

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS

RODRIGO DUWE

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE EFLUENTE KRAFT POR BASIDIOMICETOS

CURITIBA

2013

RODRIGO DUWE

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE EFLUENTE KRAFT POR BASIDIOMICETOS

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais do Departamento Acadêmico de Química e Biologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marlene Soares

CURITIBA

2013

RODRIGO DUWE

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE EFLUENTE KRAFT POR
BASIDEOMICETOS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Prof^a.Dr^a.Wanessa Algarte Ramsdorf

Departamento Acadêmico de Química e Biologia(UTFPR)

Membro 2 –Prof^a.Dr^a. Cláudia Regina Xavier

Departamento Acadêmico de Química e Biologia(UTFPR)

Orientadora – Prof^a.Dr^a. Marlene Soares

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenadora de Curso – Prof^a.Dr^a. Valma Martins Barbosa

Curitiba, 03 de maio de 2013.

RESUMO

DUWE, Rodrigo. Estudo da Degradação de Efluente Kraft por Basidiomicetos. 2013. 71 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Ambientais) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

Este trabalho apresenta um estudo sobre a degradação de compostos presentes em efluente kraft, utilizando dois basidiomicetos lignolíticos (*Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 e *Pleurotus ostreatus* POS 560) e dois fungos isolados de madeiras em decomposição e ainda sem identificação (LMB-CF e LMB – OP). Foram realizados experimentos em meio sólido e em meio líquido, numa sequência de quatro estudos. No primeiro foram variadas as concentrações de efluente (de 0% a 100%) dos meios de cultivo solidificado, avaliando seu efeito sobre o crescimento micelial. O segundo estudo, também realizado em meio sólido, consistiu de um delineamento experimental 2^3 , variando glicose, pH e concentração de efluente. Foram selecionados os fungos *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 e *Pleurotus ostreatus* POS 560 para realizar o terceiro estudo, em meio líquido, em outro planejamento fatorial 2^3 , com variação de glicose, espécie de fungo e concentração de efluente, sendo analisados: glicose, biomassa, compostos lignínicos, compostos fenólicos totais e cor. O melhor resultado de crescimento micelial, em placas de petri, foi obtido com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, em 10% de efluente, pH 7,0 e 10g/L de glicose. Os melhores resultados de remoção de compostos, em meio líquido, foram obtidos com o fungo *Pleurotus ostreatus*, cultivado em até 20% de efluente kraft e com adição de 10g/L de glicose. Foram obtidos valores de remoção de fenol entre 9 – 14%, Cor 64 – 76%, DQO 38 – 66% e lignínicos 41 – 64%. No último estudo foi conduzido um ensaio cinético, durante dez dias, com amostragem a cada dois dias. Em relação ao ensaio cinético observou-se correlação entre a remoção de cor, lignina e formação de biomassa nos primeiros dias. *Pleurotus ostreatus* apresentou potencial de degradação de compostos presentes em efluente kraft.

Palavras Chave: Fungos Lignolíticos. Biodegradação. Efluente Kraft. *Pleurotus ostreatus*. *Phanerochaete chrysosporium*.

ABSTRACT

DUWE, Rodrigo. Study of Kraft Effluent Degradation by Basidiomycetes. 2013. 71 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Ambientais) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

This work presents a study on the degradation of compounds present in the kraft effluent by lignolitic basidiomycetes using the following: *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 and *Pleurotus ostreatus* POS 560; unidentified fungi: CF-01 and LMB LMB - OP 02. Experiments were carried out on solid medium and in liquid medium, a sequence of four studies. Were varied in the first effluent concentrations of the culture media (0% to 100%), evaluating its effect on the mycelial growth. The second study, also conducted in solid medium consisted of a 2³ experimental design, varying glucose, pH and concentration of effluent. Were selected fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* ATCC 24725 POS 560 to perform the third study, in liquid medium, in another 2³ factorial design, varying glucose, fungal species and effluent concentration and analyzed: glucose, biomass, lignínicos compounds, total phenolic compounds and color. The best result mycelial growth in petri dishes was obtained with the fungus *Phanerochaete chrysosporium* effluent by 10%, pH 7.0 and 10g / L glucose. The best results, for removal of compounds, in liquid medium were obtained with the fungus *Pleurotus ostreatus*, grown to 20% kraft effluent and with addition of 10g / L glucose. The mean values of removing total phenolic compounds from 9 – 14% color 64 – 76%, COD 38 – 66% and 41 – 64% lignínic compounds. In the last study we conducted a kinetic assay, for ten days, with sampling every two days. Regarding the kinetic assay correlation was observed between the color removal, lignin and biomass formation in the early days. *Pleurotus ostreatus* has potential degradation of compounds in kraft effluent.

Key words: Lignolitic fungi. Biodegradation. Kraft effluent. *Pleurotus ostreatus*. *Phanerochaete chrysosporium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural da celulose.....	13
Figura 2 – Subestruturas constituintes da lignina, sendo representado as porcentagens de ligação entre compostos de fenilpropano.....	15
Figura 3 – Estrutura Base para formação de ligninas.....	16
Figura 4 – Complexo de ação da enzima lacase.....	24
Figura 5 – Ilustração do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	25
Figura 6 – Ilustração do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	26
Figura 7 – Etapas desenvolvidas nesta pesquisa.....	27
Figura 8 – Representação dos raios de medição em placa.....	31
Figura 9 – Curva analítica de compostos fenólicos totais.....	34
Figura 10 – Curva analítica de glicose.....	37
Figura 11 – Placas de petri com cultivos de <i>Pleurotus ostreatus</i> (a) e Fungo – CF (b) após 5 dias de cultivo em 26°C, em meio com concentrações crescentes de efluente kraft (0, 20, 40, 60, 80 e 100%).....	44
Figura 12 – Velocidades de crescimento, dos fungos individualmente.....	48
Figura 13 – Remoção de compostos lignínicos	51
Figura 14 – Remoção, em porcentagem, dos compostos tóxicos, em meio líquido, com planejamento fatorial 2 ³	53
Figura 15 – Acompanhamento cinético em meio líquido a concentração de 10% de efluente Kraft – Monitoramento dos parâmetros de análise.....	57
Figura 16 – Acompanhamento cinético em meio líquido a concentração de 10% de efluente Kraft – Monitoramento do desenvolvimento da biomassa e do consumo de glicose.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento fatorial com dois níveis e 3 variáveis, estabelecido para 4 microrganismos, em meio sólido.....	31
Tabela 2 – Matriz padrão para o planejamento experimental 2^3 feito individualmente para cada fungo.....	32
Tabela 3 – Planejamento fatorial com dois níveis e três variáveis, aplicado para otimizar o estudo em meio líquido.....	32
Tabela 4 – Matriz padrão para o planejamento experimental 2^3 com os fungos <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Phanerochaeta chrysosporium</i>	33
Tabela 5 – Valores e parâmetros de caracterização do efluente kraft.....	41
Tabela 6 – Valores de índice de crescimento relativo e índice de germinação do efluente.....	42
Tabela 7 – Velocidade média e desvio padrão do crescimento radial dos fungos cultivados em efluente kraft solidificado com 1,5% de agar.....	43
Tabela 8 – Velocidades de crescimento dos ensaios em planejamento fatorial, com 2 níveis e 3 variáveis, para cada fungo individualmente.....	45
Tabela 9 – Análise estatística ANOVA.....	47
Tabela 10 – Valores de porcentagem de remoção dos parâmetros toxicológicos, com planejamento fatorial 2^3	50
Tabela 11 – Análise estatística ANOVA para o delineamento experimental em meio líquido.....	51
Tabela 12 – Remoção (%) dos parâmetros do efluente, em ensaio cinético.....	55
Tabela 13 – Acompanhamento enzimático durante cinética de 10 dias de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado em efluente kraft 10 % adicionado de 10g/L de glicose.....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. REVISÃO TEÓRICA	13
3.1 ESTRUTURA DA MADEIRA.....	13
3.1.1 Celulose.....	13
3.1.2 Hemicelulose.....	14
3.1.3 Lignina.....	14
3.1.4 Extrativos.....	16
3.2 PAPEL E CELULOSE	17
3.2.1 Processo Kraft.....	18
3.2.1.1 Descrição do processo kraft.....	18
3.2.1.2 Impactos Ambientais do Efluente Kraft	19
3.3 BIORREMEDIAÇÃO.....	20
3.3.1 Fungos Lignolíticos.....	21
3.3.1.1 Enzimas ligninocelulolíticas.....	22
3.3.1.1.1 Manganês Peroxidase.....	22
3.3.1.1.2 Lignina peroxidase.....	23
3.3.1.1.3 Lacase	23
3.3.1.2. <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
3.3.1.3 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	25
4 METODOLOGIA	27
4.1 MICRORGANISMOS.....	28
4.1.1 Preparo do Inóculo.....	28
4.1.2 Quantificação do Número de Células da Suspensão de Esporos.....	29

4.2	CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	29
4.3	ESTUDO 1: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EFLUENTE SOBRE A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DOS MICROORGANISMOS	30
4.3.1	Condições do Experimento.....	30
4.3.1	Análises.....	30
4.4	ESTUDO 2: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM PLACAS DE PETRI.....	31
4.5	ESTUDO 3: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO.....	32
4.6	ESTUDO 4: ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DO CULTIVO.....	33
4.7	ANÁLISES	34
4.7.1	Determinação de Compostos Fenólicos Totais.....	34
4.7.2	Determinação de Compostos Lignolíticos.....	35
4.7.3	Determinação de Cor.....	35
4.7.4	Determinação do pH.....	36
4.7.5	Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	36
4.7.6	Ensaio Toxicológico Crônicos com Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	36
4.7.7	Determinação de Glicose	37
4.7.8	Determinação de Enzimática.....	38
4.7.8.1	Atividade da enzima Peroxidase.....	38
4.7.8.2	Atividade de Lignina Peroxidase.....	39
4.7.8.3	Atividade da enzima Manganês Peroxidase	39
4.7.8.4	Atividade da enzima Lacase	39
4.7.9	Determinação da Biomassa Micelial	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	41
5.1.1	Análises Físico-Químicas.....	41
5.1.2	Ensaio Toxicológico com Sementes de <i>Lactuca Sativa</i>	42

5.2 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EFLUENTE SOBRE A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS.....	43
5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM PLACAS DE PETRI.....	45
5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO.....	49
5.5 ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DO CULTIVO.....	55
6. CONCLUSÃO	59
7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A indústria papelreira é muito importante economicamente para a América do Sul, sendo que Brasil e Chile são os maiores processadores de madeira. Em 2008, o setor alcançou o posto de quarto produtor mundial de celulose – atrás de Estados Unidos, Canadá e China. O recorde foi obtido em um período adverso, durante a crise financeira internacional. A posição foi mantida em 2010, quando o setor produziu 14 milhões de toneladas de celulose. Em 2012, a produção brasileira de celulose foi de 13,8 milhões de toneladas de celulose e 10,1 milhões de toneladas de papel (BRACELPA, 2013).

Para o processamento da madeira, as indústrias que utilizam o processo kraft, consomem grande volume de água, sendo no Brasil a média de 60 m³/t. Este efluente apresenta alto potencial poluidor e contém grandes quantidades de sólidos, cor, matéria orgânica dissolvida e compostos organoclorados. Os parâmetros ambientais mais explorados no efluente da indústria papelreira são: demanda bioquímica de oxigênio, demanda química de oxigênio, sólidos em suspensão, cor, halogênios orgânicos adsorvíveis, toxicidade e dioxinas (MIELI, 2007).

Nos efluentes da indústria de celulose kraft uma considerável variedade de substâncias químicas está presente, relacionadas com compostos lignínicos e seus derivados fenólicos, entre outros. Estes compostos são responsáveis pela recalcitrância e elevada carga orgânica no efluente, além de cor e de toxicidade (XAVIER; CHAMORRO; VIDAL, 2005). Por isso, os estudos sobre tecnologias alternativas de remediação e tratamento destes efluentes vêm sendo bastante abordados (ZAMORA et al., 1996).

O tratamento de efluentes utilizado em fábricas de papel e celulose ocorre em quatro etapas sequenciais: tratamento preliminar (com a remoção de sólidos grosseiros), tratamento primário (com o intuito da remoção de sólidos em suspensão), tratamento secundário (realizado biologicamente, com remoção de matéria orgânica biodegradável e toxicidade) e o tratamento terciário (com a remoção de cor e o polimento do efluente) (MIELI, 2007).

Geralmente, o efluente kraft é significativamente purificado até o tratamento secundário, não sendo necessário o tratamento terciário. Em relação ao processo secundário de tratamento, são utilizados meios aeróbicos para realizar a degradação. Lodos ativados e lagoas aeradas são muito empregados, com uma menor utilização de microrganismos com crescimento aderido como em biodiscos, filtros biológicos (MIELI, 2007).

Tratamentos através de microrganismos transformam compostos com toxicidade elevada em CO₂ e H₂O (GARCIA, 2009), em processos aeróbicos, ou CH₄ e H₂O, em processos anaeróbicos, tendo custos relativamente baixos (ZAMORA et al., 1996). Basidiomicetos são exemplos de microrganismos que podem realizar a degradação de compostos tóxicos presentes em efluente kraft (NETO, 2010). Exemplos de microrganismos que realizam este tipo de degradação são *Phanerochaete chrysosporium* (CARDOSO, 2009) e o gênero *Pleurotus* (GARCIA, 2009).

Almeida, Assalin e Rosa (2004) utilizaram em seu estudo um processo combinado de ozonização e tratamento por *Pleurotus ostreatus*, conseguindo 35% de remoção de fenóis totais. Garcia (2009) obteve remoções de 2-4 diclorofenol e 2-4-6 triclorofenol de 45,7% e 17,9%, respectivamente, em biorreator com o fungo *Pleurotus ostreatus*. Mei (1992) conseguiu 13% de remoção de cor, em escala de bancada, com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

Neste contexto, o presente trabalho procurou acompanhar a biodegradação de efluente kraft por quatro basidiomicetos lignolíticos, em estudos em escala de bancada. Dentre os organismos estudados estão *Phanerochaeta chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e outros dois fungos sem identificação, mas que mostraram-se degradadores de corantes em aulas práticas de Biotecnologia Ambiental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a biodegradação de efluente kraft por quatro fungos lignolíticos, em escala de bancada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efluente kraft, segundo os parâmetros físicos, químicos e ecotoxicológicos;
- Avaliar o efeito da concentração do efluente kraft sobre a velocidade de crescimento micelial dos quatro fungos estudados;
- Otimizar o crescimento micelial dos fungos em cultivo no efluente Kraft solidificado, através de delineamentos experimentais 2^3 ;
- Otimizar a biodegradação de efluente kraft (redução de compostos lignínicos) a partir do cultivo submerso de dois fungos, com delineamento experimental 2^3 ;
- Acompanhar a cinética de degradação do efluente kraft, em agitador rotativo (*shaker*), na condição mais otimizada do estudo.

3 REVISÃO TEÓRICA

3.1 ESTRUTURA DA MADEIRA

A madeira é composta, basicamente, por três polímeros estruturais (celulose, hemicelulose e lignina) e por extrativos vegetais (resinas), sendo que a proporção varia entre as espécies.

3.1.1 CELULOSE

A celulose é um homopolímero de cadeia longa, formado por moléculas de glicose unidas por ligações $\beta(1-4)$ (Figura 1) (OGEDA; PETRI, 2010). As microfibrilas presentes na estrutura da celulose são estabilizadas entre si por ligações inter e intramoleculares, como pontes de hidrogênio entre as cadeias (ESTEVES, 2011). A celulose tem poucas regiões com baixo grau de ordenação (partes amorfas), mas apresenta muitas partes com alto grau de ordenação (frações cristalinas). A rigidez, a densidade e a resistência desta substância ocorrem devido ao grande caráter cristalino que está presente. Já as pontes de hidrogênio presentes entre as ligações intermoleculares e intramoleculares fazem com que a celulose tenha alta insolubilidade e não reatividade (AGAPITO, 2007).

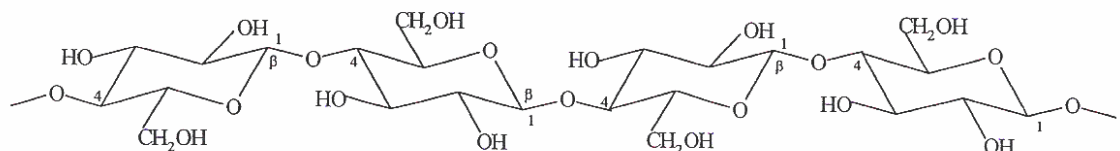


Figura 1 – Fórmula estrutural da celulose.

Fonte: Agapito (2007).

3.1.2 HEMICELULOSE

A hemicelulose, polissacarídeo associado à celulose, tem função estrutural na parede celular vegetal. Ela também atua no crescimento e no desenvolvimento de plantas. Sua estrutura é composta por ácidos hexurônicos, hexoses e pentoses. Esta composição de açúcares varia com o tipo de planta, mas o monossacarídeo predominante determina sua classe: arabinogalactana, arabinoglucoronoxilana e galactoglucomana, glucuronoxilana ou glucomanana (AGAPITO, 2007). Xilose, ácido acético e furfural são exemplos de oligômeros formadores de açúcares constituintes da hemicelulose (GOUVEIA; NASCIMENTO; MAIOR, 2009).

3.1.3 LIGNINA

A lignina, também conhecida como lenhina, é um dos compostos aromáticos mais abundantes na terra, presentes nas plantas vasculares. São formados por frações de fenilpropano como o *p*-cumarílico, álcool sinapílico e álcool conífero (AGAPITO, 2007).

Ligações carbono-oxigênio (C-O-C) de éter e ligações carbono-carbono (C-C) são as presentes entre as frações de fenilpropano, com predominância das ligações tipo éter. Estas moléculas de lignina são formadas por polimerização, através de enzimas peroxidases. As moléculas precursoras para a formação desta molécula, são radicais e fenóis (FUKUSHIMA; HADFIELD, 2003).

A lignina tem uma estrutura bastante irregular, com predominância de subestruturas com ligação (β -o-4), mostradas na Figura 2.

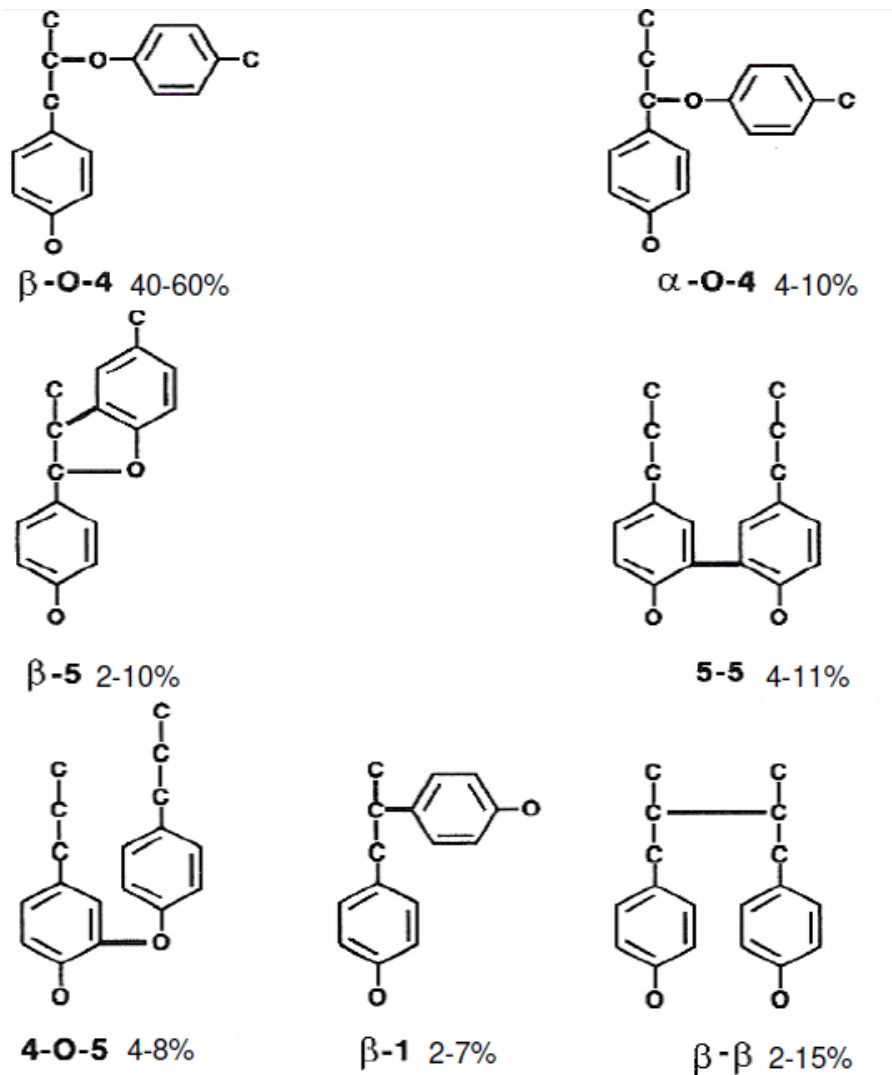


Figura 2 – Subestruturas constituintes da lignina, sendo representado as porcentagens de ligação entre compostos de fenilpropano.

Fonte: Agapito (2007).

O tipo de lignina presente nas plantas varia dependendo também do tipo de madeira resinosa e folhosa. Na primeira é encontrada lignina com unidades de coniferílico e *p*-coumarílico, enquanto na segunda a lenhina é formada por frações de três álcoois (CARVALHO et al., 2009).

A lignina está intimamente ligada à celulose por diferentes tipos de ligações (AGAPITO, 2007). Há ligações entre éter e o carbono benzílico presente na lignina e a uma parte do hidrato de carbono e ligações éster, do carbono benzílico da lenhina

e resíduos de ácidos urônicos, e ligações glicosídicas somente da lignina, sendo a primeira ligação a mais predominante (CARVALHO et al., 2009). Com o alto grau de ramificação da molécula de lignina, pressupõe-se que os mecanismos de lise da molécula ocorre por via extracelular. Estes mecanismos devem ser oxidativos, para que as ligações do tipo éter, estáveis, sejam quebradas. Já que a estrutura da lenhina é bastante irregular (KLOCK, 2013), não é requerida grande especificidade destes mecanismos para a quebra de ligação (AGAPITO, 2007). A Figura 3 mostra a estrutura geral da lignina.

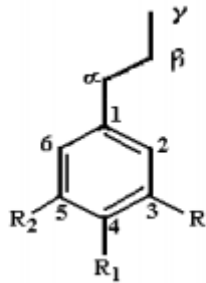


Figura 3 - Estrutura Base para formação de ligninas.

Fonte: Saliba (2001).

3.1.4 Extrativos

Os extrativos não são substâncias integrantes da parte estrutural da parede celular das plantas. Estes componentes são responsáveis por algumas características singulares da madeira, como resistência natural ao apodrecimento, cheiro, cor, gosto e propriedades abrasivas (KLOCK et al., 2005). A porcentagem e a qualidade de extrativos presentes na madeira dependem da espécie, sendo evidentes as diferenças entre indivíduos da mesma taxonomia. Os extrativos responsáveis pela durabilidade da madeira formam-se durante o processo de transformação do alburno em cerne, sendo acumulados nos lumens e nas paredes da células, conferindo uma coloração escura final (OLIVEIRA et al., 2005). Quantitativamente e qualitativamente as substâncias que podem ser extraídas dependem, também, da idade e região de procedência. Cerca de 3 a 10% da madeira é constituída por extrativos. As folhosas e coníferas têm uma pequena

diferença em sua porcentagem, tendo a primeira 2 a 4% e a segunda 5 a 8% de extrativos (KLOCK et al., 2005). Estes extrativos podem ser removidos da matéria-prima através do processo kraft, na etapa de cozimento. Estes compostos, que recebem o nome de *pitchs*, podem ser liberados como depósitos no maquinário, no qual se acumulam, causando grandes perdas para este ramo industrial. Estas substâncias depositadas tem relação com a composição dos extrativos da espécie de madeira (BARBOSA; MALTHA; CRUZ, 2005).

Os extrativos podem ser divididos de acordo com sua composição química em, terpenos e terpenóides, compostos alifáticos e compostos fenólicos. A primeira classe é composta por oleoresinas, secreções da madeira, e substâncias voláteis, sendo produtos da condensação de moléculas de isopreno, conferindo a madeira proteção e suporte estrutural. Já a segunda contém compostos muito estáveis e lipofílicos, como araquinol, o behenol e o lignocerol. Os componentes mais importantes desta classe são os ácidos graxos, que podem ser saturados ou insaturados. A terceira, e última, classe tem constituintes derivados da biossíntese da lignina, sendo subprodutos e resíduos. Estes estão presentes em maior quantidade no cerne da árvore, conferindo caráter fungicida a madeira. É nas folhas e na casca que se encontra a maior quantidade destes compostos, podendo ser cetonas, aldeídos, álcoois e ácidos (KLOCK et al., 2005).

3.2 PAPEL E CELULOSE

O processo kraft é responsável por cerca de 80% da celulose produzida no mundo (AGAPITO, 2007). Para que seja produzida é preciso que sejam separados alguns compostos da madeira tais como: lignina, celulose, hemicelulose e compostos extrativos. Estes podem ser modificados através de processos termo-mecânicos, mecânicos e químicos (VANZETTO, 2012). O processo Kraft é um exemplo, alcalino, destes processos que consegue a separação efetiva de componentes da madeira (VANZETTO, 2012).

3.2.1 PROCESSO KRAFT

3.2.1.1 Descrição do Processo Kraft

A madeira pré-cortada é transformada em cavacos, ou aparas de madeira, através de um picador. Estes pedaços de madeira são colocados em um digestor para seu cozimento, submetidos a 145 - 155°C , e são quimicamente tratadas com a lixívia branca, composta por: hidróxido de sódio (NaOH) e sulfeto de sódio (Na₂S) (FRAGA; JUNIOR; GONÇALVES, 2002).

Com este cozimento, hemicelulose, lignina e extrativos vegetais são degradados e solubilizados. A pasta preparada é lavada e crivada, ficando o licor negro no local de separação. Este licor é composto por compostos orgânicos presentes na madeira, por compostos da lavagem química, que a matéria prima foi submetida e por água (NETO, 2002). Mesmo com a deslignificação da madeira, as fibras celulósicas ficam escuras, com leve tom de marrom, caracterizando assim a lignina residual nas fibras de celulose.

Este processo da indústria de papel, também chamado de polpação kraft, gera como efluente o licor negro, de pH alcalino e com compostos fenólicos (ZAMORA et al., 1996). Para o branqueamento da polpa são utilizadas técnicas, que extraem o restante da lignina, com emprego de produtos químicos com alta concentração de compostos clorados. A sequência mais comum do processo de branqueamento de pasta é: aplicação de cloro, extração alcalina, uso de hipoclorito, emprego de dióxido de cloro; extração alcalina e novamente a aplicação de dióxido de cloro (ZAMORA et al.,1996; RABELO, 2001). O tratamento da pasta pode ser feito utilizando, também, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio.

Quando se tem a remoção de lignina por cloro há a formação de substâncias clorofenólicas persistentes. Clorofenóis, cloroalifáticos, cloroguaicois, cloroaromáticos e clorocatecóis são exemplos de substâncias deste tipo de efluente (AGAPITO, 2007). Estes efluentes contém baixo teor de oxigênio dissolvido, elevada cor e turbidez e alto teor de sólidos suspensos (ZAMORA et al.,1996). Os valores de

demanda bioquímica e química de oxigênio nestes efluentes são relevantes (NAVIA et al., 2006).

3.2.1.2 Impactos Ambientais do Efluente Kraft

Para o setor de celulose e papel a abordagem da questão ambiental é um fator muito relevante para o desenvolvimento contínuo. Frequentemente, esta premissa vem sendo tratada como uma variável gerencial relevante ao negócio (SOUZA et al., 2008). As indústrias estudam formas de reaproveitar a água de lavagem do processo, através de reciclo (SOUZA et al., 2008). O efluente derivado da indústria kraft tem características específicas, com altas concentrações de sólidos suspensos (SS), demanda química de oxigênio (DQO), cor, toxicidade e demanda bioquímica de oxigênio (DBO). A cor é derivada de compostos lignínicos e a toxicidade é relacionada a compostos fenólicos, sendo que em efluentes de branqueamento, estes compostos relacionados com cloro, fazem com que a toxicidade do efluente aumente (VANZETTO, 2012).

Vários são os componentes que podem ser encontrados em efluentes kraft, muitos com toxicidade relevante. Tensoativos são componentes difíceis de degradar, alteram a reprodução de organismos aquáticos e matam microrganismos presentes no tratamento secundário. Metais pesados, com alta toxicidade, se acumulam nos organismos ao longo das cadeias tróficas. Soda cáustica, que altera o pH do corpo d'água e tem efeito corrosivo (SOUZA et al., 2008). O Conama 430 de 2011, estabelece padrões para o lançamento de efluentes em corpos d'água, em relação a parâmetros de toxicidade a biota (VANZETTO, 2012).

3.3 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação está sendo desenvolvida nos últimos anos com o intuito de explorar a diversidade de microrganismos, enzimas ou genes específicos para que

poluentes sejam transformados em compostos menos tóxicos ou sem toxicidade (COLLA et al., 2008). Pode ser definida como várias tecnologias biológicas que têm o objetivo de remediar efluentes ou recuperar áreas poluídas (OLIVEIRA, 2008).

Algumas técnicas utilizadas levam em consideração a fase e o tipo de tratamento. Assim, de acordo com o local onde está presente o resíduo, ela pode ser *in situ* ou *ex situ*. A primeira ocorre no local de contaminação, sendo mais complicado controlar os fatores para melhorar esta degradação, devido as condições ambientais e ao próprio meio. Já a segunda ocorre em outro compartimento, ou seja, o meio contaminado é transferido para um ambiente determinado, onde será feita sua purificação. Existem alguns fatores para que se possa escolher o melhor tipo de técnica para realizar a biorremediação, entre eles toxicidade, custo e a concentração final do resíduo, que deverá atender as exigências do órgão fiscalizador (GUIMARÃES; MOTA, 2009).

Processos de biorremediação podem ser divididos em atenuação natural monitorada, bioestimulação e bioaumentação. No primeiro caso a remediação acontece sem a intervenção, sendo o homem responsável pelo monitoramento do processo. Na segunda ocorre a estimulação do processo através da adição de doadores de elétrons, nutrientes e receptores de elétrons, estimulando os microrganismos e fazendo com que o potencial de degradação do efluente aumente consideravelmente (CETEM, 2008). Na terceira ocorre a adição de microrganismos na área contaminada, com características especiais para que possam degradar o contaminante, podendo ser do local (autóctones) ou não (alóctones). Muitas vezes a adição destas culturas tem como objetivo a transferência de genes específicos, que melhor degradam os poluentes, para que a cultura nativa possa assimilar esta carga genética e melhorar suas características de degradação (GUIMARÃES, 2009).

3.3.1 FUNGOS LIGNOLÍTICOS

Os fungos são os principais agentes de degradação de matéria orgânica, sendo responsáveis pela ciclagem de nutrientes (PEREIRA, 2011). Fazem a manutenção do ciclo do nitrogênio, fósforo e potássio, incorporando estas

substâncias em sua biomassa, para a formação da parede celular (SALVI, 2011). Além de degradadores generalizados, os fungos têm mecanismos para melhorar seu desempenho, com o crescimento das hifas. Quanto maior for a superfície de contato das hifas com o resíduo em questão, maior será a degradação (CETEM, 2008).

A lignina é a uma molécula estereoisomérica com muitas irregularidades em sua cadeia. Esta irregularidade, somada à aromaticidade e baixa atividade de água, faz com que a ação microbiana seja dificultada ou impossibilitada. Com a evolução, alguns gêneros fúngicos passaram desenvolver mecanismos enzimáticos pouco-específicos que possibilitam a biodegradação da lignina.

Os fungos capazes de degradar madeiras são divididos em três grupos: fungos da decomposição branda, parda e branca. Os fungos da degradação branda são deuteromicetos e ascomicetos, os quais têm grande capacidade de degradação de polissacarídeos, mas perdem desempenho quando são utilizados para a degradação de lignina. Os fungos da degradação marrom ou parda são excelentes degradadores da celulose e da hemicelulose. Já os fungos da degradação branca são especialistas na degradação de lignina. Entre os fungos, produtores de enzima lignolíticas, os mais estudados para a degradação de compostos com lignina são o *Phanerochaeta chrysosporium* e os gêneros *Pleurotus*, *Trametes* (BETTIN, 2010) e *Ceriporiopsis subvermispota* (AGUIAR, 2012).

3.3.1.1 Enzimas ligninocelulolíticas

Enzimas podem ser rapidamente definidas como proteínas com poder catalítico. A maioria das enzimas é produzida em baixa quantidade, mas com diversidade. Fatores que afetam a atividade de produção de enzimas incluem fonte de carbono e nitrogênio, assim como sua concentração, pH, microelementos, temperatura e disponibilidade de oxigênio (GUIMARÃES, 2009).

A degradação de compostos aromáticos por fungos lignolíticos ocorre por meio de dois sistemas: um é o extracelular, o qual envolve enzimas lignolíticas, o

outro é o sistema citocromo p-450 monoxigenase e epóxido hidrolase. Enzimas hidrolíticas, também foram verificadas, como a amilase, lipase, pectinase, protease e glicoamilase, estas já envolvidas em degradação de biopolímeros por fungos (PEREIRA, 2011).

Os fungos da decomposição branca são capazes de degradar materiais lignocelulósicos através de enzimas extracelulares. Já em fungos que utilizam o complexo enzimático intracelular para a remoção, a degradação não é tão eficiente (PEREIRA, 2011). Alguns sistemas têm a função de degradação mais generalizada, como os oxidoredutases intra e extra celulares (PEREIRA, 2011). Os fungos da podridão branca são capazes de degradar vários poluentes em geral, através da produção das enzimas lacase e lignina peroxidase (CUNHA et al., 2012). As principais enzimas sintetizadas por estes microrganismos são: lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase (SOUZA et al., 2009). O potencial de ionização de compostos tóxicos, como hidrocarbonetos aromáticos persistentes é grande, tendo a manganês peroxidase um potencial de 7,8 eV. A lignina peroxidase pode degradar poluentes com até 7,55 eV (DING et al., 2007).

3.3.1.1.1 Manganês peroxidase

A manganês peroxidase é uma enzima produzida por basidiomicetos. O ciclo enzimático ocorre quando o ferro presente na enzima reage com peróxido, sendo formado um complexo ferro-peróxido. A ligação entre oxigênios do complexo é quebrada, liberando uma molécula de água. Dois elétrons que estavam presentes no complexo são transferidos para a formação de outro complexo, contudo radicalar, chamado Fe^{4+} oxo-porfirina MnP-1. Posteriormente, ocorre uma redução do complexo, com a formação do mesmo complexo, mas não radicalar (MnP-11). O Mn^{2+} é oxidado perdendo um elétron, para o complexo. Com o complexo reduzido, outro Mn^{2+} sofre o mesmo processo, fazendo com que a forma original do complexo seja restaurada com a liberação de uma água. Assim, o MnP-1 oxida outros substratos junto com o Mn^{2+} . Já o MnP-11 necessita do Mn^{2+} , para completar seu

ciclo. O Mn^{3+} formado é estabilizado por ácidos orgânicos, eventualmente atacando moléculas orgânica aleatoriamente, pelo sistema de oxirredução difuso. Portanto, o ataque da enzima é inespecífico, atacando qualquer tipo de poluente orgânico (GUIMARÃES, 2009).

3.3.1.1.2 Lignina peroxidase

Acredita-se que, através da evolução, os fungos degradadores da lignina, formaram a enzima lignina peroxidase por desaminação de produtos de ácidos aminoaromáticos (SOUZA; ROSADO, 2009). A lignina peroxidase é uma glicoenzima, com um grupamento de ferro na sua molécula, precisando de moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para que fique ativa. O peróxido oxida a enzima que, por sua vez, oxida a molécula aromática, sendo formados radicais aril, que se decompõem por reações radicalares espontâneas. Esta enzima é capaz de oxidar moléculas que as outras enzimas lignolíticas não são capazes de oxidar, degradando compostos fenólicos e não fenólicos, álcoois benzílicos e seu pH ideal para atividade é 4 (SOUZA; ROSADO, 2009).

3.3.1.1.3 Lacase

A lacase é uma enzima que pode ser encontrada em procariontes e eucariontes, o que não era evidenciado antigamente. É uma poderosa fenoloxidase, degradando lignina fenólica e não fenólica, gerando como produto ácidos aromáticos (SCHIMIDT et al., 2003).

O processo de ação desta enzima funciona, também, através do sistema de oxirredução do cobre presente em sua estrutura (Figura 4). Há um sítio T1 na molécula que oxida o substrato, aquele então transfere seu elétron para um outro sítio T2 da enzima e o sítio T1 oxida outra molécula, ganhando um elétron. Então, o sítio T1 e T2 transferem seus elétrons para o sítio T3. O sítio T1 é reduzido e transfere seu elétron para o sítio T2, novamente. Assim, o sítio T1 é reduzido

novamente por outra molécula do substrato, mas permanece assim. O resultado é que o substrato é oxidado 3 vezes com o sítio da enzima permanecendo reduzido após esses eventos (GUIMARÃES, 2009).

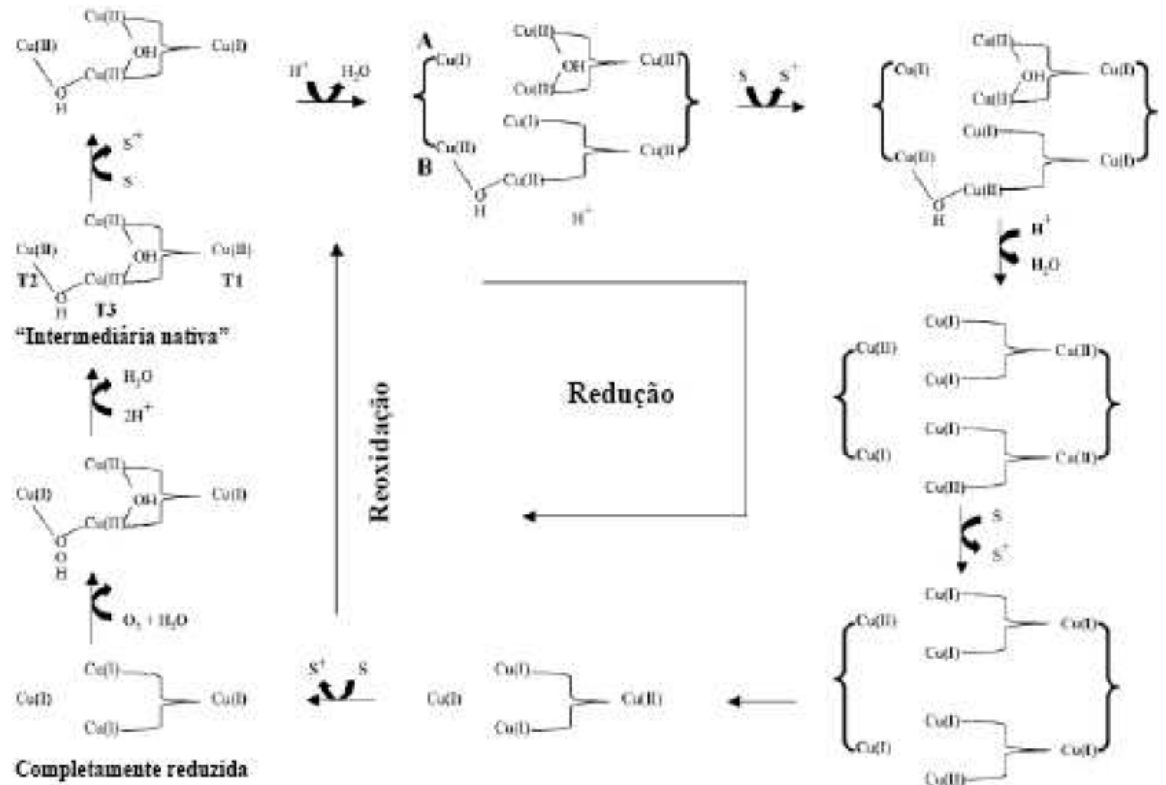


Figura 4 – Complexo de ação da enzima lacase.
Fonte: Guimarães (2009).

A lacase é a principal enzima, de todo o sistema enzimáticos de fungos, verificada na degradação de compostos lignínicos. Sua atividade é fortemente influenciada por características do substrato, linhagem microbiana, condições de cultivo e composição do substrato. O tamanho de partícula, porosidade, natureza cristalina e área de superfície são características essenciais para o bom funcionamento das enzimas no aspecto de sua atividade (TALITA, 2013).

3.3.1.2. *Pleurotus ostreatus*

O gênero *Pleurotus* faz parte do filo *Basidiomycota* e da classe *Basidiomycetes*, ordem *Agaricales*. Tem características específicas como o basidiocarpo pileado, com sua estipe lateral ou central com consistência carnosa. Seu corpo de frutificação possui hastes concêntricas que estão em formato de conchas de ostra e lamelas unidas. É um grupo cosmopolita, usado para fins medicinais e terapêuticos, sendo seu cogumelo com elevado valor nutricional. Há aplicações ainda em biotecnologia e na área ambiental. O *Pleurotus* é um fungo bem sucedido neste quesito, com bons resultados na colonização e degradação de resíduos em geral, especialmente os lignocelulósicos (BETTIN, 2010).

Estudos indicam fungos basidiomicetos da podridão branca como excelentes degradadores de compostos recalcitrantes e, entre eles, o gênero *Pleurotus* se destaca, além de ser uma excelente fonte de proteína (BABA; ROSADO; ZONETTI, 2009). Com bom desenvolvimento em situações rústicas e sem exigências em relação do substrato, o fungo *Pleurotus ostreatus* produz celobiase, hemicelulase, ligninase, celulase e lacase (SCHIMIDT et al., 2003).



Figura 5 Fotografia do fungo *Pleurotus ostreatus*.

Fonte: Mycoplant (2013).

3.3.1.3 *Phanerochaeta chrysosporium*

O fungo *Phanerochaeta chrysosporium* é frequentemente empregado para a degradação de compostos poluentes, como os corantes, pelo fato de liberar uma grande quantidade de enzimas extracelulares (CUNHA et al., 2012). Este fungo tem a capacidade de degradar DDT, diclorodifeniltricloroetano, bifenilpoliclorado (PCB), dioxina, atrazina e penzoapireno (GUIMARÃES, 2009). *Phanerochaeta* quando exposto a situações de estresse, produz dois tipos de enzimas que degradam lignina: a manganês peroxidase e a lignina peroxidase. Este tipo de microrganismo sintetiza, também, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual auxilia na degradação (GUIMARÃES; MOTA, 1998). A imobilização deste fungo é empregada para a potencialização da degradação, usando polímeros, espumas e aparas de madeira, por exemplo (YAN; SHU, 2009).

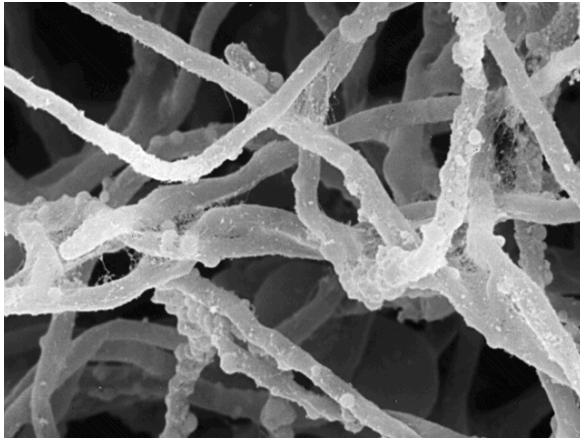


Figura 6 Microscopia eletrônica de varredura das hifas do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

Fonte: JGI (2013).

4 METODOLOGIA

Os experimentos deste trabalho foram realizados nos laboratórios de Biotecnologia, Microbiologia e de Tratamento de Efluentes, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sede Ecoville. A metodologia foi dividida em quatro etapas: preparo do inóculo, caracterização físico-química do efluente, estudos com cultivo dos fungos em placas de petri e estudos em meio líquido (Figura 7).

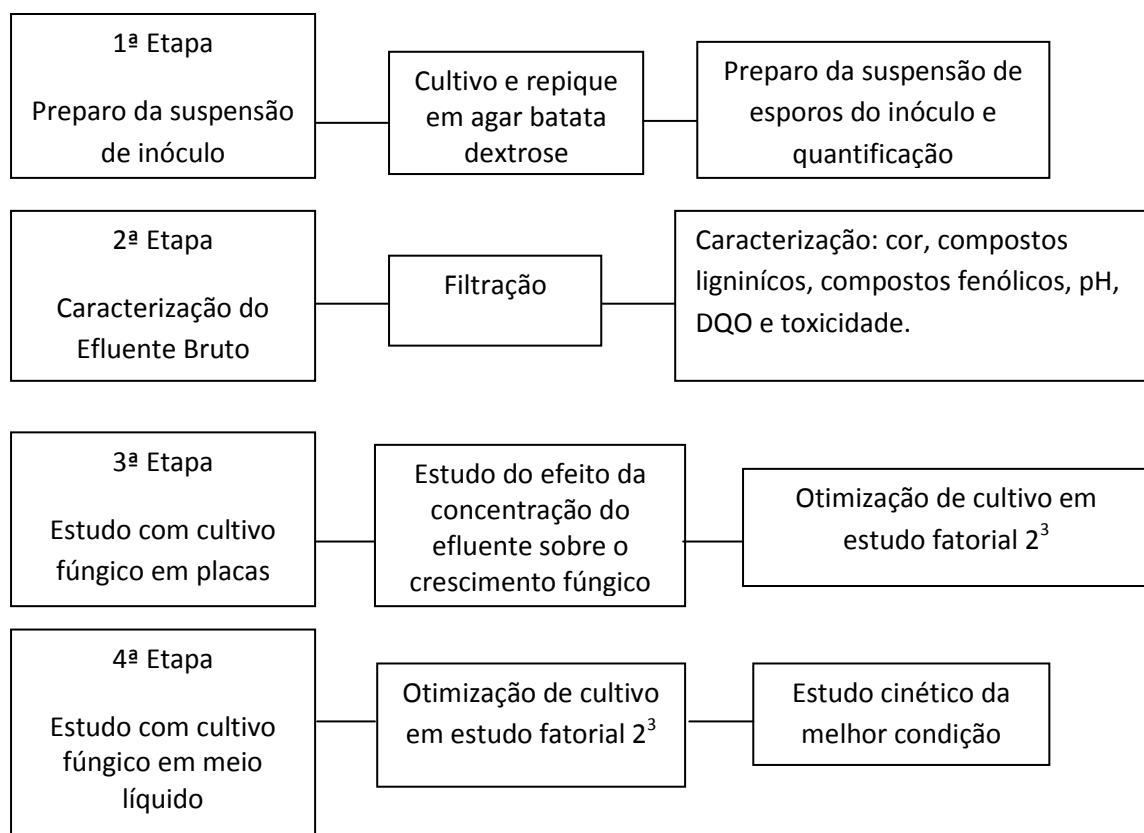


Figura 7 – Etapas desenvolvidas nesta pesquisa.

4.1 MICRORGANISMOS

Os basidiomicetos lignolíticos usados neste trabalho foram obtidos do banco de cepas do laboratório de Microbiologia: *Phanerochaeta chrysosporium* ATCC 24725, *Pleurotus ostreatus* POS 560, LMB-CF e LMB – OP. Esses dois últimos não foram identificados porque foram isolados em aulas práticas de biodegradação de corantes, mostrando-se potenciais degradadores de substâncias aromáticas.

Todos os fungos foram repicados e mantidos, em agar batata dextrose (ABD), armazenados em geladeira (aproximadamente 8°C) e repicados a cada três meses. Todo o material utilizado nos experimentos foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1,1 atm por 15 min. Após os estudos tudo era descontaminado nas mesmas condições de temperatura e pressão, porém por 30 min.

4.1.1 Preparo do Inóculo

Os fungos foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura agar batata dextrose (ABD) estéril. Os frascos foram incubados por sete dias em 26°C. Paralelamente, 30 mL de solução salina 1% foi acrescida de 0,2% de tween 80, 2,5 g de pérolas de vidro e uma barra magnética de agitação, sendo o conjunto disposto em tubos de ensaio e autoclavados (SPIER, 2005).

Ao final do cultivo o conteúdo do tubo foi vertido sobre a biomassa fúngica e o conjunto foi mantido em agitador magnético por 15 min em uma rotação que não formasse espuma (SPIER, 2005).

A suspensão de esporos obtida foi imediatamente quantificada item (4.1.2). Segundo Spier (2005) esta suspensão pode ser armazenada em geladeira 6°C por até 30 dias.

4.1.2 Quantificação do Número de Células da Suspensão de Esporos

Os esporos foram quantificados por contagem em câmara de Neubauer (SPIER, 2005) e o valor foi confirmado por contagem em placas, através do plaqueamento em ABD pela técnica do espalhamento em superfície (APHA, 2005 - método 9215C), seguida de incubação a 26°C por 24-48h, para encontrar a quantidade de microrganismos ativos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

A amostra de efluente kraft utilizada neste trabalho foi fornecida por uma indústria de celulose da região de Curitiba. A amostragem ocorreu na calha parshall do sistema de tratamento da empresa, em um único ponto, pelo fato do mesmo ser homogeneizado nesta etapa (HARRIS, 1999).

As amostras foram armazenadas em bombonas de 5 L e colocadas em geladeira (aproximadamente 6 °C), a fim de que não houvesse degradações por luz (fotólise). Como o efluente kraft contém fibras celulósicas remanescentes do processo, foi necessária filtração em papel gramatura de 80 g/m². A caracterização e as análises, feitas com efluente filtrado, foram: compostos fenólicos totais, item (4.7.1), compostos lignolíticos, item (4.7.2), cor, item (4.7.3), pH, item (4.7.4), demanda química de oxigênio (DQO), item (4.7.5) e ensaios toxicológicos com sementes de *Lactuca sativa*, item (4.7.6).

4.3 ESTUDO 1: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EFLUENTE SOBRE A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS

4.3.1 Condições do Experimento

Este estudo foi realizado em placas de petri contendo a mistura de agar agar (1,5%) e efluente em diferentes concentrações de (%): 0, 20, 40, 60, 80 e 100.

As placas foram preenchidas com meio de cultivo em um *lay-out* semelhante ao utilizado em antibiogramas, com poços no centro, conforme procedimento descrito por Ferronato e Salmasso (2010).

O inoculação foi feita nos poços das placas (centralizados), adicionando-se 0,1 mL da suspensão de esporos. A incubação das placas foi feita em estufa (26°C) até que o micélio de qualquer fungo atingisse crescimento próximo à borda a placa, determinando, assim, o final de experimento.

4.3.2 Análises

Ao final do experimento foram avaliados: a velocidade de crescimento e o adensamento micelial dos microrganismos.

O adensamento micelial foi analisado visualmente e registrado através de fotografias.

A progressão fúngica foi acompanhada a cada 24 h. Na parte inferior das placas de petri foram marcados 4 raios (Figura 8), sobre os quais o crescimento micelial foi medido com o auxílio de um paquímetro (COLLA, 2008; FAN; SOCCOL, 2001).

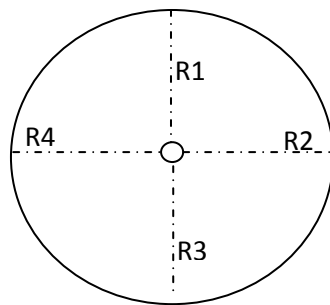


Figura 8 – Representação dos raios de medição em placa.

A velocidade média de crescimento (mm/dia) foi calculada dividindo a média dos 4 raios das triplicatas pelo tempo transcorrido (totalizando 12 medições). Os valores de velocidade média e o desvio padrão foram utilizados na análise estatística dos resultados.

4.4 ESTUDO 2: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM PLACAS DE PETRI

A partir da determinação da faixa de concentração de efluente na qual os fungos apresentavam maior velocidade de crescimento, procedeu-se um delineamento experimental (2^3) com o objetivo de otimizar as condições de cultivo e comparar, novamente, a velocidade do crescimento fúngico.

Os microrganismos foram cultivados em meios sólidos dispostos em placas de Petri, preparados conforme descrito em 4.3.1. As variáveis foram: pH, concentração de efluente e concentração de glicose (Tabela 1).

Tabela 1 - Planejamento fatorial com dois níveis e 3 variáveis, estabelecido para 4 microrganismos, em meio sólido.

Variáveis	Nível (-)	Nível(+)
pH	Sem correção (7,8)	7,0
Glicose (g. L ⁻¹)	0	10
Concentração de Efluente (%)	10	20

Na Tabela 2 pode ser visualizada a matriz do planejamento experimental de cada espécie de fungo. O experimento repetiu as condições e análises descritos em 4.3.

Tabela 2 – Matriz padrão para o planejamento experimental 2³ feito individualmente para cada espécie de fungo

Níveis/ ensaios	pH	Glicose	% Efluente	Resposta
1	-	-	-	Velocidade de crescimento radial
2	+	-	-	
3	-	+	-	
4	+	+	-	
5	-	-	+	
6	+	-	+	
7	-	+	+	
8	+	+	+	

4.5 ESTUDO 3: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO

A partir dos resultados obtidos no Estudo 2, duas espécies de fungo foram selecionadas para o proceder o cultivo submerso.

Um delineamento experimental 2³ foi utilizado para avaliar qual seria a melhor condição de cultivo e a espécie de fungo mais eficiente na biodegradação dos contaminantes presentes no efluente. As variáveis do estudo foram concentração de glicose, concentração de efluente e microrganismo (Tabela 3).

Tabela 3 - Planejamento fatorial com dois níveis e três variáveis, aplicado para otimizar o estudo em meio líquido.

Variáveis	Nível (-)	Nível(+)
Microrganismo	<i>Phanerochaeta chrysosporium</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Glicose (g. L ⁻¹)	Sem glicose	10
Concentração	10	20

de Efluente (%)

Na Tabela 4 pode ser visualizada a matriz do planejamento experimental.

Tabela 4 – Matriz padrão para o planejamento experimental 2³ com os fungos *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaeta chrysosporium*.

Níveis/ ensaios	Fungo	Glicose	% Efluente	Resposta
1	-	-	-	Remoção de compostos lignínicos
2	+	-	-	
3	-	+	-	
4	+	+	-	
5	-	-	+	
6	+	-	+	
7	-	+	+	
8	+	+	+	

Em erlemeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo (Tabela 3) foram inoculados *Phanerochaeta chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus*. A concentração inicial de células de foi de $2,0 \times 10^6$ e $1,6 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, respectivamente.

O estudo foi conduzido em duplicata, em agitador orbital rotativo (*shaker*) em 120 rpm, 26 °C por 10 dias (HENN, 2009; SPIER, 2005).

Ao final do experimento a biomassa microbiana foi filtrada e determinada, item (4.7.9). Em seguida os parâmetros analisados foram: compostos fenólicos totais (4.7.1), compostos lignolíticos (4.7.2), cor (4.7.3), pH (4.7.4), demanda química de oxigênio(DQO) (4.7.5), toxicidade em sementes de *Lactuca sativa* (4.7.6) e glicose residual (4.7.7). (Seções 4.7.1 a 4.7.7, respectivamente).

4.6 ESTUDO 4: ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DO CULTIVO

Nesta etapa foi realizado um estudo cinético da condição com a melhor eficiência de degradação de efluente kraft, obtida no Estudo 3.

O experimento foi conduzido em duplicata, por 10 dias, nas mesmas condições descritas para o Estudo 3, seção (4.5). A cada dois dias foram coletadas amostras e analisadas no mesmo dia (PEREIRA, 2011) em relação a: compostos fenólicos totais (4.7.1), compostos lignínicos (4.7.2), cor (4.7.3), DQO (4.7.4), glicose remanescente (4.7.6), peroxidase (4.7.7.1), lignina peroxidase (4.7.7.2), manganês peroxidase (4.7.7.3), lacase (4.7.7.4) e biomassa (4.7.8). (Seções de 4.7.1 a 4.7.8, respectivamente).

4.7 ANÁLISES

4.7.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

Foi realizada, previamente, uma curva analítica de fenol (Figura 9), com soluções de diversas concentrações conhecidas, no comprimento de onda de 215 nm. Adicionou-se (em béquer de 10 mL) 2 mL de solução tampão de KH_2PO_4 e 2 mL de amostra. A mistura foi homogeneizada e analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 215 nm (APHA, 1995).

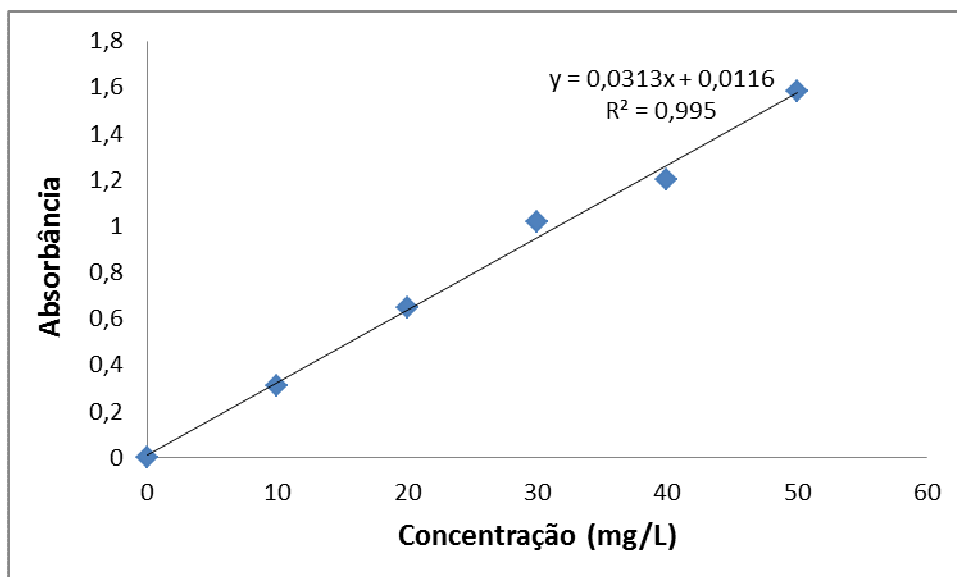


Figura 9 – Curva analítica de compostos fenólicos totais.

4.7.2 Determinação de Compostos Lignolíticos

Com o auxílio de uma micropipeta, foi adicionado em um béquer de 100 mL 5 mL de amostra. O pH foi medido em agitação, através de um pHmetro, previamente calibrado. O pH da amostra foi ajustado para 7,0 com soluções de NaOH e H₂SO₄, com o auxílio de um conta-gotas. A análise ocorreu em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm (APHA,1995) e o cálculo da remoção (%) foi feito conforme equação (1)

$$\text{Remoção (\%)} = ((E1 - E2) * 100) / E1 \quad (1)$$

Sendo, E1 absorvância efluente bruto, E2 absorvância efluente tratado.

4.7.3 Determinação de Cor

Com o auxílio de uma micropipeta, adicionou-se 5 mL da amostra, em um béquer de 100 mL. O pH foi medido em agitação, através de um pHmetro, previamente calibrado. Ajustou-se o pH da amostra para 9,0 com soluções de NaOH e H₂SO₄, com o auxílio de um conta-gotas. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 440 nm (APHA, 1995), segundo equação (1).

4.7.4 Determinação do pH

O pH das amostras foi medido com o auxílio de um pHmetro da marca BEL, previamente calibrado, com soluções tampão pH 4 e 7.

4.7.5 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Foi preparada uma curva de calibração com soluções de diversas concentrações de biftalato, preparadas com solução digestora (10,216g de $K_2Cr_2O_7$, 33,00g de $HgSO_4$, 168 mL de H_2SO_4 em 1000 mL) e catalítica (10,7g de $AgSO_4$ em 1000 mL de H_2SO_4 concentrado). Com o auxílio de uma micropipeta, foram adicionados em tubos de amostra de 10 mL, 2 mL de amostra, 2 mL de solução digestora e 2 mL de solução catalítica, nesta ordem. Os tubos foram, então, colocados, com as determinadas misturas, no digestor por 2 horas a 148 C. Após o período de digestão das amostras, estas foram resfriadas e analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm (APHA, 1995).

4.7.6 Ensaios Toxicológicos Crônicos com Sementes de *Lactuca sativa*

Dez sementes de alface foram colocadas em placa de Petri, com o papel filtro no fundo. Foram adicionados 5 mL de soluções com porcentagens diferentes de efluente: 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%. Assim, da mesma forma que o teste preliminar, as placas foram envoltas por papel filme e levados a incubadora por 5 dias a 24,5 °C. Então, após retiradas da incubadora, foram verificados os comprimentos das raízes, obtendo assim, o índice de crescimento relativo (ICR), assim como, a taxa de germinação das radículas (IG), em cada concentração. O estudo foi feito em triplicata e o método foi baseado no protocolo 850.4200 (USEPA, 1996).

Com o (ICR) e o (IG) calculados conforme equações 2 e 3 (YOUNG et al.; 2011):

$$ICR = (CRA/CRC) \quad (2)$$

$$IG = (CRA \times RGA \times 100)/(CRC \times RGC) \quad (3)$$

sendo, CRA comprimento da raiz na amostra (mm), CRC comprimento da raiz no controle (mm), RGA número de raízes germinadas na amostra e RGC= número de raízes germinadas no controle.

4.7.7 Determinação de Glicose

Preparou-se uma curva analítica com concentração de 0 a 2 g/L. As amostras foram analisadas através do método de DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico) (ESPOSITO, 1995), onde 0,5 mL de DNS foi misturado com 0,5 mL de amostra. Então, a amostra foi aquecida até sua fervura por 5 minutos, sendo posteriormente resfriada, em banho de gelo e acrescida de 5 mL de água deionizada. A amostra foi analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm, sendo verificada a plotagem da absorbância na curva analítica, caso a absorbância da amostra não ficasse na região determinada da curva, a amostra era diluída, quando necessário, até que aquela tenha um valor plotado nesta (GARCIA, 2009).

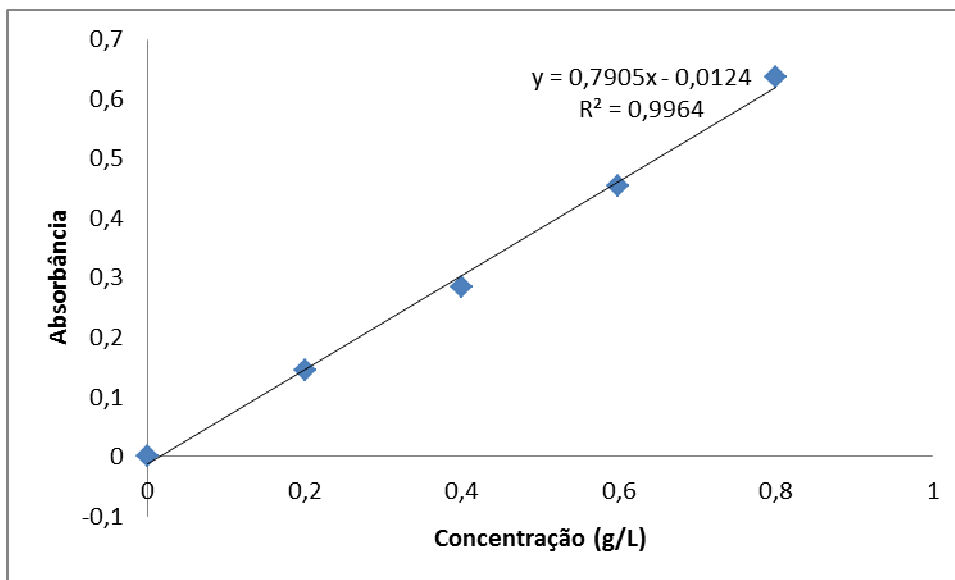


Figura 10 – Curva analítica de glicose.

4.7.8 Determinação de Enzimática

As atividades das enzimas: peroxidase, Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase e Lacase foram determinadas em triplicata e em espectrofotômetro (PEREIRA, 2011). Utilizou-se a equação 4 para determinar a atividade enzimática das amostras:

$$UI/L = (\Delta Abs / \square \times R \times t) \times 10^6 \quad (4)$$

Onde:

UI/L = Unidade Internacional, onde internacional significa micromol por minuto

ΔAbs = (Absorbância final – Absorbância inicial)

\square = Coeficiente de absorção molar

R = Volume da solução da amostra (mL)

t = tempo de reação (minutos)

10^6 = Conversão da medida para litro

Coeficientes de absorção molar:

Peroxidase (525 nm) = 65000 (Peroxidase)

Manganês Peroxidase (610 nm) = 4460 (MnP)

Lacase (525 nm) = 65000 (Lacase)

Lignina peroxidase (310 nm) = 9300

4.7.8.1 Atividade de Peroxidase

Centrifugou-se 0,6 mL de meio. Adicionou-se a este meio em um tubo que continha: 0,6 mL de tampão citrato fosfato 0,05 mol/L, 0,1 mL de seringaldazina, 1,0

mmol/L em etanol absoluto e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 2,0 mmol/L. Após o período de 10 minutos, a mistura foi analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm (SZKLARZ et al., 1989).

4.7.8.2 Atividade de Lignina Peroxidase

Procedeu-se a mistura de 0,25 mL do meio de cultivo com; 0,8 mL de tampão tartarato de sódio 0,33 mol/L (pH 3,0); 0,45 mL de água destilada; 0,125 mL de solução de álcool veratrílico 4 mmol/L e 0,50 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 10 mmol/L. Depois de 10 minutos a 40 °C a amostra foi analisada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 310 nm (HENN, 2009; TIEN; KIRK, 1984).

4.7.8.3 Atividade de Manganês Peroxidase

O volume de 0,5 mL de amostra foi adicionado a 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 mol/L; 50 mL de sulfato de manganês (MnSO_4) 2,0 mmol/L; 50 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual foi preparado em tampão succinato de sódio 0,2 mol/L (pH 4,0) a 2,0 mmol/L; 0,2 mL de albumina bovina 0,5% e 0,1 mL de vermelho de fenol (0,1%). Assim, após, 5 minutos de reação, a qual é interrompida pela adição de 40 microlitros de hidróxido de sódio (NaOH), com a amostra aquecida a 30 °C, a amostra foi analisada em comprimento de onda de 610 nm, no espectrofotômetro (KUWAHARA et al., 1984).

4.7.8.4 Atividade de Lacase

A análise foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525 nm. Primeiramente, centrifugou-se o meio para análise e adicionou-se 0,6 mL de meio a

0,1 mL de seringaldazina 1,0 mmol/L em etanol absoluto, 0,1 mL de água deionizada e 0,6 mL de tampão citrato fosfato a 0,05 mol/L. Esperou-se 10 minutos para a reação ocorrer e então procedeu-se a leitura (SZKLARZ et al., 1989).

4.7.9 Determinação da Biomassa Micelial

Afim de determinar a biomassa dos micélios desenvolvidos pelos fungos no decorrer do experimento, 50 mL de meio contendo os micélios foram filtrados em papel Whatman nº 1, previamente seco (60 °C por 24 h), lavados com uma porção de 50 mL de água deionizada e colocado sobre um papel filtro. O conjunto papel filtro + micélio foi colocado em estufa por 48 horas a 60 °C e pesado em balança analítica, como o papel filtro sem micélio (RUEGGER, 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

5.1.1 Análises Físico-Químicas

Os valores de cor mostram relevante variação entre os estudos comparados na Tabela 5. No efluente caracterizado neste estudo percebe-se maior cor, compostos lignínicos e compostos fenólicos totais do que os demais. A cor de efluentes da indústria papelreira é composta por compostos lignínicos e por taninos, os quais são difíceis de serem degradados (ASSALIN; DURÁN, 2013).

Tabela 5 – Valores e parâmetros de caracterização do efluente kraft.

Parâmetros residuais	Valores determinados neste trabalho	KLENK et al. (2012)	VANZETTO (2012)	VANZETTO; ROSA; XAVIER (2012)
Cor (VIS, 440)	0,70 ± 0,01	0,20	0,57 ± 0,23	0,41
DQO (mg O ₂ /L)	835,99 ± 3,04	969,6 ± 8,6	767,6 ± 375,4	823 - 1942
Lignínicos (UV, 280)	4,41 ± 0,06	2,92 ± 0,02	3,53 ± 0,58	-
Compostos fenólicos totais (mg/L)	428,58 ± 35,81	409,0 ± 27,5	-	190 - 350
Sólidos Suspensos (mg/L)	-	6,88 ± 1,8	-	37 - 296
Sólidos Suspensos Voláteis (mg/L)	-	3,59 ± 0,8	-	-
pH	7,8 ± 0,5	7,26 ± 0,02	8,7 ± 0,7	3,4 - 10,6

Nota: DQO= Demanda química de oxigênio; VIS= Comprimento de onda no visível; UV=Comprimento de onda no ultravioleta.

Os dados da Tabela 5 mostram a grande variação entre os efluentes, porque estas características são influenciadas pela matéria-prima, pelo processo, entre outros.

5.1.2 Ensaio Toxicológico com Sementes de Alface

Em relação aos valores de índice de germinação (Tabela 6) verifica-se o decréscimo de valores com o aumento da concentração do efluente. Na concentração de 25% o efluente causou inibição da germinação superior a 30%, em relação ao controle. O mesmo não foi observado em relação ao índice de crescimento (ICR) que, segundo Young et al. (2011), quando o estiver entre 0,8 e 1,2 o efluente não apresenta toxicidade crônica relevante para *Lactuca sativa*.

Esta divergência entre os índices de IG e ICR significa que o ensaio avalia dois processos (germinação e alongamento da raiz) que podem apresentar sensibilidade aos diferentes compostos e em diferentes níveis.

Tabela 6 – Valores de índice de crescimento relativo e índice de germinação do efluente bruto.

Concentração Efluente (%)	ICR	IG	Inibição da germinação (%)
100	0,93 ±0,05	42,33 ±8,76	57,67
50	0,97 ±0,06	63,08 ±3,19	36,92
25	1,06 ±0,06	68,40 ±3,38	31,60
12,5	1,11 ±0,14	99,88 ±12,52	0,12
6,25	1,32 ±0,01	112,13 ±8,86	- 12,13

ICR: índice de crescimento relativo. IG: índice de germinação

5.2 ESTUDO 1 (E1): EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EFLUENTE SOBRE A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS.

Observando os valores da Tabela 7, foi verificado que todos os fungos obtiveram o melhor crescimento na ausência do efluente, quando cresceram utilizando ágar como fonte de nutrientes. O ágar consiste de uma mistura de agarose e agarpectina, extraído de algas vermelhas, comumente utilizado em microbiologia para a solidificação dos meios de cultivo, porque bactérias e a maioria dos fungos não é capaz de utilizá-lo como fonte de carbono.

Tabela 7 – Velocidade média e desvio padrão do crescimento radial dos fungos cultivados em efluente kraft solidificado com 1,5% de agar.

Efluente (%)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>		<i>Pleurotus ostreatus</i>		Fungo CF		Fungo OP	
	Velocidade (mm/dia)	Redução (%)	Velocidade (mm/dia)	Redução (%)	Velocidade (mm/dia)	Redução (%)	Velocidade (mm/dia)	Redução (%)
0	7,47 ± 0,44		6,04 ± 0,41		6,18 ± 0,17		3,97 ± 0,41	
20	3,20 ± 0,27	57,1	3,78 ± 0,29	37,4	5,58 ± 0,59	9,7	1,62 ± 0,33	59
40	1,33 ± 0,63	58,4	2,71 ± 0,44	28,3	2,57 ± 0,30	53,9	0,00	100
60	0,39 ± 0,15	70,7	2,23 ± 0,49	17,7	1,86 ± 0,49	27,6	0,00	
80	0,00	100	2,34 ± 0,21	0	1,03 ± 0,36	44,6	0,00	
100	0,00		1,24 ± 0,69	47,0	0,66 ± 0,24	35,9	0,00	

A redução observada na velocidade de crescimento quando o meio foi acrescido de 20% de efluente (57% para *Phanerochaete chrysosporium*, 37% para *Pleurotus ostreatus* e 59% para o fungo OP) muito provavelmente foi consequência da presença de compostos tóxicos, porque o valor do pH desta condição estaria próximo daquele da água de preparo de meios (pH 7,0). O fungo CF apresentou estagnação da velocidade de crescimento na concentração de 40% de efluente.

Interessante observar que também houve 32% redução da germinação para *Lactuca sativa* em efluente com concentração de 25% (Tabela 6). Estes resultados indicaram que a sequência de experimentos deveria ser feita com cultivos fúngicos contendo até 20% de efluente. Esta concentração está de acordo com o valor

utilizado no estudo de Massai (1996), que cultivou *Lentinus edodes* em efluente kraft 20%.

Foi interessante observar (Tabela 7) que *Pleurotus ostreatus* e o fungo - CF apresentaram crescimento em efluente bruto; contudo, apesar do crescimento, percebeu-se que a biomassa formada era pequena (Figura 11), consequência da falta de nutrientes e toxicidade.

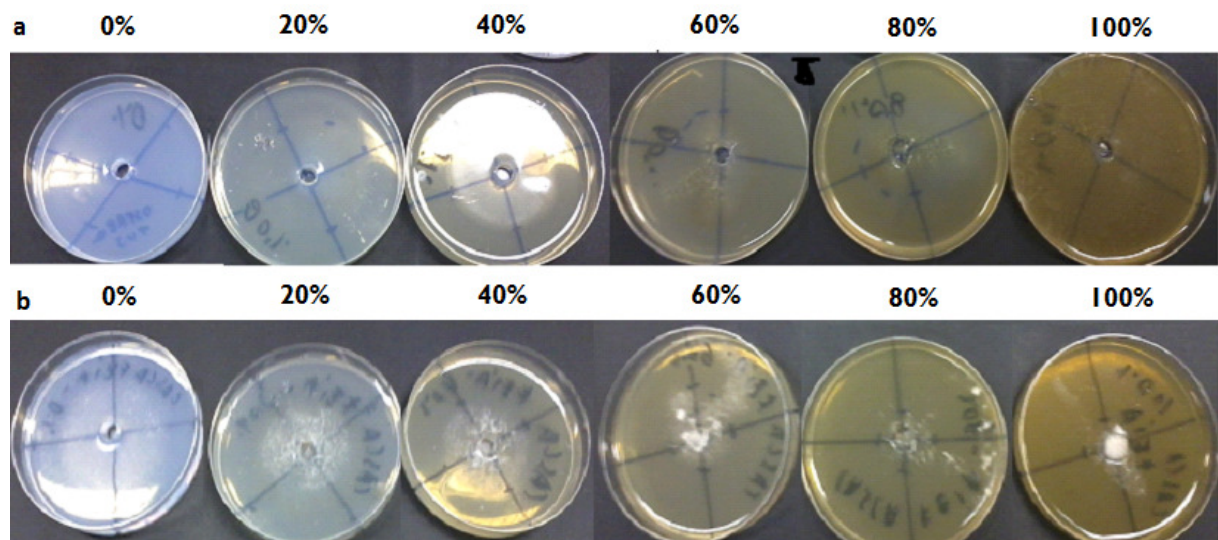


Figura 11 – Placas de petri dos cultivos de *Pleurotus ostreatus* (a) e fungo – CF (b) após 5 dias de cultivo em 26°C, em meio com concentrações crescentes de efluente kraft (0, 20, 40, 60, 80 e 100%)

5.3 ESTUDO 2 (E2): OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM PLACAS DE PETRI

A Tabela 8 mostra os resultados das velocidades de crescimento mensuradas durante a otimização do cultivo em meio sólido.

Tabela 8 – Velocidades de crescimento dos ensaios em planejamento fatorial, com 2 níveis e 3 variáveis.

Níveis	pH	Glicose (g/L)	Efluente (%)	Velocidade de crescimento (mm/dia)			
				<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Fungo CF	Fungo OP
1	8,0	0	10	3,83± 0,75	5,13±0,56	2,84 ±0,43	0,83±0,30
2	7,0	0	10	3,12± 0,74	5,00±0,53	2,83± 0,52	1,82±0,42
3	8,0	10	10	6,60± 0,47	6,30±1,96	2,91± 0,46	2,13±0,40
4	7,0	10	10	9,96± 0,46	5,86±0,83	2,85± 0,34	2,30±0,50
5	8,0	0	20	2,68± 0,64	3,37±0,24	1,72± 0,56	0,77±0,29
6	7,0	0	20	2,20± 0,70	4,07±0,79	2,32± 0,52	1,41±0,30
7	8,0	10	20	7,28± 1,13	4,98±0,54	2,50± 0,47	0,91±0,45
8	7,0	10	20	9,85± 0,47	5,53±0,50	2,83± 0,44	2,52±0,42

pH -: pH sem correção (8,0)

O nível 5 deste estudo repete a condição de crescimento do estudo 1 - com concentração de 20% de efluente, sem adição de glicose e com pH sem correção. Os resultados de velocidade de crescimento (mm/dia) se repetiram entre os dois estudos para *Phanerochaete*, sendo E1= Efeito de diferentes concentrações de efluente sobre a velocidade de crescimento dos microrganismos e E2= Otimização das condições de cultivo em placas de petri . (E1= 3,20 ±0,27 (mm/dia) ; E2= 2,68± 0,64 (mm/dia)) e *Pleurotus* (E1= 3,78± 0,29 (mm/dia); E2= 3,37±0,24 (mm/dia)), indicando confiabilidade e repetibilidade dos resultados.

Contudo, o mesmo não ocorreu para os fungos CF (E1 = 5,58 (mm/dia); E2= 1,72 (mm/dia) e OP (E1= 1,62 (mm/dia); E2= 0,77 (mm/dia). Pelo fato dos melhores resultados terem sido encontrados no primeiro experimento, supõem-se que algumas células do inóculo tenham morrido durante o armazenamento em geladeira (aproximadamente 8°C), até a realização do segundo estudo. Este dado está em desacordo com Spier (2005), que afirma que o inóculo pode ficar armazenado em geladeira por até 30 dias, sem diminuir a viabilidade celular. O estudo de Spier (2005) foi realizado com *Aspergillus* e *Rhizopus* e, neste sentido, outros estudos com os fungos OP e CF devem reavaliar esta variação durante o armazenamento.

Percebe-se nitidamente que a adição de glicose favorece a velocidade de crescimento de *Phanerochaete chrysosporium*, assim como o ajuste do pH para 7 (Tabela 8). Para este fungo a otimização aumentou a velocidade de crescimento (mm/dia) em cerca de três vezes nas duas concentrações de efluentes estudadas (10% = 3,83 para 9,96; 20% = 2,68 mm/dia para 9,85 mm/dia). Segundo teste de Tukey, não foram observadas diferenças significativas entre os valores para as concentrações de 10% e 20% de efluente.

Segundo a análise estatística não se observou o efeito da otimização na velocidade de crescimento do *Pleurotus ostreatus* e do Fungo CF.

Para todos os testes foi utilizado um nível de confiabilidade de 95%, ou em outras palavras, um nível de significância de 0,05. Sendo as hipóteses testadas: H_0 : As médias de crescimento dos fungos são iguais para todas as espécies de fungos e meios de cultivo. H_1 : A média é diferente para pelo menos um dos casos.

Pela análise estatística (Tabela 9) verifica-se que todas as interações são significativas, com exceção da interação Efluente x pH, porém o valor de p está muito próximo de 0,05.

Tabela 9: Análise estatística ANOVA.

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau Liberdade	Média quadrática	Estatística F	Valor de P
Fungo	713,6230	3	237,8740	376,7900	<u>0,0000</u>
Efluente	24,9126	1	24,9126	39,4600	<u>0,0000</u>
Glicose	237,0830	1	237,0830	375,5400	<u>0,0000</u>
pH	26,8195	1	26,8195	42,4800	<u>0,0000</u>
Fungo x Efluente	7,4728	3	2,4909	3,9500	<u>0,0090</u>
Fungo x Glicose	275,1930	3	91,7311	145,3000	<u>0,0000</u>
Fungo x pH	13,0724	3	4,3575	6,9000	<u>0,0002</u>
Efluente x Glicose	4,3056	1	4,3056	6,8200	<u>0,0096</u>
Efluente x pH	2,2763	1	2,2763	3,6100	0,0588
Glicose x pH	8,9551	1	8,9551	14,1800	<u>0,0002</u>
Resíduos	149,6220	237	0,6313		
Total	1463,3400	255			

Negrito: Valores significativos

O gráfico da Figura 11 apresenta uma comparação dos crescimentos dos fungos estudados, em diferentes condições propostas no planejamento fatorial.

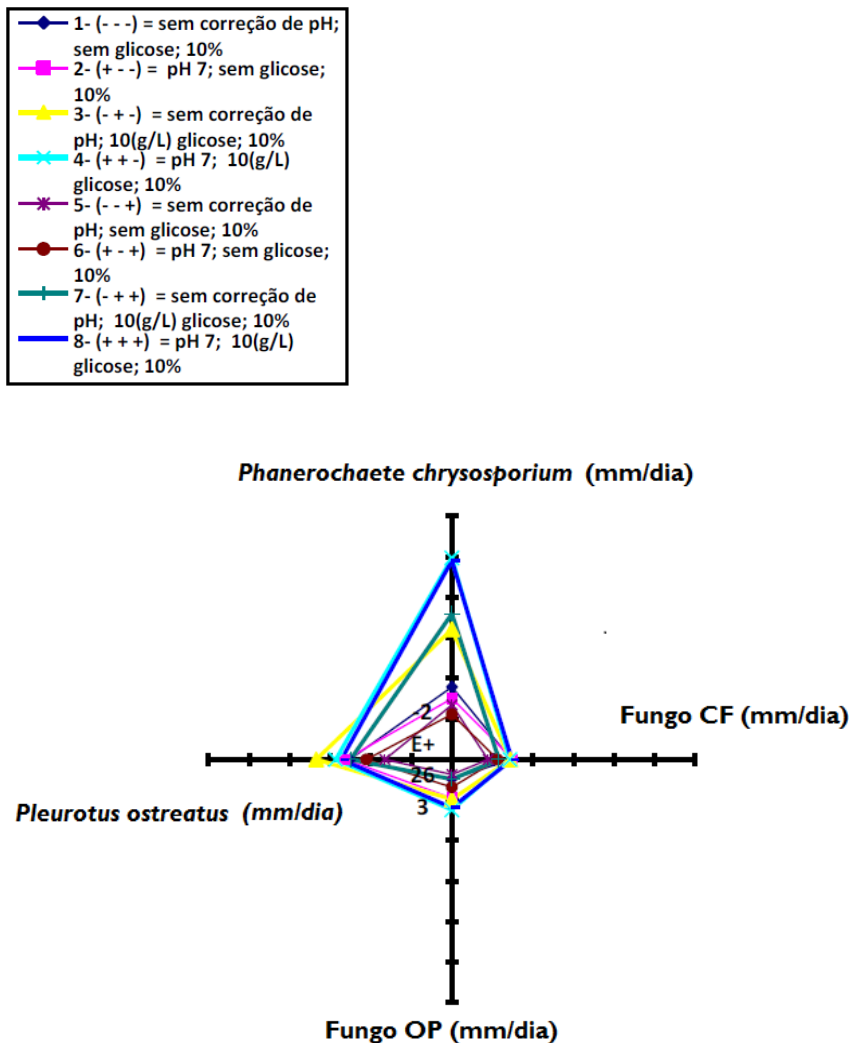


Figura 12 - Velocidade de crescimento dos fungos individualmente, obtidas em meio solidificado otimizado por planejamento fatorial 2^3 .

Observando o gráfico da Figura 12, verifica-se que os fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus* têm o melhor potencial de adaptação e crescimento em efluente kraft com as maiores velocidades de crescimento.

Borderes; Siqueira; Tavares, (2013) determinou 6,79 mm/dia de crescimento micelial do *Pycnoporus Sanguíneus* na presença de um resíduo do processamento da palmeira-real-da-Austrália, a 25°C por 7 dias, com adição de amido de mandioca e soja. Andrade (2007) obteve o valor de 9,19 mm/dia com cultivo de *shitake* com extrato de clones e várias linhagens de eucalipto, durante 10 dias, a 25°C.

Os fungos *Phanerochaeta chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus* se desenvolveram melhor nas condições observadas e não apresentaram diferença significativa na velocidade de crescimento com efluente 10 ou 20%, adicionado de glicose e com pH 7,0. Por isso estes foram os microrganismos escolhidos para a continuidade dos estudos.

O acompanhamento da velocidade do crescimento micelial pode não estar relacionada com maior biodegradação do efluente, porque os microrganismos podem simplesmente tolerá-lo. A análise da biodegradação é mais acertiva através do cultivo destes dois organismos em meio líquido otimizado, objeto de análise do próximo estudo.

5.4 ESTUDO 3: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO

Este experimento repete o estudo 2, com a diferença de ter sido conduzido em meio líquido, possibilitando análises físicas e químicas mais abrangentes. A Tabela 10 contém, em planejamento fatorial, os valores correspondentes de remoção, em porcentagem, de quatro parâmetros de qualidade de efluentes.

Durante a realização das análises mencionadas na Tabela 10 percebeu-se que os resultados de remoção muitas vezes deram valores negativos, como se houvesse produção de cor e fenóis, por exemplo. Nestes casos foram adotados os valores de “zero” para remoção. Isto pode ter acontecido porque compostos aromáticos ao serem biodegradados formam frações menores, que interferem nos resultados. Beg, Zafar e Sfiah (1986) observou o mesmo em relação à lignina em seu estudo de biodegradabilidade do arroz por *Pleurotus ostreatus*. Ele explica que esta “produção de lignina” durante o experimento foi consequência da degradação de polissacarídeos que fizeram com que frações glicídicas fossem liberadas no meio. Ruas (2008) estudou a degradação de efluente kraft em lodo ativado e constatou que compostos intermediários presentes no efluente podem ser produzidos por ação de microrganismos, causando interferência no método espectrofotométrico.

Tabela 10 – Resultados das análises da otimização em meio líquido, com planejamento fatorial 2³.

Condições dos experimentos									
Nível	Espécie de fungo	Glicose (g/L)	Efluente (%)	Fenol (%)*	Cor (%)*	DQO (%)*	Lignínicos (%)*	Biomassa (mg)	Glicose Consumida (g)
1	<i>Phanerochaeta</i>	0	10	0	0	0	41,7 ±10,2	12,2 ± 2,9	-
2	<i>Pleurotus</i>	0	10	0	0	0	0	16,6 ± 1,1	-
3	<i>Phanerochaeta</i>	10	10	0	5,8 ±0,4	8,2 ± 5,1	34,5 ±0,3	17,0 ± 0,9	0
4	<i>Pleurotus</i>	10	10	14,9 ± 4,7	75,9 12,5	38,6 ±22,0	64,0 ±8,5	34,7 ± 1,4	0,38 ±0,03
5	<i>Phanerochaeta</i>	0	20	0	0	33,8 ±1,2	38,2 ±1,0	15,7 ± 0,6	-
6	<i>Pleurotus</i>	0	20	0	0	0	0	15,7 ± 0,6	-
7	<i>Phanerochaeta</i>	10	20	0	8,4 ± 2,7	53,2 ±23	40,5 ±3,7	23,1 ± 1,3	0
8	<i>Pleurotus</i>	10	20	9,2 ± 7,2	64,5 ±27,5	66,3 ±1,5	41,2 ±4,7	38,7 ± 1,7	0,36 ±0,10

Glicose 10g/L = 1 g em cada frasco do experimento (100mL).

(%)*: remoção obtida (%)

A análise estatística foi prejudicada pelos resultados de remoção nulos ou negativos. Pela ANOVA (Tabela 11) verifica-se que somente a interação entre a espécie de fungo e glicose é significativa, pois o valor de p é menor que 0,05. Neste caso a concentração de efluente não alteraria as médias de remoção de compostos lignínicos, o que não pode ser verdadeiro. O gráfico da Figura 13 mostra como o resultado estatístico foi influenciado e tornou-se tendencioso. Por isso, a análise dos dados não pode ser concluída estatisticamente. Para corrigir este problema sugere-se que novos estudos sejam realizados.

Tabela 11: Resultado da análise estatística ANOVA para o delineamento experimental em meio líquido

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média quadrática	Estatística F	Valor de P
Fungo	295,8400	1	295,8400	4,8900	0,0544
Glicose	3404,7200	1	3404,7200	56,2600	0,0000
Efluente	10,5625	1	10,5625	0,1700	0,6859
Fungo x Glicose	3887,5200	1	3887,5200	64,2300	0,0000
Fungo x Efluente	30,8025	1	30,8025	0,5100	0,4937
Glicose x Efluente	3,2400	1	3,2400	0,0500	0,8222
Resíduos	544,7000	9	60,5222		
Total	8177,3900	15			

Negrito: Valores significativos

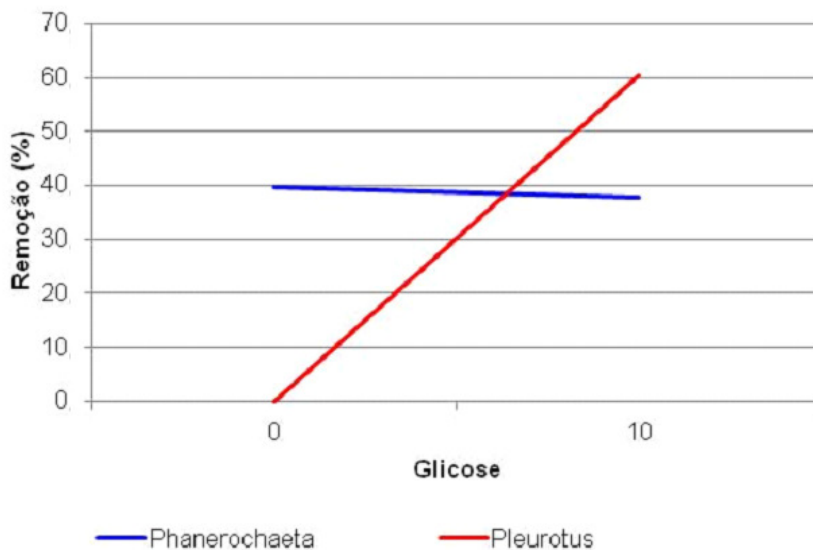


Figura 13 - Remoção de compostos lignínicos.

Observando os resultados da Tabela 10 percebe-se que sem a adição de glicose o *Pleurotus ostreatus* não promoveu a remoção de qualquer parâmetro do efluente e manteve a biomassa em cerca de 16 mg/mL. Garcia (2009) estudou a degradação de organoclorados 2-4, diclorofenol e 2,4,6 triclorofenol por *Pleurotus*

ostreatus com a adição de glicose, e observou o aumento do crescimento micelial com o consumo de glicose no meio. Gern (2005) observou o comportamento do crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus*, em diferentes concentrações de extrato de trigo adicionado de glicose nas concentrações: 5, 10, 15 e 20 (g/L) e observou que a produção de biomassa aumentava com o aumento da concentração de glicose.

Observou-se que a maior remoção dos parâmetros cor, compostos lignínicos, fenol e DQO (Tabela 10) foram obtidas em cultivo de *Pleurotus ostreatus*, com glicose, variando a concentração de efluente entre 10% e 20%. A adição de glicose favoreceu o desenvolvimento micelial, mesma relação observada em meio sólido (Tabela 8). O aumento da biomassa foi acompanhado de consumo de glicose e maior remoção de contaminantes, provável consequência da secreção de enzimas necessárias à biodegradação dos compostos presentes no efluente.

Pleurotus ostreatus foi investigado no trabalho de Silva et al. (2009) quanto à capacidade em degradar 2,4-diclorofenol, importante poluente encontrado nos efluentes da indústria de papel e celulose. A melhor taxa global de degradação foi obtida usando-se 30 mg/L de 2,4-diclorofenol na ausência de glicose, com remoção de 54,1%. A divergência quanto à adição de glicose indica a necessidade de estudos específicos para cada tipo de efluente e, também, a diferença que pode ser observada quando se trabalha com efluentes industriais.

Mesmo sem adição de glicose, *Phanerochaete chrysosporium* foi capaz de diminuir os compostos lignínicos de efluente kraft em cerca de 40%, em todas as condições estudadas (Tabela 10). Nos cultivos deste fungo observou-se que a adição de glicose favoreceu a formação de biomassa, corroborando com o dado observado no Estudo 2 (Tabela 8); contudo, a maior produção de biomassa não promoveu expressiva redução dos compostos analisados. A cor em efluente 20% foi o único parâmetro que teve aumento de 10% na remoção.

Cunha et al. (2012) utilizaram o fungo *Phanerochaete chrysosporium* em biorreatores com adição de glicose (1 g/L) para degradar o corante vermelho do congo e observaram que a adição melhorou significativamente a biodegradação.

De acordo com o observado, Ding et al. (2007) verificaram que a limitação de nutrientes no cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* faz com que ele produza mais ligninase. Bumpus; Powers; Sun, (1993) mostraram que este fungo é um excelente mineralizador de DDE, produto da degradação de DDT(diclorodifeniltricloroetano) em condições de falta de nitrogênio.

Observando a Figura 14 percebe-se que o fungo *Pleurotus ostreatus* mostrou-se um bom degradador de efluente kraft, superando *Phanerochaete chrysosporium*, o qual apresentou maior velocidade de crescimento em meio sólido adicionado de glicose (estudo 2). Isto demonstra não haver correlação entre a biodegradação e a velocidade de crescimento em meio sólido, que é influenciada pela presença do agar (1,5%) nos meios de cultivo.

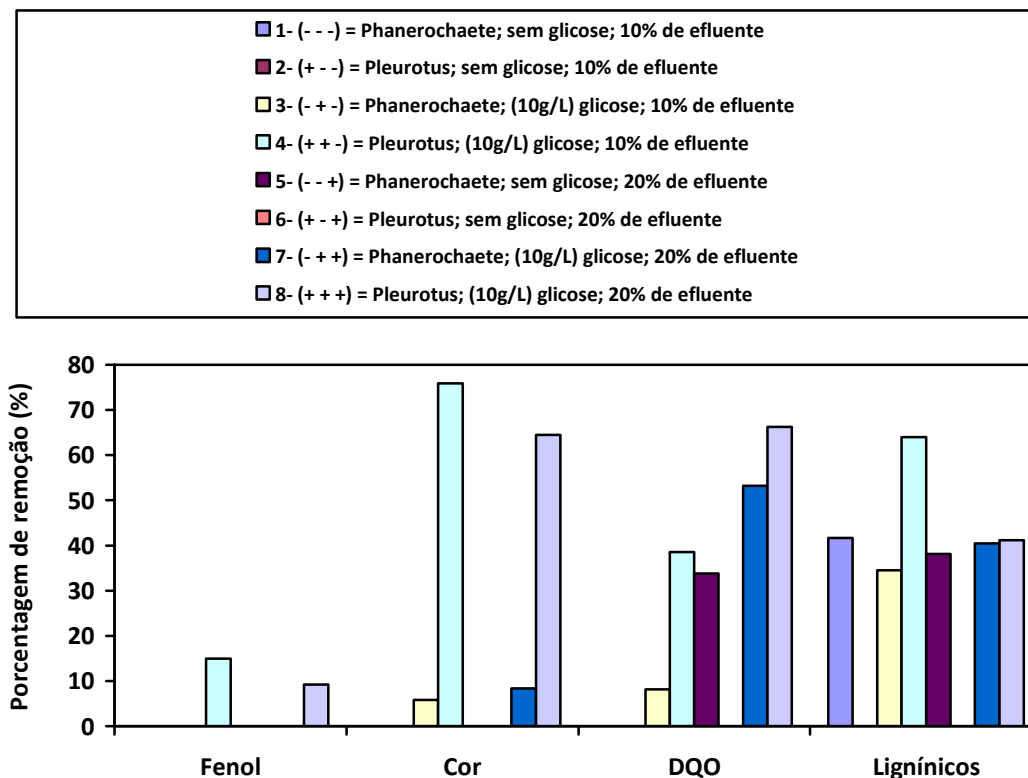


Figura 14 – Remoção dos compostos tóxicos, em meio líquido, com planejamento fatorial 2^3 (em porcentagem).

Darwish et al., (2012) estudando o crescimento dos fungos *Pleurotus ostreatus* e *Saccharomyces cerevisiae* numa mistura de talos de milho (com incubação de 7 dias a 28°C), obteve valores de remoção de lignina de 24% a 55% e de polifenóis entre 34% a 40%. Beg, Zafar e Shalr (1986) num estudo sobre a biodegradação de casca de arroz com *Pleurotus ostreatus* observou uma remoção de 41% de lignina. Munari (2013) cultivou *Pleurotus sajor-caju*, em efluente da indústria papelreira e conseguiu 58,9% de remoção de compostos fenólicos totais. Neste presente estudo *Pleurotus ostreatus* promoveu a remoção de 64% dos compostos ligninicos do efluente kraft 10% e 41% para efluente 20%.

Um fator que não foi considerado separadamente neste estudo foi a biossorção. De acordo com Lopes (2012) a biossorção é um fenômeno onde compostos tóxicos são acumulados pela biomassa micelial, removendo compostos do efluente, processo também observado em estações de tratamento de efluentes.

A maior remoção de DQO deste presente estudo foi de 66,3%, tendo ocorrido com *P. ostreatus* cultivado em efluente 20% acrescido de glicose (10g/L). No estudo desenvolvido por Ruas (2008), em que luz UV e Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram empregados após um tratamento preliminar anaeróbico em efluente kraft, foram encontrados valores de remoção de DQO de 61%. Neto (2002) trabalhando com fotocatalise heterogênea, com catalizador de óxido de titânio, observou remoção de 36% de DQO.

Almeida, Assalin e Rosa (2004) obtiveram resultados mais expressivos de redução de DQO (98%) e fenóis (35%) em estudo da degradação de polifenóis em efluente papelreiro por ozonização catalítica combinado com lodo ativado. Assalin e Duran (2013), variando o tempo de detenção hidráulico em lodo ativado convencional, obteve remoção de fenol de 36,3% e 51% de remoção de DQO. Rezende (2011) estudando a degradação de efluente kraft por lodos ativados e biorreator de biofilme em leito móvel, obteve remoções de lignina de 44% e 32%, respectivamente. Já a remoção de fenol alcançou 33% e 26%, também, respectivamente. Cordi (2008) determinou um remoção de 36% de cor no efluente kraft estudado, por degradação através de lodos ativados.

Todos estes resultados mostram que o tratamento desta pesquisa utilizando *Pleurotus ostreatus* mostrou-se promissor, considerando que este é o primeiro estudo e que melhores resultados podem ser conseguidos com outra otimização do processo.

A exploração do desenvolvimento deste microrganismos em biomídias, ou em outros tipos de suportes, é interessante para que o potencial de degradação do fungo seja aumentado. Os fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus* mostraram-se degradadores de compostos lignínicos, muito presentes no efluente kraft, e de compostos de cor. Para os trabalhos futuros seria interessante o estudo da degradação de outros parâmetros do efluente, como DBO, sólidos e outros nutrientes.

5.5 ESTUDO 4: ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DO CULTIVO

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos durante o acompanhamento da cinética de biodegradação de efluente kraft por *Pleurotus ostreatus*, em cultivo adicionado de glicose (10 g/L).

Tabela 12 – Remoção (%) dos parâmetros do efluente, em ensaio cinético.

Efluente	Dia	Fenol	Cor	DQO	Lignínicos
10%	2	0	0	11,4 ±0,6	0
	4	0	32,4 ±5,6	13,8 ±2,8	8,4 ±11,7
	6	52,8 ±7,7	25,5 ±14,5	6,3 ±9,8	11,3 ±7,0
	8	0	61,4 ±8,9	10,9 ±0,5	9,1 ±18,0
	10	0	33,9 ±11,9	0	33,3 ±4,9

Os resultados obtidos no último dia da cinética deveriam ter sido similares àqueles dos níveis 4 e 8 do estudo Anterior (Tabela 10), o que não ocorreu (Tabela 11). Isto indica a necessidade de repetir os experimentos e que a análise destes dados deve ser criteriosa.

As Figuras 15 e 16; e a Tabela 12 mostram os resultados da cinética de 10 dias.

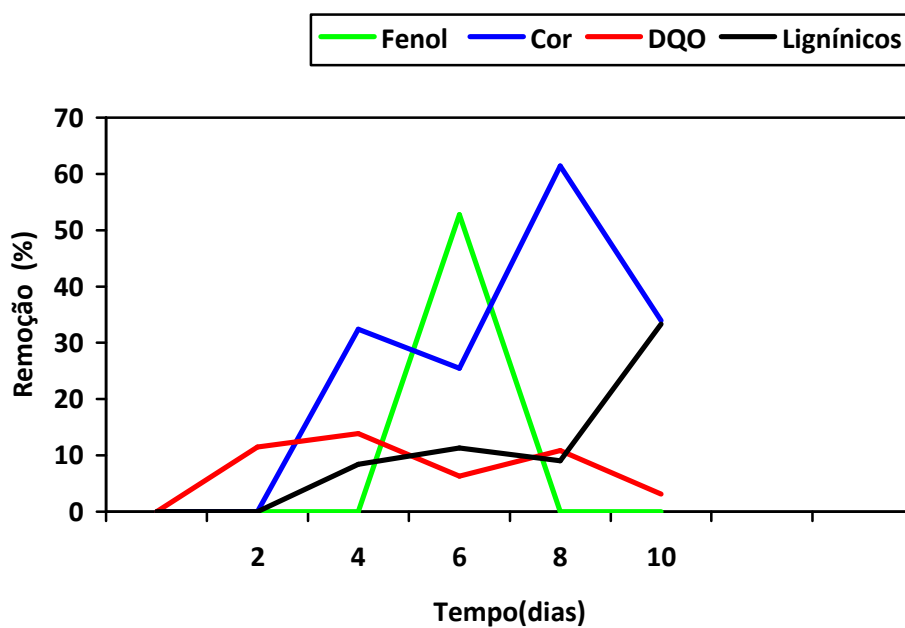


Figura 15 - Acompanhamento cinético em meio líquido a concentração de 10% de efluente Kraft – Monitoramento dos parâmetros de análise.

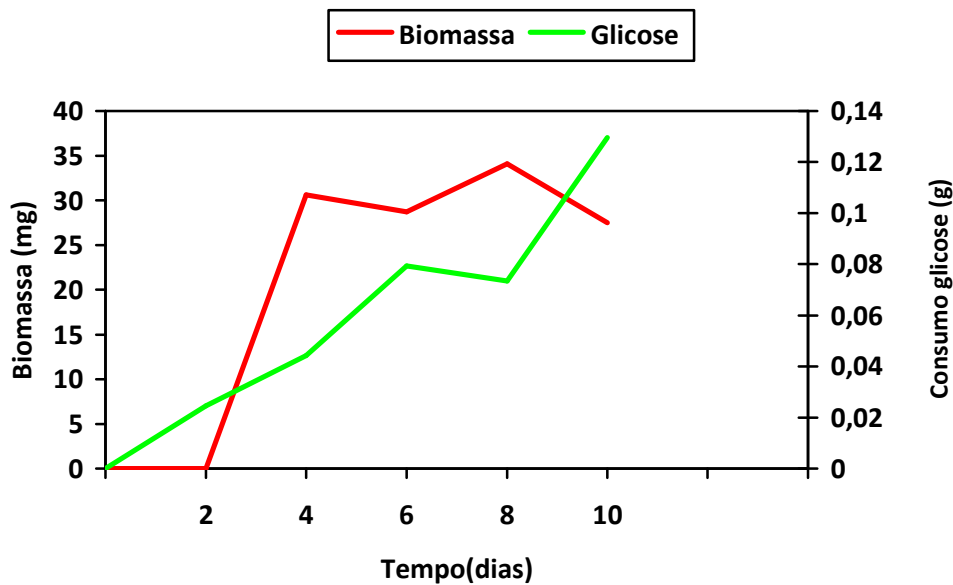


Figura 16 - Acompanhamento cinético em meio líquido a concentração de 10% de efluente Kraft – Monitoramento do desenvolvimento da biomassa e do consumo de glicose.

Na Figura 15 verifica-se que a biomassa microbiana não obteve aumento a partir do quarto dia e que o consumo de glicose acontece durante todo o processo. Já na figura 14, o resultado de remoção de compostos fenólicos foi influenciado pela biodegradação de compostos lignínicos, cujo valor de remoção é considerado zero quando há ascendente remoção de lignina. Pode-se cogitar que durante a degradação de lignina compostos menores (fenólicos, por exemplo) foram sendo formados. E provavelmente estes compostos também influenciaram nos resultados de remoção de cor, que até o quarto dia acompanha a curva de biomassa e a remoção de lignina, mas ao final do experimento é inversamente proporcional a esta.

A Tabela 13 mostra o acompanhamento das enzimas durante a cinética. Percebe-se que Lacase e Peroxidase não foram detectadas. Manganês peroxidase foi a enzima presente em maior concentração.

Tabela 13: Acompanhamento enzimático durante cinética de 10 dias de *Pleurotus ostreatus* cultivado em efluente kraft 10% adicionado de 10g/L de glicose

Dia	Mang(UI/L)	Per(UI/L)	Lign(UI/L)	Lac(UI/L)

2	-5,62±10,99	0,01±0,01	0,11±0,02	0,00 ±0,00
4	0,81±0,60	0,0±0,00	-0,17±0,44	0,00±00,00
6	-0,46±0,61	0,00±0,00	0,09±0,01	0,00± 0,00
8	4,32±0,08	0,0±0,00	0,22±0,15	0,00±0,00
10	3,92±5,37	0,0±0,00	0,02±0,11	0,00± 0,00

Nota: Mang= Manganês peroxidase; Per= Peroxidase; Lign= Lignina Peroxidase e Lac= Lacase.

De acordo com Nerude e Misurcova (1995) a elevada degradação de lignina pelo fungo *Pleurotus ostretatus* está relacionada à capacidade deste fungo em produzir as enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase. Já Agellis, 2003, encontrou a presença de, somente, lacase no ensaio cinético do fungo *Pleurotus Ostreatus*.

6 CONCLUSÃO

A caracterização do efluente mostrou a presença de compostos recalcitrantes (lignínicos) e de difícil remoção (cor e fenólicos), sendo que o estudo com a semente *Lactuca sativa* indicou que na concentração de 25% ocorre diminuição da germinação em, aproximadamente, 30%. Este valor ficou próximo ao observado no estudo do efeito das concentrações do efluente sobre o crescimento microbiano, que mostrou que 20% de efluente causava diminuição na velocidade do crescimento de 57% para *Phanerochaete chrysosporium*, 37% para *Pleurotus ostretatus* e 59% para o fungo OP. O fungo CF apresentou redução na velocidade de crescimento na concentração de 40% de efluente.

Os resultados de velocidade de crescimento (mm/dia) se repetiram entre os dois estudos em meio sólido mostraram repetibilidade para *Phanerochaete* e *Pleurotus*; contudo, o mesmo não ocorreu para os fungos CF e OP, indicando que eles podem ter sido influenciados pelo tempo de estocagem do inóculo.

A otimização da velocidade de crescimento em sólido mostrou maiores valores para *Phanerochaete chrysosporium*, mas os resultados em meio líquido mostraram que a maior biodegradação (% de remoção de compostos) aconteceu pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. Isto significa que a velocidade de crescimento em meio sólido não teve relação com a biodegradação.

Os resultados em meio líquido foram influenciados pela análise espectrofotométrica, provavelmente devido à biodegradação ou biossíntese de compostos no mesmo comprimento de onda dos analisados. Há necessidade de repetição do estudo, pois os resultados negativos, de remoção, inviabilizaram a análise estatística.

Neste contexto os melhores resultados de biodegradação foram obtidos com o fungo *Pleurotus ostreatus*, cultivado em até 20% de efluente kraft e com adição de 10g/L de glicose. Foram obtidos de remoção entre: fenol 9-14%, Cor 64 – 76%, DQO 38 – 66% e lignínicos 41-64%.

O acompanhamento cinético mostrou a produção das enzimas manganês peroxidase e Lignina peroxidase, mas os resultados não foram bons em relação ao do estudo de otimização em meio líquido, mostrando necessidade de novos estudos.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se que sejam feitas mais análises, relacionadas a parâmetros toxicológicos, para observar a resposta, e se esta resposta é mais efetiva do que os outros parâmetros verificados neste trabalho.

Fazer análises para toxicidade aguda, já que foram feitas somente análises de toxicidade crônica, assim como análises crônicas para outros organismos.

Monitorar a atividade do fungo por mais tempo, afim de determinar comportamentos inesperados.

Utilizar fungos não muito estudados, afim de verificar degradações ainda desconhecidas dos fungos lignolíticos, haja vista a grande diversidade que estes fungos têm.

Explorar profundamente a análise estatística, procurando encontrar técnicas ideais para a abordagem do tipo de trabalho.

Estudar o fungo CF, realizando estudos que permitam aprofundar os conhecimentos sobre ele.

Realizar a quantificação dos compostos toxicológicos utilizando outras técnicas de determinação, não espectrofotométricas, como por exemplo, a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Repetir os estudos, afim de verificar a confiabilidade dos resultados não concluídos.

Determinar novos estudos e ensaios, aplicados aos fungos OP e CF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPITO, M.S.M. **Tratamento de efluente de produção de pasta kraft por *Trametes versicolor***. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Gestão Ambiental) – Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.

AGELLIS, G.; ICONOMOU, D.; CHISTOU.M.; BOKAS, D.; KOTZAILIAS, S.; CHRISTOU, G.; TSAGOU, V.; PAPANICOLAOU, S. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. **Water Research**, Nº 37, p. 3897-3904, May, 2003.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Uso de aditivos na biodegradação de madeira pelo fungo *ceriporiopsis subvermispota*: efeito na peroxidação de lipídios dependente de manganês-peroxidase. **Quimica Nova**, Vol. 35, No. 6, p.1107-1111,Jan, 2012.

ALMEIDA, E; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Quimica Nova**, Vol. 27, No. 5, p.818-824, Jul, 2004.

ANDRADE, Meire. C.N. de. **Crescimento micelial, produção e características bromatológicas do shiitake em função de linhagens e de propriedades físicas e químicas de espécies e clones de eucalipto**. Tese (Doutorado em agronomia) – Faculdade de Ciências agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION in: **Standard Methods For Examination of Water And Wastewater**, 190 Ed., American Public Health Association: Washington D.C, 1995.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION in: **Standard Methods For Examination of Water And Wastewater**, 19^o Ed., American Public Health Association: Washington D.C, 2005.

ASSALIN, M.R; ROSA, M.A. ALMEIDA, E.dos.A. DURÁN,N. **Remediação do efluente papelero kraft e1: influência do ph no processo de ozonização**. 22^o Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Joinville, Set. 2003.

ASSALIN, M.R.; DURÁN, N. **Aplicação do processo de lodo ativado convencional na remediação do efluente papelero kraft e1**. Disponível em:<
https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDMQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.enq.ufsc.br%2Feventos%2Fsinaferm%2Ftrabalhos_completos%2Ft352.doc&ei=Jd5UdquG6W80QGznYHYDQ&usg=AFQjCNHDFnSq-xawSA94Vz9UUI8SSM-naQ> . Acesso em: 01/04/13.

BABA, A.Y.; ROSADO, F.R.; ZONETTI, P.da.C. **Biorremediação de efluentes líquidos por meio da ação de pleurotus spp**. Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar., Centro Universitário de Maringá, Maringá, out.2009.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C.R.A.; CRUZ, M.P. Composição química de extrativos lipofílicos e polares de madeira de *eucalyptus grandis*. **Ciência e Engenharia**, N^o 15, p. 13-20, 2005.

BEG, Shahjahan.; ZAFAR, Saeed.I.; SHAH, F.H. Rice Husk Biodegradation by Pleurotus Ostreatus to Produce a Ruminant Feed. **Agricultural Wastes**. N^o 17, p. 15-21, 1986.

BETTIN, F. Cinética de Crescimento e Produção de Lacases do Fungo Pleurotus Sajor-Caju PS- 2001(Fr.) **Singer em Processo Submerso em Biorreator com Agitação Mecânica**. 230 f. Tese(Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2010.

BORDERES, J.; SIQUEIRA, R..C.; TAVARES, L. B.B.T. **Produção de *Pycnoporus sanguineus* em Resíduo do Processamento da Palmeira-Real-da-Austrália.**

Disponível em: < http://www.bc.furb.br/docs/MO/2008/332147_1_1.pdf>.

BRACELPA, 2013. Disponível em: < <http://www.bracelpa.org.br/bra2/?q=node/576>>

BUMPUS, J.A.; POWERS, R. H.; SUN, T. Biodegradation of 1,1-dichloro-2,2-bis(4chlorophenyl)ethene) by phanerochaete chrysosporium. **Mycol. Res.** Nº 97, p.95-98, 1993.

CAMPOS, S.C.; CARVALHO, C.S.M.; AGUIAR, L.V.B.; ANDRADE, M.C.N. Cinética micelial dos fungos comestíveis *pleurotus ostreatus* e *lentinula edodes* em resíduos lignocelulósicos. **Arq. Inst. Biol**, v.78, n.1, p.141-145, 2011.

CARDOSO, M.L. **Estudo da produção *in vitro* de enzimas ligninocelulolíticas por fungo basidiomiceto cultivado sob fermentação sólida de resíduos vegetais.** 86 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais – Departamento de ciências biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, Vol. 32, No. 8, p. 2191-2195, Set, 2009.

CETEM. **fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (haps).** Série Tecnológica Ambiental, Centro de tecnologia Mineral, Ministério de Ciência e Tecnologia, 2008.

COLLA, L.M; PRIMAZ, A.L; LIMA, M.de; BERTOLIN, T.E; COSTA, J.A.V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, maio, 2008.

COLLA, 2008.; FAN, L; SOCCOL, C.R. **Destoxificação da cascade café utilizando fungo comestível do Gênero *Pleurotus***. II Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil. Paraná, 2001.

CORDI, L.; ASSALIN, M. R.; DIEZ, M.C.; DURÁN, N. **Montagem, partida e operação de um sistema de lodos ativados para o tratamento de efluentes: parâmetros físico-químicos e biológicos**. Engenharia Ambiental, Pesquisa e Tecnologia, v. 5, p. 97-115, 2008.

CUNHA, A.L.; MÁXIMO, H.de.O; ANDRADE, M.V.F.de.; MARINHO, G.M.; RODRIGUES, K. **Degradação de corante azo por *Phanerochaete chrysosporium* em sistema de reatores em bateladas sequenciais operados em série**. Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação, Tocantins, 2012.

DARWISH, Galila, A.M.A.; BAKR, A.A.; ABDALLAH, M.M.F. Nutritional value upgrading of maize stalk by using *Pleurotus ostreatus* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid state fermentation. **Annals of Agricultural Science**, Nº 57, p. 47-51, Apr, 2012.

DING, Juan.; CONG, Jun.; ZHOU, Juan.; GAO, Shixiang. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *phanerochaete chrysosporium*. **Journal of environmental sciences**, Nº 20, p. 88–93, Jun, 2007.

ESTEVES, P. J. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído em reator piloto aquecido por vapor direto**. Dissertação (mestrado em Microbiologia Aplicada), Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena. Lorena, 2011.

ESPOSITO, E. **Processos envolvidos no tratamento biológico de efluentes: utilização de um biorreator de leito recheado**. Dissertação (mestrado em ciência e tecnologia de materiais), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 1992.

FERRONATTO, G. R.; SALMASO, M. S. **Avaliação de Atividade Antimicrobiana de Espécies de Macrófitas Aquáticas da Região Metropolitana de Curitiba.** 2010. Trabalho de Conclusão de Curso.(Graduação em Tecnologia em Processos Ambientais) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Curitiba. Paraná, 2010.

FRAGA, Débora. G.; JUNIOR, Francides. G.da.S.; GONÇALEZ, Joaquim.C. **Avaliação da polpação soda de *pinus taeda* com adição de antraquinona.** Congresso ibero-americano de investigación en celulosa y papel. 2002.

FUKUSHIMA, Romualdo. S.; HATFIELD, Ronald. de. **Um novo método analítico para a determinação do teor de lignina em produtos vegetais.** VIII Encontro nacional sobre métodos dos laboratórios da Embrapa. Nov, 2003.

GARCIA, F.F. **BIODEGRADAÇÃO DE 2,4 – DICLOROFENOL E 2,4,6 – TRICLOROFENOL POR FUNGOS DO GÊNERO *Pleurotus*.** 2009. 94 f. Dissertação – Programa de Mestrado em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE. Santa Catarina, 2009.

GERN, Regina.M.M. **Estudo de Meios de Cultivo para Produção de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso.** Tese (Doutorado em engenharia química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

GOUVEIA, Ester.R.; NASCIMENTO, Renata. T.do.; MAIOR, Ana.M.S. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, Vol. 32, No. 6, p.1500-1503, 2009.

GUIMARÃES, M.S.de.O. **Coleta, isolamento e identificação de fungos presentes em sistemas de tratamento de efluentes de indústria petroquímica para utilização em processos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos.** 56 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

GUIMARÃES, C.; MOTA, M. **Role of Manganese Peroxidases and Lignin Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the degradation of the colourants present in a sugar refinery effluent.** *Biotec*, p.324, 1998.

HARRIS, Daniel. C. **Análise Química Quantitativa.** 1999.

HENN, C. **Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas atrazina e diuron – produção de enzimas lignolíticas e degradação dos compostos.** 2009. 117 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas São José do Rio Preto, 2009.

HENN, C. **Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas atrazina e diuron – produção de enzimas lignolíticas e degradação dos compostos.** 2009. 117 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas São José do Rio Preto, 2009.

JGI, 2013. Disponível em: <<http://genomeportal.jgipsf.org/Phchr1/Phchr1.home.html>>

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. **Separations and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*.** *FEBS Lett.*, V. 169, p. 247-250. Oregon, 1984.

KLENK, M., MELO T. O., VANZETTO, S., XAVIER C. **Remoção de Compostos Lignínicos em Efluentes e Biomassa de Indústria de Celulose Kraft.'**

In: Anais do 52º Congresso Brasileiro de Química. , 2012. Recife.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I.B.de.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. de. **Química da madeira.** Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, 2005.

KLOCK, 2013. **Lignina. Química da madeira. UFPR/DETF.** Disponível em: <<http://www.docstoc.com/docs/140727063/lignina2011>>.

LOPES, D. S.A. **Mecanismos de remoção de AOX de efluentes da indústria de pasta kraft.** Dissertação (mestrado em 2º ciclo de engenharia do ambiente). Universidade de Aveiro, Aveiro, 2012.

MASSAI, R. L. **Análises Químicas e teste de toxicidade dos efluentes kraft e1 e final e3, após tratamento com o fungo *Lentinus edodes***. Tese (mestrado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

MIELI, J.C.A. **Sistemas de Avaliação Ambiental na Indústria de Celulose e Papel**. 2007. 111 f. Tese(Doutorado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MUNARI, Fernanda. M.; GAIO, Tamara. A.; DILLON, Aldo. J.P. **Cinética da Secreção de Lacases e Peroxidases e Degradação de Fenóis Totais em Cultivo Submerso de *Pleurotus sajor-caju* com Efluentes da Indústria Papeleira**. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.enq.ufsc.br%2Feventos%2Fsinaferm%2Ftrabalhos_completos%2Ft343.doc&ei=TQd6Udq3D4689gTG8IDgDA&usg=AFQjCNHxXiEJONn9CmmAocmgFU7wH2ciAw>. Acesso em: 13/03/13.

MDIC, **Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio**. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/>>. Acesso em: 06/04/13.

MYCOPLANT. Disponível em: <<http://lojadassementes.pt/repolga-pleurotus-ostreatus-pronto-produzir-p-2931.html>> 2012. Acesso em: 22/03/13.

NAVIA, R.; INOSTROZA, X.; DIEZ, M. C.; LORBER, K. E., 2006. **Irrigation model of bleached Kraft mill wastewater through volcanic soil as a pollutants attenuation process**. Chemosphere, v.63, p. 1242 – 1251.

NERUDE, F; MISURCOVA, Z. **Distribution of lignolytic enzyme in selected white rot fungi**. Folia Microbiology V. 4, p. 264-266.

NETO, J. B. A.; MILÂNEZ, A. **Rendimento em processo industrial de polpação Kraft**. Congresso iberoamericano de investigación em celulosa y papel. 2002.

NETO, R.T.de.V. **Diversidade e seleção de fungos basidiomicetos vasiloforóides para produção de enzimas lignocelulolíticas em área de mata atlântica do sul da Bahia**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, Vol. 33, Nº. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, J. T. S.; SOUZA, L. C.; LUCIA, R.M.D.; JUNIOR, W. P. de. S. Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **R. Árvore**, v.29, nº5, p.819-826, 2005.

OLIVEIRA, S.D.de. **Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo**, 158 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade do Rio de Janeiro, 2008.

PEREIRA, P. M. **Avaliação do potencial de fungos na degradação do herbicida Atrazina**. 92 f. Dissertação(Mestrado em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

RABELO, M.S. **Estudo de um caso de fechamento de circuito de processo kraft com branqueamento TCF, com ênfase na caracterização, possibilidade de acúmulo e influência dos elementos não processuais**. Dissertação (mestrado em engenharia química), Programa de pós-graduação em engenharia química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

REZENDE, N. R.de. **Tratamento de efluentes da indústria de polpa kraft branqueada: lodo ativado versus reator de biofilme e leito móvel**. Dissertação(Magister scientiae em engenharia civil), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

RUAS, D.B. **Estudo de um caso de fechamento de circuito de processokraft com branqueamento TCF, com ênfase na caracterização, possibilidade de acúmulo e influência dos elementos não processuais.** Dissertação (mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

RUEGGER, M. J. S. **Atividade enzimática e produção de ácido γ -Linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins, SP.** Tese(doutorado), Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2001.

SALIBA, E. De.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; MORAIS, S. A. L.; VELOSO, D. P. Ligninas – métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.917-928, 2001.

SALVI, M.B.de. **Fungos Basidiomicetos em biorremediação.** Pós- graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, 2011.

SCHIMIDT, P.; WECHSLER, F.S.; NASCIMENTO, J.S.do.; JUNIOR, F.M.de.V. **Tratamento do Feno de Braquiária pelo Fungo *Pleurotus ostreatus***1. v.32, n.6, p.1866-1871, 2003.

SILVA, H. H. B. ; SCHNEIDER, A. L. S.; WISBECK, E.; FURLAN, S.A. Biodegradation of 2,4 dichlorophenol by *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 **Brazilian Archives of Biology and Technology** vol.52 no.6 Curitiba Nov./Dec. 2009

SOUZA, A.F.; ROSADO, F.R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, jan. 2009.

SOUZA, A. H. C. B. **Guia técnico ambiental da indústria de papel e celulose.** São Paulo: SOUZA ET AL., 2008.

SPIER, M.R. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas Amilase e Amiloglucosidase por Estado Sólido**. Dissertação Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A. E. **Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi**. Mycologia, v.81, p. 234 – 240, 1989.

TALITA,2013.Disponível em:<http://seshat.unipar.br/media/trabalhos/DISSERTAO_COMPLETA__TALITA-1.pdf>.

U.S.EPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to fresh water organisms**. EPA-821-R-02-13., 4 ed. Washington,U.S.A. 2002.

VANZETTO, S.C. **Estudos de viabilidade de tratamento de efluente de indústria de celulose kraft por reator biológico com leito móvel (mbr)**. Dissertação (mestrado em Controle e Monitoramento Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

VANZETTO, S., ROSA, S. M. C., XAVIER, C. R. ou XAVIER C. **Tratamento de efluente de indústria de papel e celulose por reator MBBR** In: Anais do 51o Congresso Brasileiro de Química., 2011, São Luís.

XAVIER, C.R.; CHAMORRO, S.; VIDAL, G. **Behavior of Aromatic Compounds Contained in Kraft Mill Effluents Treated by an Aerated Lagoon**. American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers, 2005.

YAN, M. R.; E. Shu, H. Chinese readers extract information from parafoveal words during reading. **Psychonomic bulletin e Review**, 16, 561-566.

YOUNG, Brian.J.; RIERA, Nicolás. I.; BEILY, María. E.; BRES, Patricia. A.; CRESPO,Diana. C.; RONCO, Alicia. E. Toxicity of the efluente from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on Lactuca sativa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Elsevier, N° 76, p. 182-186, Oct, 2011.

ZAMORA, P-peralta; ESPOSITO, E; REYES, J; DURAN, N. Remediação de efluentes derivados da indústria de papel e celulose. tratamento biológico e fotocatalítico. **Química nova**, Campinas, v.20, n.2, p. 186-190, Ago. 1996.

ZAMORA, P.; FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, N. T.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, Nº 23, p. 504-511, Jan. 2000.