL de meio TD (trigo, dextrose). O meio TD foi preparado da mesma forma que o meio TDA (3.1), porém sem adição de ágar e com 10 g/L de dextrose. O meio TD foi distribuído nos frascos Erlenmeyer e esterilizado, conforme descrito no item 3.1.

Após o resfriamento do meio, dentro da câmara de fluxo laminar, os frascos Erlenmeyer foram inoculados com um disco de ágar de 15 mm de diâmetro contendo micélio fúngico da

região periférica da placa de Petri. Em seguida à inoculação, os frascos foram incubados a 30°C em incubadora New Brunswick Scientific série 25D, com agitação recíproca de 120 min⁻¹, por 21 dias. No 10º dia de cultivo, o organoclorado (2,4-DCP ou 2,4,6-TCP) foi adicionado na forma de pulso, a partir de uma solução mãe, de forma que a concentração de organoclorados no meio de cultivo fosse igual a 30 mg/L. A concentração testada destes compostos foi definida com base na concentração de fenóis totais (37 mg/L) presente no efluente da indústria de papel e celulose, segundo Bertazzoli e Pelegrini (2002), e também utilizada no trabalho de Silva (2005).

Para contornar o problema de insolubilidade do 2,4,6-TCP, este composto foi dissolvido em cerca de 50 mL de acetona e o volume completado para 500 mL com água destilada.

Os ensaios foram conduzidos em duplicata para cada microrganismo e substância organoclorada, sendo que para cada teste foram utilizados 8 frascos Erlenmeyer, de modo que o conteúdo completo de um frasco pudesse ser utilizado em cada amostragem. Os resultados são apresentados em termos de valores médios das repetições.

As amostras foram retiradas a cada 3 dias de cultivo. Uma alíquota do cultivo foi centrifugada e mantida sob refrigeração para posterior determinação do substrato (glicose) e do organoclorado. Para determinação da concentração micelial foi filtrado todo o volume restante dos frascos de Erlenmeyer conforme descrito no item 3.4.1.

3.3 Ensaios realizados em biorreator

3.3.1 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado em duplicata em frascos da marca Durán com saídas laterais de volume total de 1 litro cada, contendo 400 mL de meio TD preparado conforme descrito no item 3.2.1.

O meio TD foi esterilizado, conforme descrito no item 3.1 e, após resfriamento, em câmara de fluxo laminar, cada frasco foi inoculado com dois discos de ágar de 15mm de diâmetro contendo micélio de *P. ostreatus*. Os frascos foram incubados a 30°C em incubadora New Brunswick Scientific serie 25D, com agitação recíproca de 120 min⁻¹, por 7 a 8 dias. Decorrido este tempo, a cultura foi utilizada como inóculo para os ensaios em biorreator.

3.3.2 Meio e condições de cultivo

Os ensaios foram realizados em regime descontínuo, utilizando biorreator de mistura completa B. BRAUN (modelo BIOSTAT B), com cuba de vidro de capacidade total de 5L e volume de trabalho de 4L.

O preparo do biorreator envolveu a montagem da cuba de cultivo com os seguintes itens: eletrodos de temperatura, de pH e de oxigênio dissolvido, condensador, “loop” para retirada de amostra, ligado a bomba peristáltica, aspersor de ar e agitador. No ensaio realizado na ausência de luz, o biorreator foi envolto com papel alumínio impedindo a penetração de luz pelas laterais.

O pH inicial foi igual a 6,0 sendo este o pH natural do meio. Este parâmetro não foi controlado durante o processo, tendo sido apenas monitorado com o auxílio de um eletrodo de pH. A temperatura foi mantida constante em 30°C através da circulação de água pela camisa do biorreator. O K_{La} inicial de aproximadamente 15 h^{-1} (1º experimento $K_{La} = 15\text{ h}^{-1}$; 2º e 3º experimento $K_{La} = 13,4\text{ h}^{-1}$) foi obtido mantendo-se a aeração em 2 L/min e a agitação em 200 min^{-1} , e o K_{La} inicial de 82 h^{-1} foi obtido mantendo-se a aeração em 3 L/min e a agitação em 450 min^{-1} .

O meio de cultura foi preparado conforme descrito no item 3.2.1, sendo em seguida autoclavado a 121°C por 20 minutos. Depois de esterilizado aguardou-se o resfriamento do meio, para que o eletrodo de oxigênio fosse conectado ao biorreator para calibração.

Para a calibração do eletrodo de oxigênio, introduziu-se uma corrente de nitrogênio no meio de cultivo, até que todo o oxigênio fosse expulso. Isto foi verificado através da estabilização da leitura da concentração de oxigênio dissolvido em valores próximos a 0%. Neste momento definiu-se 0% de saturação de O_2 . A seguir, alterou-se a corrente, passando-se ar no sistema. No

momento da saturação do meio com ar, este valor foi definido como 100%. Este procedimento foi repetido por 3 vezes.

Após a calibração do eletrodo de O₂, o meio de cultivo foi inoculado com uma fração de inóculo de 10% (V/V), iniciando-se assim o cultivo, que durou em torno de 18 a 21 dias. No 6º dia de cultivo, na fase de desaceleração do crescimento, foi adicionado na forma de pulso o organoclorado ao meio de cultivo de modo que as concentrações no meio fossem iguais a 30 mg/L (15 mg/L de 2,4 diclorofenol e 15 mg/L de 2,4,6 triclorofenol) ou 225 mg/L (112,5 mg/L de 2,4 diclorofenol e 112,5 mg/L de 2,4,6 triclorofenol), conforme o experimento. Amostras de 30 mL do meio de cultivo foram retiradas a cada 3 dias, sendo 4 mL mantidos, após centrifugação para retirada do micélio, em tubos de Eppendorf para posterior determinação das concentrações de glicose e de organoclorados (após o pulso). O volume restante de cada amostra foi destinado à determinação da concentração de biomassa micelial, conforme descrito no item 3.4.1. No ensaio realizado na ausência de luz, após a adição dos organoclorados, as amostras foram retiradas em intervalos de 30 minutos até uma hora após o pulso, retornando em seguida a intervalos de 3 dias.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Concentração de biomassa micelial

Para determinação da concentração de biomassa micelial, cerca 26 mL (experimentos conduzidos em biorreator) ou cerca de 90 mL (experimentos conduzidos em frascos Erlenmeyer) foram filtrados em papel Whatmann nº. 1 (previamente seco por 24 h a 60°C e pesado), lavados com água destilada e colocados em estufa durante 48 horas a 60°C. Em seguida, foi realizada nova pesagem, descontada a massa do papel de filtro, e a massa de biomassa micelial foi relacionada ao volume inicial filtrado.

3.4.2 Concentração de Glicose

A concentração de glicose foi determinada pelo método DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico). As amostras foram diluídas adequadamente de forma que a concentração de substrato se situasse entre os valores da curva padrão, cujas concentrações variaram de 0 a 2 g/L de glicose. 0,5 mL da amostra devidamente diluída foi acrescentada de 0,5 mL de reagente DNS. Em seguida, a mistura foi aquecida a 100° C por 5 min., resfriada em banho de gelo e acrescida de 5 mL de água deionizada. O valor da absorbância foi lido a 540nm. A concentração de glicose foi determinada relacionando-se o valor da absorbância lida para cada amostra com a respectiva concentração na curva padrão.

3.4.3 Concentração de Organoclorados

A determinação das concentrações de 2,4 diclorofenol e 2,4,6 triclorofenol foi realizada utilizando-se o sistema de cromatografia gasosa – CG-System 6890 marca Agilent, equipado com um detector de ionização de chama (FID – hidrogênio e oxigênio). A coluna utilizada para a dosagem dos organoclorados foi de sílica fundida (Ø 0.53mm/30m) modelo Supercowax 10.

Utilizou-se o gás hélio como gás de arraste com fluxo constante de 3,5 mL/min. As temperaturas de injeção e detecção foram de 250°C, com temperatura da coluna aumentando em rampa, de 80°C a 200°C (20°C/min).

3.4.4 Atividade de lacase

A atividade de lacase foi determinada espectrofotometricamente do fluido extracelular do sobrenadante das culturas, segundo metodologia descrita por Buswell *et al.* 1995, usando 2,2 “-azino-bis-etilbenthiazolina” (ABTS) como substrato. Após centrifugação, 0,1 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), 0,1 mL da solução enzimática bruta foram adicionadas a 0,8 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v) incubados a temperatura de 30°C, por um minuto. Após esse intervalo de tempo foi feita a leitura em espectrofotômetro em 420 nm. A atividade enzimática foi expressa em UI/mL, onde uma UI = 1 μ M de substrato oxidado por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $3,6 \times 10^4$ mol/cm.

3.4.5 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La})

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) inicial foi determinado com base no método “gassing-out”, descrito por WISE, citado por SCHNEIDER (1996), que prevê a utilização de eletrodos com princípio polarográfico para medida da pressão parcial de oxigênio. Este método indireto, por ser realizado na ausência de células, tem como princípio, medir a absorção de oxigênio em solução.

Inicialmente, preencheu-se o reator com o meio de cultura e ajustou-se as condições de operação. Em seguida, reduziu-se a zero a concentração de oxigênio dissolvido no líquido pela passagem de nitrogênio. Neste momento, reiniciou-se a aeração do líquido e registrou-se a variação da concentração de oxigênio dissolvido em relação ao tempo.

A equação (1) descreve a variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo:

$$dC/dt = K_L a (C^* - C) \quad (1)$$

onde: C^* - concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L)

C – concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol/L)

Rearranjando e integrando a equação (1) no intervalo de $t=0$ a $t=t$, tem-se:

$$dC/(C^* - C) = K_L a \, dt \quad (2)$$

$$\ln(C^* - C) = -K_L a \, t \quad (3)$$

ou ainda:

$$\ln(1 - C/C^*) = -K_L a \, t \quad (4)$$

A equação (4) mantém uma correlação linear entre $\ln(1 - C/C^*)$ e o tempo, onde o coeficiente angular da reta fornece o valor de $K_L a$. No entanto, como a determinação da concentração de oxigênio na saturação é dificultada no meio de cultura devido à sua complexidade, definiu-se os seguintes limites de integração:

$$t=0; C=\alpha C^*$$

$$t=t; C=\beta C^*$$

Portanto:

$$\ln(C^* - \beta C^*) / (C^* - \alpha C^*) = -K_L a t \quad (5)$$

$$\ln(1 - \beta) / (1 - \alpha) = -K_L a t \quad (6)$$

onde α é 10% da concentração de saturação em oxigênio e β varia de 10 a 80% da concentração de saturação em oxigênio.

3.5 Avaliação da toxicidade do meio tratado (testes ecotoxicológicos)

3.5.1 Cultivo e manutenção do organismo teste (*Daphnia similis*)

a) Água de cultivo: os organismos foram cultivados em água reconstituída, com dureza total entre 40 e 48 mgCaCO₃/L e pH entre 7,2 e 7,6.

b) Substrato: como substrato para alimento da *Daphnia similis* foi utilizado a cultura de algas (*Selenastrum*) em fase exponencial de crescimento e ração para peixe solubilizada.

c) Condições de cultivo: o organismo foi cultivado em recipientes com capacidade de 3 a 4 L, com 2 a 2,5 L de água mole com cerca de 50 organismos com idade inferior a 24 horas. As culturas foram mantidas em incubadoras, a 20 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e com uma intensidade luminosa entre 500 a 1000 lux (luz fria). Os organismos foram manipulados com pipeta Pasteur de vidro, com ponta de aproximadamente 5 mm de diâmetro para evitar o stress e a mutilação dos organismos.

d) Teste de sobrevivência: antes de iniciar o teste, durante uma semana foi feita troca de água diariamente do meio e anotado a idade de cada cultura (em dias), o número de organismos adultos vivos e a porcentagem de sobrevivência. Assim que foi encontrada sobrevivência de organismos adultos acima de 80%, os jovens puderam ser utilizados nos ensaios, por serem considerados saudáveis.

3.5.2 Teste de toxicidade

O teste de toxicidade foi realizado segundo o Manual de Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos da CETESB (2008).

a) Teste preliminar: foram preparadas várias diluições do meio de cultivo (21 dias), largamente espaçadas (100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01%). Para cada concentração foram utilizadas duas réplicas, com cinco organismos em cada, num volume de 10mL. Ao final de 5 horas a temperatura de 20°C, efetuou-se a contagem dos organismos imóveis, estabelecendo-se o intervalo de concentração delimitado pela menor concentração que causa imobilidade a 100% dos organismos e a concentração mais elevada na qual não se observa imobilidade dos organismos.

b) Teste definitivo: com base no teste preliminar, definiu-se a faixa de concentração a ser testada. Partiu-se da concentração de 10%, finalizando com 0,15%, em diluições consecutivas de 1:2. Foram expostos 5 indivíduos jovens (entre 6 e 24 horas de idade) em cada amostra de meio de cultivo. O organismo-teste foi alimentado uma hora antes do início do teste com 0,02 mL de ração para peixe solubilizada.

Após 48 horas do início dos testes, nas mesmas condições do teste preliminar, efetuou-se a leitura e registrou-se o número de organismos imóveis em cada tubo. Procedeu-se as leituras do pH, temperatura da água, concentração de oxigênio dissolvido (com auxílio de um oxímetro marca Hanna, modelo Oxy-check) e condutividade (com auxílio de um condutímetro marca Tecnal, modelo Tec.4MP).

Aplicando os métodos estatísticos apropriados, no caso em questão o método Trimmed Spearman-Kärber, estimou-se a concentração da substância teste (meio de cultivo tratado) que causa efeito a 50% da população durante um período de 48h de exposição (CE50).

3.6 Métodos de cálculo

3.6.1 Fator de conversão global de substrato em biomassa (g/g)

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (7)$$

Onde:

- X_f é a concentração final de biomassa (g/L)
- X_o é a concentração inicial de biomassa (g/L)
- S_o é a concentração inicial de substrato (g/L)
- S_f é a concentração final de substrato (g/L)

3.6.2 Velocidade de crescimento micelial (g/L.dia)

$$\text{Velocidade global} \quad r_x = \frac{X_f - X_o}{t_f} \quad (8)$$

$$\text{Velocidade máxima} \quad r_{x'} = \frac{X_M - X_o}{t_{Mx}} \quad (9)$$

Onde:

- X_f é a concentração final de biomassa (g/L)
- X_o é a concentração inicial de biomassa (g/L)
- t_f é o tempo final do processo (dia)
- X_M é a concentração de biomassa no ponto em que a velocidade de crescimento micelial é máxima (g/L)
- t_{Mx} é o tempo no qual a velocidade de crescimento micelial é máxima (dia)

3.6.3 Velocidade de biodegradação (mg/L.dia)

$$V_{\text{deg 2,4 diclorofenol}} = \frac{[2,4 \text{ diclorofenol}]_o - [2,4 \text{ diclorofenol}]_f}{t_f} \quad (10)$$

$$V_{deg \text{ 2,4,6 tricolorofenol}} = \frac{[2,4,6 \text{ tricolorofenol}]_o - [2,4,6 \text{ tricolorofenol}]_f}{t_f} \quad (11)$$

Onde:

- $[2,4 \text{ diclorofenol}]_o$ é a concentração inicial de 2,4 diclorofenol (mg/L)
- $[2,4 \text{ diclorofenol}]_f$ é a concentração final de 2,4 diclorofenol (mg/L)
- $[2,4,6 \text{ tricolorofenol}]_o$ é a concentração inicial de 2,4,6 tricolorofenol (mg/L)
- $[2,4,6 \text{ diclorofenol}]_f$ é a concentração final de 2,4,6 tricolorofenol (mg/L)
- t_f é o tempo final do processo (dia)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Escolha do microrganismo

Os experimentos visando a escolha do microrganismo com maior potencial para degradação de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP foram realizados em frascos agitados.

4.1.1 Estudo da biodegradação de 2,4-DCP por *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*

Os perfis de crescimento micelial, consumo de glicose e degradação de 2,4-DCP por *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* estão representados nas figuras 2 e 3 respectivamente.

O crescimento micelial no 15º de cultivo atingiu sua concentração máxima, de 4,85 g/L para o microrganismo *P. ostreatus* e de 5,08 g/L para *P. sajor-caju*, com um fator de conversão global de substrato em biomassa de 0,51 e 0,53 g/g, respectivamente.

A adição de 2,4-DCP para uma concentração no meio de 30 mg/L foi realizada no 10º dia de cultivo, no final da fase de desaceleração do crescimento, sendo que a degradação deste organoclorado ocorreu em cerca de 5 dias de cultivo, para os dois microrganismos testados. Como as amostragens foram feitas a cada 2 ou 3 dias, não se pode afirmar com exatidão o tempo total de degradação do organoclorado.

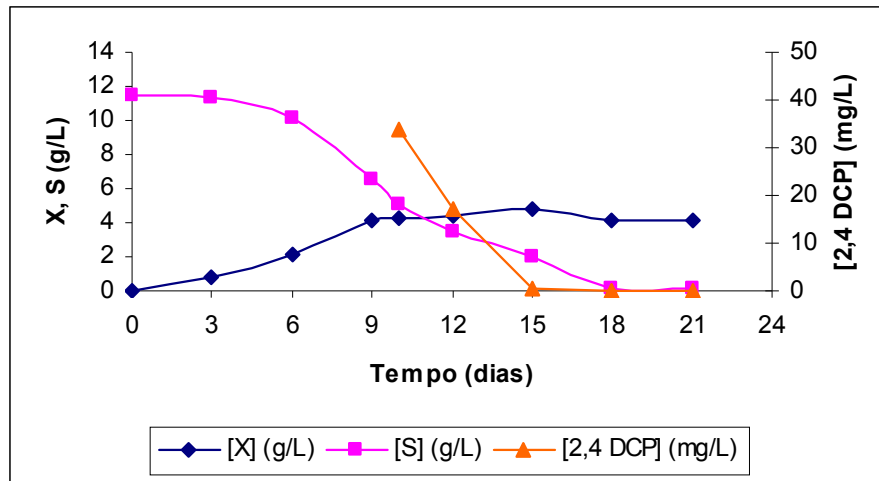


Figura 2: Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S) e degradação de 2,4-DCP por *P. ostreatus*, para as condições de 10g/L de glicose inicial e 30mg/L de 2,4-DCP adicionados no 10º dia de cultivo.

As velocidades de degradação de 2,4-DCP, calculadas entre o 10º e o 15º dia de cultivo, foram de 6,6 mg/L.dia e 7,0 mg/L.dia para *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*, respectivamente.

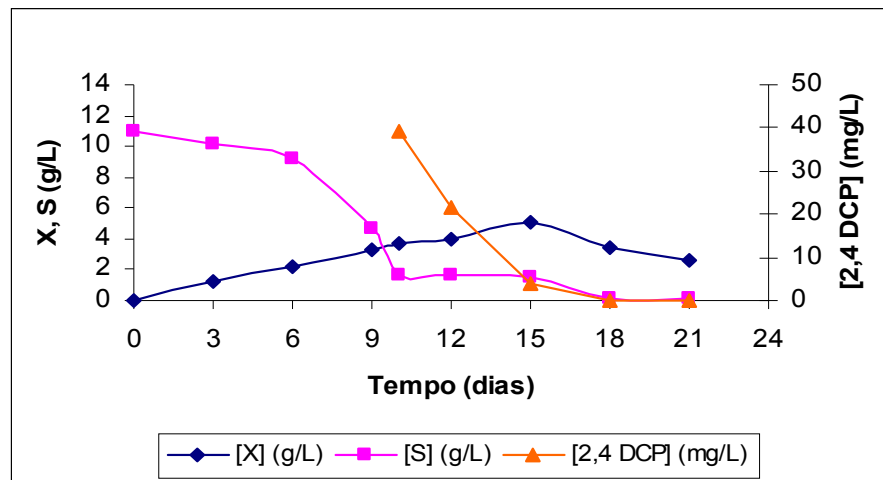


Figura 3: Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S) e degradação de 2,4-DCP por *P. sajor-caju*, para as condições de 10g/L de glicose inicial e 30mg/L de 2,4-DCP adicionados no 10º dia de cultivo.

Enquanto a adição de 2,4-DCP ao meio parece não ter grande influência no consumo de glicose por *P. ostreatus* (Figura 2), este organoclorado interrompeu imediatamente o consumo da glicose por *P. sajor-caju*, fazendo com que este substrato só voltasse a ser metabolizado quando a concentração do organoclorado encontrava-se próxima de zero (Figura 3).

4.1.2 Estudo da biodegradação de 2,4,6-TCP por *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*

O 2,4,6-TCP também foi adicionado ao meio no 10º dia de cultivo, para uma concentração inicial no meio de 30 mg/L, sendo observado que 92,5% do organoclorado foi degradado em 2 dias pelo microrganismo *P. ostreatus* (Figura 4). No caso do *P. sajor-caju* (Figura 5), apenas 73,1% de 2,4,6-TCP foram degradados em 5 dias.

O crescimento micelial atingiu valor máximo igual a 5,91 g/L de *P. ostreatus* e 5,09 g/L de *P. sajor-caju* no 10º dia de cultivo, com um fator de conversão global de substrato em biomassa de 0,53 e 0,50 g/g, respectivamente.

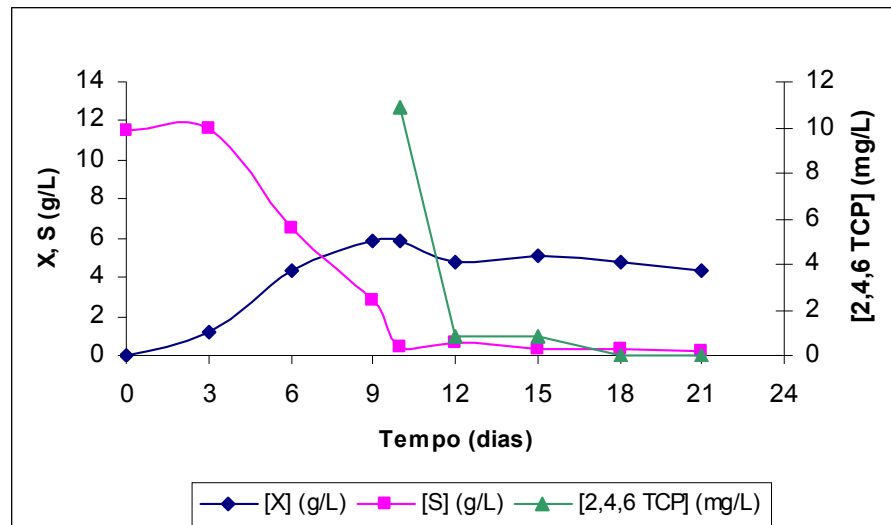


Figura 4: Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S) e degradação de 2,4,6-TCP por *P. ostreatus*, para as condições de 10g/L de glicose inicial e 30mg/L de 2,4,6-TCP adicionados no 10º dia de cultivo.

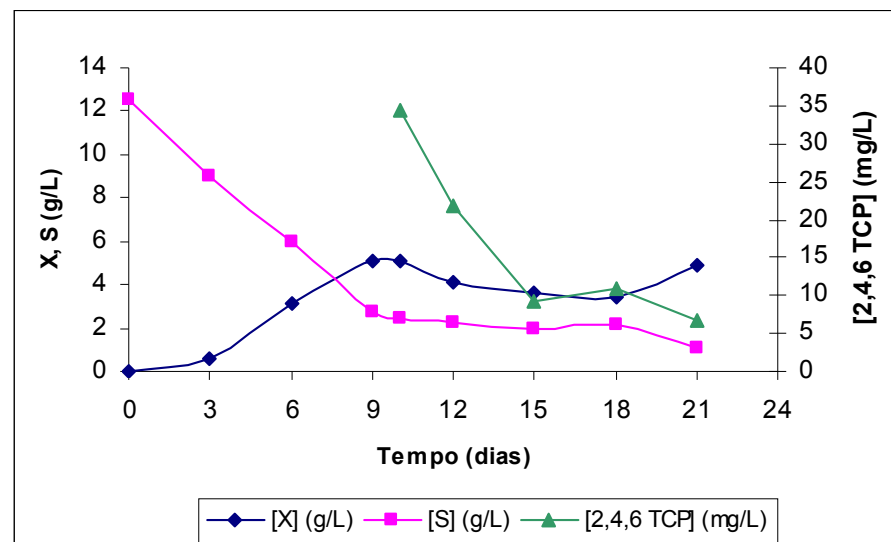


Figura 5: Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S) e degradação de 2,4,6-TCP por *P. sajor-caju*, para as condições de 10g/L de glicose inicial e 30mg/L de 2,4,6-TCP adicionados no 10º dia de cultivo.

Foi observada uma interrupção do crescimento de *P. sajor-caju* com a adição de 2,4,6-TCP. No caso do *P. ostreatus* não foi possível verificar eventual influencia do 2,4,6-TCP sobre o crescimento, uma vez que no momento do pulso, a glicose já havia sido esgotada. Na presença de 2,4-DCP, não foi observada interrupção do crescimento para ambos os microrganismos.

As tabelas 1 e 2 apresentam os percentuais de degradação de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP por *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*, respectivamente, em função do tempo.

Tabela 1 – Porcentagem de degradação dos organoclorados por *P. sajor-caju* em frascos agitados após o pulso

Tempo (dias)	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	
	2,4-DCP (%)	2,4,6-TCP (%)
0	0	0
2	44,7	36,55
5	89,4	73,1
8	100	68,47
11	100	80,61

Tabela 2 – Porcentagem de degradação dos organoclorados por *P. ostreatus* em frascos agitados após o pulso

Tempo (dias)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	
	2,4-DCP	2,4,6-TCP*
0	0	0
2	49,07	92,54
5	98,16	92,64
8	100	100
11	100	100

*A concentração inicial de 2,4,6-TCP detectada no meio foi de aproximadamente 30% da esperada.

Pode-se observar na tabela 1 que 8 dias após o pulso, o 2,4-DCP já havia sido totalmente degradado enquanto 31,53% do 2,4,6-TCP ainda não havia sido degradado. Com 11 dias de cultivo após a adição do 2,4,6-TCP, 19,39% do organoclorado permaneciam sem sofrer degradação, confirmando o caráter mais tóxico e recalcitrante deste poluente, sobre o *P. sajor-caju*.

Analizando o percentual de degradação dos organoclorados por *P. ostreatus* na tabela 2, observa-se que em 5 dias, após a adição de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP, apenas 1,84 e 7,36% respectivamente permaneciam no meio de cultivo sem sofrer degradação. Em 8 dias, ambos haviam sido totalmente degradados. A rápida degradação do 2,4,6-TCP pode ser atribuída ao fato de ter havido uma redução na sua concentração inicial medida, após a adição do organoclorado no meio de cultivo, pois apenas 10,86 mg/L foram detectados, enquanto esperava-se 30 mg/L.

Jiang *et al.* (2007) e Wang *et al.* (2008), avaliando a degradação de fenol e 4-CP por *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, respectivamente, observaram que baixas concentrações de fenol são suficientes para suprir as necessidades de carbono e energia dos microrganismos e, portanto aceleram a assimilação de 4-CP. Supõe-se, por analogia, que a baixa concentração inicial de 2,4,6-TCP observada no cultivo de *P. ostreatus* foi responsável por sua mais rápida degradação, quando comparada àquela observada para *P. sajor-caju*.

Santos (1997) cultivou *Pleurotus ostreatoroseus* em efluente obtido na etapa de polpação e branqueamento da indústria de papel e celulose e obteve 99,9% de remoção de fenóis totais em 96 horas.

Rodrigues *et al.* (2004) cultivaram *Pleurotus pulmonarius* e *Pleurotus eryngii* na presença de 2,4-DCP (16 mg/L) e observaram que 100% do composto foi biodegradado em 10 horas e 24 horas respectivamente, tempos muito inferiores aos observados neste trabalho, mesmo considerando as diferentes concentrações iniciais de 2,4-DCP.

Silva (2005), no cultivo de *Pleurotus ostreatus*, na presença de 23,68 mg/L de 2,4-DCP, observou uma redução na concentração deste organoclorado da ordem de 74% em 96 horas.

4.2 Biodegradação em escala ampliada

Com base nos resultados obtidos em 4.1 e nos resultados do grupo de pesquisa (CHERUBINI *et al.*, 2006; CHERUBINI *et al.*, 2007), que apontaram *P. ostreatus* como o microrganismo que apresentou melhor crescimento celular e maior eficiência na degradação dos organoclorados, este foi utilizado para dar continuidade aos ensaios.

4.2.1 Estudo da influência da transferência de oxigênio

Com o objetivo de investigar a influência da transferência de oxigênio sobre o consumo de glicose, o crescimento micelial e a biodegradação de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP, experimentos foram realizados em biorreator com adição de 30mg/L destes organoclorados (15mg/L de 2,4-DCP e 15mg/L de 2,4,6-TCP) em condições de baixo e elevado coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio. As cinéticas de crescimento micelial e consumo de glicose em valores de K_{La} iguais a 82 h^{-1} e 15 h^{-1} são apresentados nas figuras 6 e 7 respectivamente. No entanto, os

organoclorados não foram detectados no meio de cultivo, em amostras coletadas poucos minutos após sua adição ao meio.

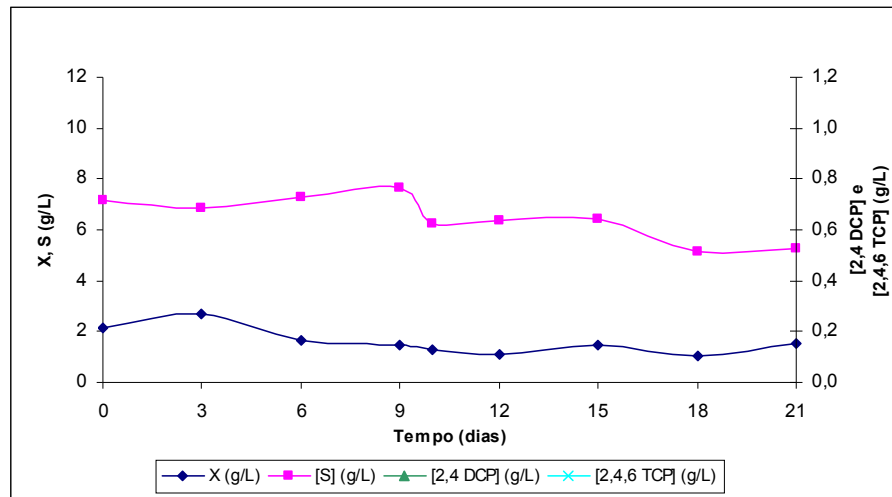


Figura 6: Crescimento micelial (X) e consumo de glicose (S) por *P. ostreatus*, para as condições de 10g/L de glicose inicial e adição de 30mg/L de 2,4 DCP + 2,4,6 TCP no 10º dia de cultivo, com K_L inicial de 82 h^{-1} .

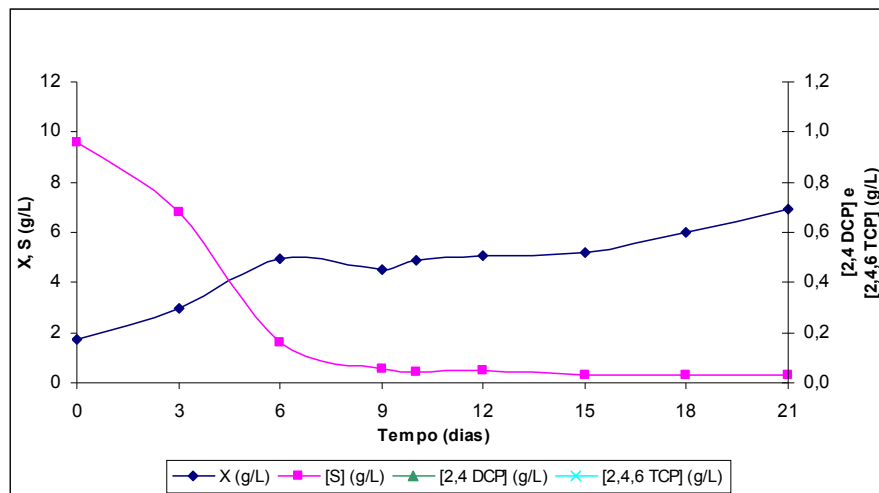


Figura 7: Crescimento micelial (X) e consumo de glicose (S) por *P. ostreatus*, para as condições de 10g/L de glicose inicial e adição de 30mg/L de 2,4 DCP + 2,4,6 TCP no 10º dia de cultivo, com K_L inicial de 15 h^{-1} .

Como pode ser observado na figura 6, a condição de elevada oxigenação ($K_{La} = 82 \text{ h}^{-1}$) não se mostrou favorável ao crescimento de *P. ostreatus*. Já a condição de baixa oxigenação ($K_{La} = 15 \text{ h}^{-1}$) figura 7, levou ao esgotamento da glicose em cerca de 9 dias de cultivo. Considerando que o pulso de organoclorados foi feito no 6º dia de cultivo, o fator de conversão global de substrato em biomassa foi determinado para este tempo, ou seja, antes do efeito inibitório dos organoclorados e resultou em 0,40 g/g, para uma concentração micelial de 4,96 g/L. O fator de conversão obtido neste trabalho foi superior ao observado por Wisbeck (2003) ($Y_{X/S} = 0,30 \text{ g/g}$), utilizando o mesmo microrganismo e o mesmo valor de K_{La} em meio POL, com pH igual a 6.

Gern (2005), visando o crescimento celular e a produção de polissacarídeos pelo mesmo fungo, comparou os valores de K_{La} inicial de $10,2 \text{ h}^{-1}$ e $19,2 \text{ h}^{-1}$ e definiu $K_{La} = 10,2 \text{ h}^{-1}$ como o melhor K_{La} tendo milhocina e glicose como fonte de nitrogênio e fonte de carbono respectivamente. Nessa condição, a concentração micelial obtida pela autora foi de 27,72 g/L, com um fator de conversão global de substrato em biomassa de 1,18 g/g.

Os resultados obtidos neste trabalho vão ao encontro do observado por Gern (2005), mostrando que baixos valores de coeficiente de transferência de oxigênio no cultivo de *Pleurotus* apresentam maior eficiência, pois diminuem o cisalhamento, que leva ao rompimento do micélio.

4.2.2 Ensaios realizados em biorreator com concentração de 225 mg/L de organoclorados

Analisando os resultados obtidos nos experimentos apresentados em 4.2.1, onde não foi detectado 2,4-DCP e 2,4,6-TCP no meio, decidiu-se aumentar a concentração dos organoclorados. Considerando que Munari *et al.* (2003), visando reduzir o nível de fenóis totais

em efluentes da indústria de papel e celulose, realizaram o cultivo submerso do fungo *P. sajor-caju* em uma concentração de fenóis totais de 225mg/L, decidiu-se realizar um novo experimento utilizando esta concentração.

Foi feito, então, outro teste nas mesmas condições do experimento descrito no item 4.2.1 para K_{La} inicial = 15 h^{-1} , porém com 112,5mg/L de 2,4-DCP + 112,5mg/L de 2,4,6-TCP. Nesse caso, o valor obtido para o K_{La} inicial foi de $13,4\text{ h}^{-1}$. A adição dos organoclorados foi realizada no final da fase de desaceleração do crescimento, no 6º dia de cultivo, conforme pode ser observado na figura 8.

Neste experimento, a atividade de lacase, uma das principais fenoloxidasas relacionadas à degradação de compostos fenólicos, foi também avaliada.

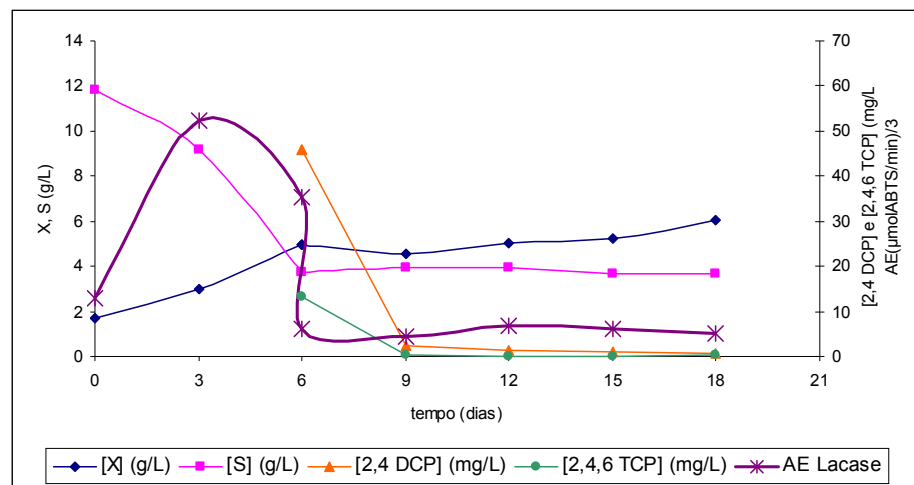


Figura 8: Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S), degradação de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP e atividade da lacase no cultivo de *P. ostreatus*, para as condições de 10g/L de glicose inicial e adição de 225mg/L de 2,4-DCP + 2,4,6-TCP no 6º dia de cultivo, com K_{La} inicial de $13,4\text{ h}^{-1}$.

Como pode ser observado na figura 8, foram detectados imediatamente após o pulso, apenas 45,98mg/L de 2,4-DCP e 13,28mg/L de 2,4,6-TCP, ou seja, aproximadamente 40% e 10% respectivamente, em relação às concentrações preparadas, que haviam sido iguais a 112,5 mg/L para cada composto. Silva (2005) também encontrou em seus experimentos no tempo zero de processo aproximadamente 40% da concentração preparada de 2,4-DCP, que havia sido igual a 30 mg/L. A autora sugeriu a possibilidade de ter havido a oxidação dos organoclorados em função da oxigenação do meio, que foi maior em biorreator do que em frascos Erlenmeyer. Segundo Leyva *et al.* (2003), além da via microbiológica, os clorofenóis podem ser oxidados por via química e fotoquímica, o que poderia explicar esta rápida degradação, nos minutos posteriores ao pulso e que antecede a primeira amostragem.

A figura 8 mostra que, três dias após o pulso, as concentrações de 2,4-DCP e de 2,4,6-TCP já eram muito próximas de zero. Nos experimentos realizados por Munari *et al.* (2003), os índices de fenóis totais também mostraram rápida queda até o 3º dia, inclusive nos controles abióticos. Segundo os autores, a redução de fenóis totais nos controles abióticos pode ter ocorrido devido à aeração do meio.

O tempo de degradação observado na figura 8 (72 horas) foi inferior ao encontrado por Santos (1997) e Silva (2005), que foi de 96 horas.

Mais uma vez, foi verificado que tanto o consumo de glicose quanto o crescimento micelial foram imediatamente inibidos pela adição dos organoclorados. Valli e Gold (1991) e Boyle (2006) embora não relatem a inibição do consumo de glicose mediante a presença de

organoclorados, observaram uma inibição no crescimento dos organismos, o que os levou a adicionar os organoclorados após crescimento micelial.

Como pode ser observado no perfil da curva obtida para atividade enzimática (Figura 8), o pico da lacase ocorreu entre 3 e 6 dias de cultivo. Neste experimento, o valor obtido no terceiro dia foi igual a 157,2 U/mL. A partir do momento em que foi dado o pulso de organoclorados, a atividade da enzima caiu a valores muito próximos de zero, ao mesmo tempo em que a concentração dos organoclorados também diminuiu, podendo, portanto, a lacase ser responsável pela biodegradação. Murugesan *et al.* (2006) observaram que a produção de lacase por *P. sajor-caju* inicia após 2 dias de cultivo e atinge seu valor máximo (5 U/mL) no 8º dia. Já Munari *et al.* (2003) observaram que a atividade da lacase aumenta até o 7º dia de cultivo, onde atinge seu valor máximo (entre 200 e 270 U/mL), e no 13º dia a atividade da enzima não foi mais detectada no meio.

Com o objetivo de verificar a possibilidade de estar ocorrendo uma degradação de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP independente da atividade biológica, decidiu-se verificar a existência de degradação fotoquímica.

4.3 Degradação fotoquímica

A fim de verificar a existência de uma eventual degradação fotoquímica dos organoclorados, foi realizado um experimento nas mesmas condições do experimento descrito no item 4.2.2, porém na ausência de luz, cuja cinética é apresentada na figura 9.

Devido à rápida queda da concentração dos organoclorados logo após sua adição ao meio, observada nos experimentos anteriores, neste experimento as concentrações de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP foram monitoradas em espaços de tempo menores.

Conforme observado no cultivo realizado na presença de luz, a atividade de lacase também caiu à zero após o pulso dos organoclorados, ao mesmo tempo em que a concentração dos organoclorados diminui.

Observa-se que na primeira hora de cultivo, após o pulso, houve redução de 25,2% e 45,0% nas concentrações de 2,4-DCP e de 2,4,6-TCP, respectivamente. Três dias após o pulso, o percentual de redução do 2,4-DCP foi de 65,2% e do 2,4,6-TCP foi de 82,7%, enquanto que no ensaio realizado na presença de luz (figura 8) ocorreu uma redução de 95% para o 2,4-DCP e de 97,5% para o 2,4,6-TCP no período de 3 dias após o pulso. Embora ocorra a redução dos organoclorados na ausência de luz, essa degradação mostrou-se mais lenta quando comparada com os experimentos realizados na presença de luz.

Este fenômeno poderia ser atribuído à oxidação fotoquímica. Conforme discutido anteriormente, Silva (2005) observou que em 96 horas de processo, a redução da concentração de 2,4-DCP chegou a 20,2% no meio controle abiótico e a 74,3% no meio inoculado, ambos na presença de luz.

Bertazzoli e Pelegrini (2002) aplicaram o processo fotoeletroquímico em escala piloto sobre os efluentes da indústria têxtil e de papel e celulose. Os autores observaram uma redução de fenóis totais de 80% na primeira hora de tratamento do efluente, evidenciando a grande

capacidade do processo fotoeletroquímico para abertura dos anéis benzênicos, sugerindo que este processo pode ser empregado como pré-tratamento de efluentes contendo elevados teores de poluentes recalcitrantes, pois contribui de maneira acentuada para a biodegradabilidade destes compostos.

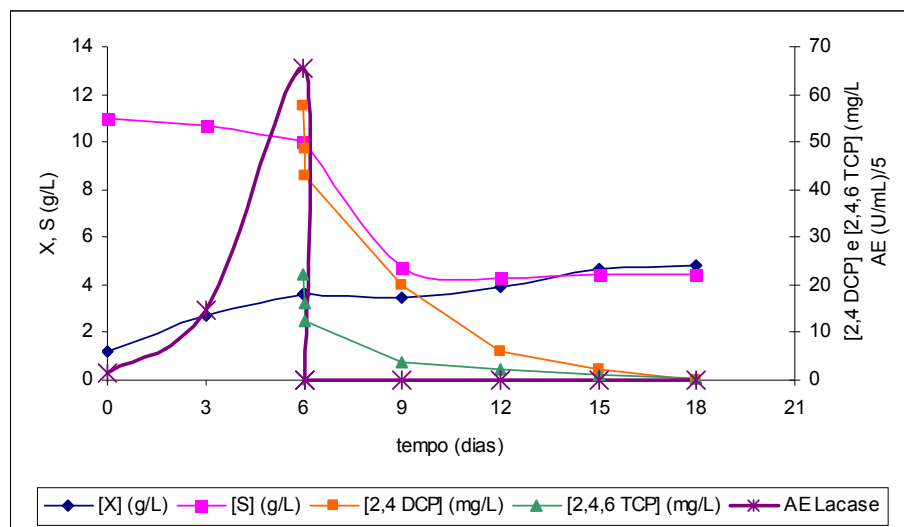


Figura 9: Crescimento micelial (X), consumo de glicose (S), degradação de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP e atividade da lacase no cultivo de *P. ostreatus*, para as condições de 10g/L de glicose inicial e adição de 225mg/L de 2,4-DCP + 2,4,6-TCP no 6º dia de cultivo, com K_{La} inicial de $13,4 \text{ h}^{-1}$, na ausência de luz.

Moraes *et al.* (2006) observaram que o processo fotocatalítico quando usado como pré-tratamento para o processo biológico, apresentou o melhor resultado, com aumento de 45% da mineralização do efluente Kraft quando comparado ao processo biológico isolado.

4.4 Toxicidade do meio tratado

O teste preliminar indicou o intervalo entre 10% e 0,1% de meio (controle ou tratado) para realização do teste definitivo. Como pode ser observada na tabela 3, a escolha das

concentrações para realização do teste definitivo foi baseada no número de organismos imóveis. O intervalo foi estabelecido pela menor concentração que causou imobilidade a 100% dos organismos e a concentração mais elevada na qual não se observa imobilidade dos organismos.

Tabela 3 – Resultados do teste (definitivo) de toxicidade com meio de cultivo (controle) e com meio de cultivo tratado

Meio de cultivo (controle)*			Meio tratado**		
Concentração de meio	Nº. de indivíduos imóveis	% de imobilidade	Concentração de meio	Nº. de indivíduos imóveis	% de imobilidade
10%	20	100	10%	20	100
6,25%	9	45	6,25%	19	95
3,125%	6	30	3,125%	8	40
1,25%	0	0	1,25%	7	35
1%	0	0	1%	7	35
0,6%	0	0	0,6%	0	0
0,3%	0	0	0,3%	0	0
0,15%	0	0	0,15%	0	0

*Meio sem a presença de *Pleurotus* e organoclorados

**Meio de cultivo após crescimento de *Pleurotus* com adição de organoclorados.

Os ensaios mostraram que, tanto para o meio controle quanto para o meio fermentado, concentrações acima de 10% do meio levaram a imobilidade de 100% dos indivíduos e concentrações abaixo de 0,1% não causaram inibição.

Diminuindo o intervalo das concentrações (teste definitivo), observou-se que, para o meio controle, concentrações abaixo de 1,25% não apresentaram nenhum efeito tóxico. Para o meio fermentado este valor cai para 0,6%.

Aplicando-se o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber, obteve-se uma CE 50 para o meio tratado igual a 3,225% enquanto que para o meio controle o valor obtido foi igual a 7,125%. Isto mostra que, embora os testes analíticos mostrem o desaparecimento dos organoclorados no meio de cultivo, o meio ainda apresenta toxicidade para os organismos.

CONCLUSÕES

- ✓ *P. ostreatus* mostrou-se mais eficiente que *P. sajor-caju*, tendo degradado praticamente todo o 2,4-DCP em 5 dias e todo 2,4,6-TCP em 8 dias, enquanto *P. sajor-caju* precisou de 8 dias para degradar todo o 2,4-DCP e em 11 dias havia degradado cerca de 80% do 2,4,6-TCP em frascos agitados;
- ✓ O 2,4,6-TCP na concentração de 30 mg/L inibiu tanto o consumo de glicose quanto o crescimento micelial de *P. sajor-caju*, assim como o crescimento micelial de *P. ostreatus* nos ensaios conduzidos em frascos agitados;
- ✓ O 2,4-DCP na concentração de 30 mg/L inibiu o consumo de glicose por *P. sajor-caju*, mas não influenciou o crescimento deste microrganismo, assim como o crescimento e o consumo de glicose por *P. ostreatus* nos ensaios conduzidos em frascos agitados;
- ✓ Elevado valor de K_La inicial (82 h^{-1}), em meio contendo 15mg/L de 2,4-DCP e 15mg/L de 2,4,6-TCP não promoveu a degradação da glicose nem o crescimento micelial, provavelmente devido ao elevado cisalhamento que pode ter rompido o micélio;
- ✓ Baixo valor de K_La inicial (15 h^{-1}), em meio contendo 15mg/L de 2,4-DCP e 15mg/L de 2,4,6-TCP levou ao esgotamento da glicose em cerca de 9 dias, chegando-se a $Y_{X/S} = 0,4\text{ g/g}$. Não foi detectado organoclorado na 1ª amostragem após ao pulso;
- ✓ Em cultivo realizado em biorreator com K_La inicial = $13,4\text{ h}^{-1}$ e concentrações iniciais de 112,5 mg/L de 2,4-DCP e 112,5 mg/L de 2,4,6-TCP, apenas cerca de 40% do primeiro composto e 10% do segundo foram detectados no meio, minutos após o pulso. Esta degradação pode ser atribuída a uma possível oxidação fotoquímica, devido à presença de luz, à aeração e à agitação do meio;

- ✓ Praticamente 100% do 2,4-DCP e do 2,4,6-TCP foram degradados em 3 dias após o pulso de 112,5 mg/L de cada composto em cultivo de *P. ostreatus* em $K_{La} = 13,4 \text{ h}^{-1}$;
- ✓ A atividade de lacase máxima obtida (157,2 U/mL) a partir dos pontos amostrados ocorreu no 3º dia de cultivo de *P.ostreatus* em $K_{La} = 13,4 \text{ h}^{-1}$ e caiu a valores muito próximos de zero imediatamente após o pulso dos organoclorados (após o 6º dia);
- ✓ Experimento realizado na ausência de luz mostrou que a degradação dos organoclorados foi mais lenta do que na presença de luz. Na presença de luz, a degradação do 2,4-DCP e do 2,4,6-TCP, após 3 dias, foi 45,7% e 17,9% superior, respectivamente, àquela observada no mesmo período na ausência de luz. Os resultados confirmam a capacidade de *Pleurotus ostreatus* em degradar os compostos fenólicos testados, porém a associação da oxidação fotoquímica com a ação do fungo torna o processo mais eficiente.
- ✓ Nos testes de toxicidade os meios provenientes do cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando a glicose como substrato e na presença do 2,4-DCP e 2,4,6-TCP, apresentaram efeito tóxico na concentração de 3,225%, mostrando que, embora os testes analíticos apresentem um consumo dos organoclorados pelo fungo, o meio ainda apresenta toxicidade para os organismos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Investigar a provável reação inicial de oxidação do 2,4-DCP e do 2,4,6-TCP, devido a agitação e aeração do meio;
- ✓ Aprofundar os estudos sobre a atividade das enzimas envolvidas no processo de biodegradação dos organoclorados;
- ✓ Testar este microrganismo diretamente no efluente da indústria de papel e celulose;
- ✓ Estudar o desempenho dos processos combinados biológico e fotoquímico;
- ✓ Aprofundar os testes de toxicidade nos meios provenientes dos processos de biorremediação de organoclorados.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 818-824, 2004.

ARAÚJO, R. P. A, WERNER, L. I. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. Companhia de Tecnologias de Saneamento Ambiental (CETESB). Editoração gráfica: Rita de Cássia Guimarães, 2005.

AZEVEDO, F. A, CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicidade**. São Carlos. Ed. Rima, São Paulo, 2003.

BARROS, M. J.; NOZAKI, J. Redução de Poluentes de Efluentes das Indústrias de Papel e Celulose pela Floculação/Coagulação e Degradação Fotoquímica. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 736-740, 2002.

BENTO, A. P.; HOFFMANN, H. **Microbiologia e Ecologia de Sistemas Aeróbios de Tratamento de Esgotos**. In: Willibaldo Schimidell; Hugo Moreira Soares; Claudia Etchebehere; Rodolfo Javier Menes; Nora Cristina Bertola; Edgar do Martin Contreras. (Org). Tratamento Biológico de Águas Residuárias. Florianópolis: Tribo da Ilha, v.1, p.21-720, 2007.

BERTAZZOLI, R.; PELEGRINI, R. Descoloração de poluentes orgânicos em soluções aquosas através do processo fotoeletroquímico. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 477-482, 2002.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M.; FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. Food chemistry 88, p. 425-428, 2004.

BOYLE, D. **Effects of pH and cyclodextrins on pentachlorophenol degradation (mineralization) by white rot fungi**. *Journal of Environmental Manag*, pp.380-386, 2006.

BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel – Brasil. **Sector de Celulose e Papel**. São Paulo, 2009.

BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel – Brasil. **Desempenho do Setor em 2006 e projeção para 2007**. São Paulo, 2007.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. Ed. CETESB, p. 299-304, São Paulo, 1993.

BURLA, G., GARZILLO, A. M., LUNA, M., CARDELLI, L. E., SCHIESSER, A. **Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture**. Bioresource Technology, v.42, pp 89-94, 1992.

BUSWELL, J. A., CHANG, S. T. **Biomass and extracellular hydrolytic enzyme production by six mushroom species grow on soybean waste**. Biothechnology Letters, v.16, n.12, pp.1317-1322, 1994.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS Microbiology Letters, v.128, p.81-88, 1995.

CETESB – **Manual de Produtos Químicos Perigosos**: Ficha de Informação de Produto Químico. Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=2,4. Acesso em 01/05/2008.

CHERUBINI, C. C., SCHNEIDER, A. L., FURLAN, S. A., WAGNER, T. M., APATTI, G. **Avaliação da capacidade de degradação de 2,4 diclorofenol por *Pleurotus***. 58º Reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Anais, 2006.

CHERUBINI, C. C., SCHNEIDER, A. L., FURLAN, S. A., WAGNER, T. M. **Avaliação da capacidade de degradação de 2,4 diclorofenol e 2,4,6 Triclorofenol por *Pleurotus***. 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Anais, 2007.

CHOI, J. H., KIM, Y. H., CHOI, S.J. **Reductive dechlorination and biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol using sequential permeable reactive barriers: Laboratory studies**. Chemosphere, 67(8), pp.1551-1557, 2007.

COHEN R.; PERSKY L.; HADAR Y. Biotechnological applications and potencial of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.58, p. 582-594, 2002.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005.

CUPPLES, A. M.; SIMS, G. K. **Identification of in situ 2,4 dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil microorganisms using DNA-stable isotope probing.** Soil Biology & Biochemistry 39 (1): 232-238, 2007.

DANTAS, R. F., CONTRERAS, S., SANS, C., ESPLUGAS, S. **Abatement of 4-chlorophenol in aqueous phase by ozonation coupled with a sequencing batch biofilm reactor (SBBR).** Ozone: Science and Engineering, 30(6), pp.447-455, 2008.

DURÁN, N. **Enzimas ligninolíticas.** In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L.. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Editora Educs. São Paulo, p. 245-259, 2004.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. **Biodegradação de Lignina e Tratamento de Efluentes por fungos ligninolíticos.** In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, p. 269-292, 1997.

FERRAZ, A. **Aplicação da Biotecnologia na produção de Papel e Celulose.** In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial – Processos fermentativos e enzimáticos. Vol. 3 – Ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 2001.

FREIRE, R. S., PELEGRINI, R., KUBOTA, L. T., DURAN, N. **Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas.** Química Nova, v. 23, n. 4, p.504-511, 2000.

FURLAN, S. A.; VIRMOND, L.J.; MIERS, D. A.; BONATTI, M.; GERN, R. M. M., JONAS, R.. **Mushroom strains able to grow at high temperature and low pH values.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.13. p. 689-692 1997.

GARG, S. K.; MODI, D. R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.19, p. 85-112, 1999.

GARZILLO, A. M. V.; DI PAOLO, S.; RUZZI, M.; BUONOCORE, V. Hydrolytic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 476-481, 1994.

GERN, R. M. M. **Produção de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso.** Tese de Doutorado. UFSC. Florianópolis, 2005.

GO, S. J., YOU, C. H., PARK, Y. H. **Effect of temperature pH, carbon and nitrogen nutrition on mycelial growth of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing and *Pleurotus ostreatus* (Fr.) quel.** Korean Journal of Mycology, v.12, n.1 pp. 15-20, 1984.

GUAGLIONONI, L. G., PIRES, E. C. **Compostos organoclorados em efluentes da indústria de papel e celulose degradam anaerobicamente?.** 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, pp.569-580, 1997.

GUTIERREZ, J. P. R. **Estudo do Sistema Lignolítico do Ascomiceto *Chrysonilia sitophila*.** Instituto Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

HERRERA, Y., OKOH, A.I., ALVAREZ, L., ROBLEDO, N., TREJO-HERNÁNDEZ, M.R. **Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by a *Bacillus* consortium.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24 (1), pp.55-60, 2008.

HESS, D. S.; SILVA, L. A.; FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M. Avaliação da produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 cultivado em meio contendo lipídeos. In: **Revista Saúde e Ambiente/ Health na Environment Journal**, Joinville, v.7, n.2, p. 21-26, 2006.

INTERNATIONAL CHEMICAL SAFETY CARDS. **Fichas internacionales de seguridad química – 2,4,6 Triclorofenol.** Disponível em <http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/nspn1122.htm>. Acesso em 01/05/2008.

JIANG, Y., WEN, J., LAN, L., HU, Z. **Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by the yeast *Candida tropicalis*.** Biodegradation, 18(6), pp.719-729, 2007.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005

KARAM, J., NICELL, J. A. **Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment.** Journal of chemical technology and biotechnology, vol.69, nº2, p.141-153, 1997.

KARGI, F., KONYA, I. **Para-chlorophenol containing synthetic wastewater treatment in an activated sludge unit: Effects of hydraulic residence time.** Journal of Environmental Management, 84(1), pp. 20-26, 2007.

KASTANEK, F., MALETEROVA, Y., KASTANEK, P. **Combination of advanced oxidation and/or reductive dehalogenation and biodegradation for the decontamination of waters contaminated with chlorinated organic compounds.** Separation Science and Technology, 42(7), pp. 1613-1625, 2007.

KELLER, A. **Enzimas Lignocelulolíticas durante o desenvolvimento de *Pleurotus ssp* em serragem de *Eucalyptus sp.*** Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2001

LEE, C. Y, LEE, Y. P. **Degradation of 4-chlorophenol by enriched mixed cultures utilizing phenol and glucose as added growth substrate.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(3), pp.383-391, 2007.

LEYVA, E.; CRISPIN, I.; MOCTEZUMA, E.; LEYVA, S.. **Selective chemical oxidation or reduction of chlorophenols with potassium nitridisulfonate.** Organic Chemistry in México, 2003.

MARQUEZ-ROCHA, F. J., RODRIGUEZ, V. Z. H., DUHALT, R. V. **Bioderadation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by White-rot fungus *Pleurotus ostreatus*.** Biotechnology Letters, v.22, 2000.

MONTEBELLO, A. E. S.; BACHA C. J. C. Estrutura de mercado e desempenho da indústria brasileira de celulose: período de 1980 a 2005. **Pesquisa & Debate**, São Paulo, v. 18, n. 1 (31), p. 83-104, 2007.

MORAES, S. G., DURÁN, N., FREIRE, R. S. **Remediation of Kraft E1 and black liquor effluents by biological and chemical processes.** Environ Chem Lett, 4: 87-91, 2006.

MUNARI, F., GAIO, T. A., DILLON, A. J. P., **Cinética da secreção de lacase e peroxidases e degradação de fenóis totais em cultivo submerso de *Pleurotus Sajor-caju* com efluente da indústria papeleira.** In Anais XIV SINAFERM, 2003.

MURUGESAN, K., ARULMANI, M., NAM, I-H., KIM, Y-M., CHANG, Y-S., KALAICHELVAN, P. T. **Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes.** Appl Microbiol Biotechnol, 72:939-946, 2006.

NETO, G. C. **Decomposição de fenol e efluente da indústria de papel e celulose por fotocatalise heterogênea.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; SASAEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**, p. 1-7. Article in press (www.elsevier.com/locate/soilbio), 2004.

ODENDAHL, S. Environmental protection and consumer demands: a review of trends and impacts. **Pulp and Paper Canadá**, v. 95, 1994.

OSO, B. A. **Pleurotus tuber regium from Nigéria.** Mycologia, n.20, pp.271-279, 1977.

PERISSOTTO, D.; RAMOS, L. P. **Estudo das ligninas de polpas kraft e kraft MCC obtidas pelo método de Björkman e por acidólise com dioxano: HCl.** Centro e Pesquisa em Química Aplicada, Departamento de Química, UFPR. In: Congresso Ibero-americano de Investigación em Celulosa y Papel, 2002.

RAHMAN, R.ABD., ZAHRIM, A.Y., ABU-BAKAR, A. **Chloro-organics in papermill effluent: Identification and removal by sequencing batch biofilm reactor.** Journal of Applied Sciences, 7(15), pp.2160-2163, 2007.

REID, I. D. **Bleaching Kraft Pulps with White-rot Fungi.** Environmental Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. Ed. Young, R. A.; Akhtar, M., John Wiley and Sons, N.Y., 1998.

RODRIGUEZ, E; NUERO, O; GUILLÉN, F; MARTINEZ, A. T.; MARTINEZ, M. J. **Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four Pleurotus species: The role of laccase and versatile peroxidase.** Soil Biology & Biochemistry. Elsevier, 2004.

RUBILAR, O., DIEZ, M.C., GIANFREDA, L. **Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi.** Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 38(4), pp.227-268, 2008.

SALMERÓN-ALCOCER, A., RUIZ-ORDAZ, N., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., GALÍNDEZ-MAYER, J. **Continuous biodegradation of single and mixed chlorophenols by a mixed**

microbial culture constituted by Burkholderia sp., Microbacterium phyllosphaerae, and Candida tropicalis. Biochemical Engineering Journal, 37(2), pp.201-211, 2007.

SANTOS, A. Z. **Tratamento de efluentes da indústria de celulose e papel com fungo filamentoso lignocelulósico.** Dissertação de mestrado. Departamento de Engenharia Química, UEM. Maringá, 1997.

SCHNEIDER, A. L. D. S. **Estudo da Produção de Inulinase por Kluyveromyces marxianus ATCC 36907.** Tese de Mestrado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1996.

SEDARATI, M.R., KESHAVARZ, T., LEONTIEVSKY, A A., EVANS, C. S. **Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete Trametes versicolor immobilized on nylon mesh.** Journal of Biotechnology, vol 6 nº. 2, 2003.

SILVA, H. H. B. **Biodegradação de 2,4-diclorofenol por Pleurotus ostreatus DSM 1833.** Dissertação de mestrado. Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente. UNIVILLE. Joinville, 2005.

SOARES, C. H.; DURÁN, N. **Biodegradation of chlorolignin and lignin-like compounds contained in E1 – pulp bleaching effluent by fungal treatment.** Applied Biochemistry and Biotechnology, vol.95, 2001.

TAVARES, A. N. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira.** Tese de Doutorado. Departamento de Química. Universidade de Aveiro, 2006.

VALLI, K., GOLD, M. H. **Degradation of 2,4-Dichlorophenol by the Lignin-Degrading Fungus Phanerochaete chrysosporim.** Journal of Bacteriology, vol 173, nº 1, pp. 345-352, 1991.

WANG, G., WEN, J., YU, G., LI, H. **Anaerobic biodegradation of phenol by Candida albicans PDY-07 in the presence of 4-chlorophenol.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24 (11), pp.2685-2691, 2008.

WISBECK, E. **Estudo do cultivo submerso de Pleurotus ostreatus DSM1833 para a produção de biomassa e de exopolissacarídeos.** Tese de Doutorado. 196p. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

WOLFF, E. R. S.; WISBECK, E.; SILVEIRA, M. L. L; GERN, R. M. M.; PINHO M.S.L.; FURLAN, S. A.. **Antimicrobial and Antineoplastic Activity of *Pleurotus ostreatus***. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008.

WU, W. Z, FENG, Y. C., WANG, J. L. **Characteristics of 4-chlorophenol degradation by a soil bacterium *acinetobacter* sp.** Huanjing Kexue/Environmental Science, 29 (11) pp.3185-3188, 2008.

XIE, T.; ABRAHAMSSON, K; FOGELQVIST, E; JOSEFSSON, B. **Environmental Science Technology**. v.20, 1986.

YANG, C. F., LEE, C. M. **Enrichment, isolation, and characterization of 4-chlorophenol-degrading bacterium *Rhizobium* sp. 4-CP-20.** Biodegradation, 19(3), pp. 329-336, 2008.

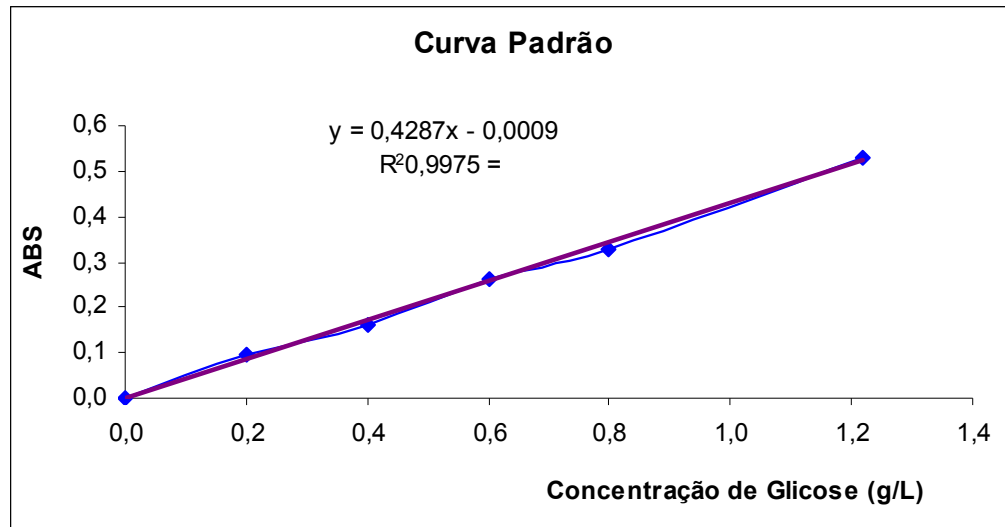
ZHANG, J., LIU,X., XU,Z.,CHEN,H., YANG,Y. **Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase.** International Biodeterioration and Biodegradation, 61(4), pp.351-356, 2008.

ZIAGOVA, M., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES,M. **Kinetics of 2,4-dichlorophenol and 4-Cl-m-cresol degradation by *Pseudomonas* sp.** Cultures in the presence of glucose. Chemosphere/, 68 (5), pp. 921-927, 2007.

ANEXOS

ANEXO A

Curva de calibração para glicose



Curva de calibração para glicose

ANEXO B

Cromatograma para 2,4 diclorofenol e 2,4,6 triclorofenol

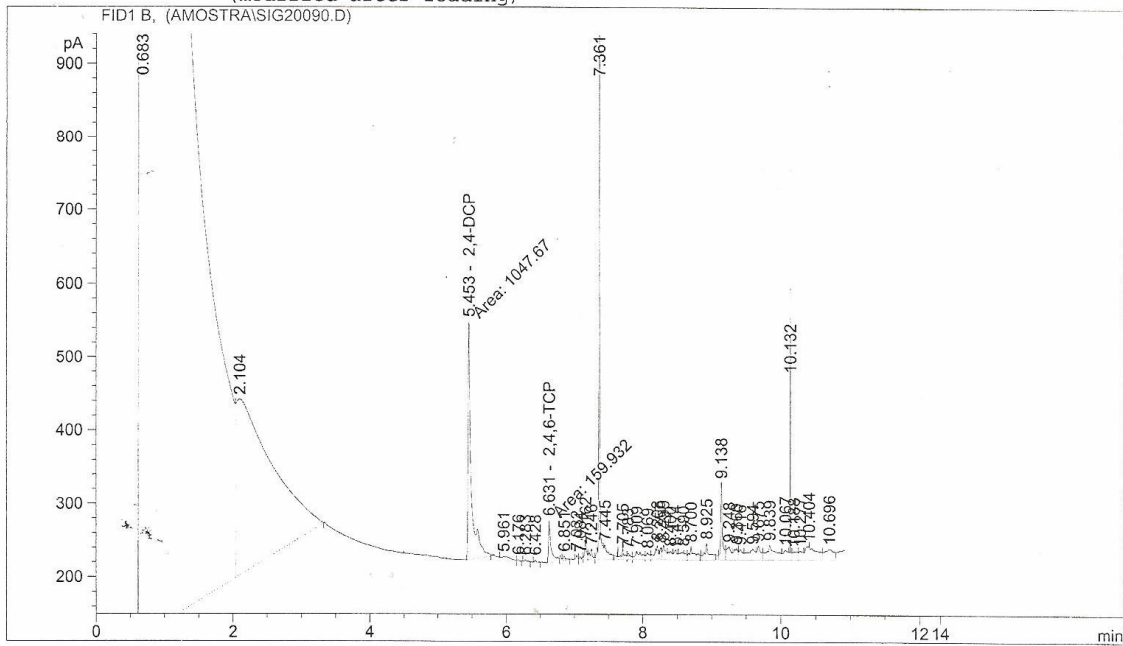
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\AMOSTRA\SIG20090.D

Sample Name: F2 T6 CP

```

=====
Injection Date   : 3/2/2009 11:30:35
Sample Name      : F2 T6 CP                      Location : Vial 2
Acq. Operator    : Theodoro                      Inj       : 1
Acq. Instrument  : Instrument 1                  Inj Volume: 1 µl
Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\PAHS1.M
Last changed     : 3/2/2009 11:27:51 by Theodoro
                  (modified after loading)
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\PAHS1.M
Last changed     : 14/10/2009 10:23:18 by Theodoro
                  (modified after loading)
=====

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By           : Retention Time
Calib. Data Modified : 29/4/2009 14:34:44
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID1 B,

RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
2.080	1		-	-	-		Fenol
5.453	1	MM	1047.66626	5.48987e-2	57.51550		2,4-DCP
6.631	1	MM	159.93176	1.36923e-1	21.89830		2,4,6-TCP

Totals : 79.41379

Results obtained with enhanced integrator!

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

```

=====
*** End of Report ***
=====

```