

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

**CARIN CATIUSCE CORDEIRO**

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE KRAFT POR  
FUNGOS LIGNINOLÍTICOS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CURITIBA**

**2013**

CARIN CATIUSCE CORDEIRO

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE *KRAFT* POR  
FUNGOS LIGNINOLÍTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como critério de avaliação na unidade curricular, Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlene Soares

CURITIBA

2013

**CARIN CATIUSCE CORDEIRO**

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE KRAFT POR  
FUNGOS LIGNINOLÍTICOS**

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<sup>a</sup>.DR<sup>a</sup>.GISELLE MARIA MACIEL**

Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

**Membro 2 – PROF. Ms. ALESSANDRO FEITOSA MACHADO**

Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

**Orientadora – PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARLENE SOARES**

Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

Curitiba, 25 de setembro de 2013.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho primeiramente, a minha mãe Doronice de Almeida e a minha irmã Kelly Cristine Cordeiro, pois acreditaram em mim e me deram esta oportunidade de concretizar e encerrar mais uma caminhada da minha vida. Sei que elas não mediram esforços para que este sonho se realizasse, sem a compreensão, ajuda e confiança delas nada disso seria possível hoje.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada e me ajudou a me curar dos problemas de saúde que tive no decorrer desse trabalho.

Em especial a minha mãe Doronice de Almeida, por fazer muitos dos meus sonhos se tornarem realidade e que muitas vezes deixava de satisfazer suas vontades para satisfazer as minhas. Muito obrigado mãe, amo muito você!

A minha irmã Kelly Cristine Cordeiro, que é uma pessoa muito especial, extrovertida e que diversas vezes me proporcionou alegria, obrigada pela amizade, companheirismo e por sempre me fazer acreditar que tudo é possível. Continue trilhando esse caminho, pois certamente atingirá seus objetivos.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlene Soares pela paciência e pela divisão de conhecimentos que ela me proporcionou durante a produção deste trabalho. A professora Wanessa Ramsdorf, pela disponibilidade e por me acompanhar nos meus ensaios toxicológicos para essa pesquisa.

A todos os professores do curso de Tecnologia em Processos Ambientais, pela paciência, dedicação e ensinamentos disponibilizados nas aulas, cada um de forma especial contribuiu para a conclusão desse trabalho e conseqüentemente para minha formação profissional.

As minhas amigas Débora Fermino, Liliâne Sessi, Cristiane Kist, Pamela Jarenko, Camila Peitz e Rodrigo Duwe, muito obrigada pela amizade e companheirismo e tenho certeza que à distância e o tempo nunca irão nos separar, vocês fazem parte do meu coração.

A todos os meus colegas de trabalho da Geoambiente – Geologia e Engenharia Ambiental, pelo incentivo, força e amizade.

A todos os meus colegas do curso, que de alguma maneira tornaram minha vida acadêmica cada dia mais desafiante. Peço a Deus que os abençoe grandemente, preenchendo seus caminhos com muita paz, amor, saúde e prosperidade, meu muito obrigada!!!

*Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridade, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridade e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir! Não tenhas medo dos tropeços da jornada. Não podemos esquecer que nós, ainda que incompleto, fomos o maior aventureiro da história.*

*Augusto Cury*

## RESUMO

CORDEIRO, Carin, Catiusce. Estudo da biodegradação de efluente *kraft* por fungos ligninolíticos. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Ambientais) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

Mesmo com todo o avanço tecnológico disponível, a indústria de papel e celulose é uma das que mais colaboram com a contaminação do meio ambiente por apresentarem na maior parte de sua composição compostos lignínicos, matéria orgânica, cor e toxicidade. O presente trabalho teve por objetivo estudar a capacidade e a eficiência de fungos ligninolíticos em degradar compostos presentes em efluente *Kraft*. Foram realizados experimentos em meio sólido e em meio líquido, numa sequência de quatro etapas. Na primeira foi realizada a caracterização físico-química do efluente. Na segunda etapa foram variadas as concentrações de efluente (de 0% a 100%) dos meios de cultivo solidificado, avaliando seu efeito sobre o crescimento micelial, utilizando os fungos *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Agaricus bisporus* ABI 25 e *Pleurotus florida* PSP 1. A partir dos melhores resultados, na terceira foi realizado em meio líquido um delineamento experimental  $2^3$ , variando glicose, pH e concentração de efluente, sendo avaliados: biomassa, compostos lignínicos, cor e toxicidade com *D. magna* e *L. sativa*. Na etapa final foi realizado um acompanhamento cinético da condição otimizada, durante dez dias, com amostragem a cada dois dias. O melhor resultado de crescimento micelial em meio solidificado foi obtido com o fungo *Pleurotus florida* em 20% de efluente 4,88 mm/dia e os de remoção de compostos, em meio líquido, foram obtidos com o 10% de efluente *Kraft*, pH 7,0 e com adição de 10 g/L de glicose. Os valores de remoção de cor foram (63,6 – 68,6%) e compostos lignínicos (94,36 – 98,76%) e também redução da toxicidade em relação aos bioensaios realizados. Em relação ao ensaio cinético observou-se correlação entre a remoção de cor e lignina e a formação de biomassa. A produção de Manganês Peroxidase foi de 593,98 U/mL. Os resultados obtidos indicam que *Pleurotus florida* apresentou potencial de biodegradação de compostos presentes em efluente *Kraft*, mas novos estudos devem ser realizados.

**Palavras-chave:** Biodegradação. Efluente *Kraft*. *Phanerochaete chrysosporium*. *Agaricus bisporus*. *Pleurotus florida*.

## ABSTRACT

CORDEIRO, Carin Catiusce. Biodegradation study of Kraft effluent by ligninolytic fungi. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Ambientais) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

Even with all the technological advances available, the pulp and paper industry is one of the biggest water consumer, presenting an effluent rich in lignin compounds, organic matter, color and toxicity. The present work aimed to study the capacity and efficiency of ligninolytic fungi to degrade compounds present in kraft wastewater. Experiments were conducted first on solid medium and after in liquid medium, in a sequence of four steps. The first study carried out the physico-chemical characterization of the effluent. In the second, different concentrations of the effluent (from 0 % to 100 %) mixed with agar (1,5%) were distributed on Petri in order to evaluate its effect on mycelial growth of *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Agaricus bisporus* ABI 25 and *Pleurotus florida* PSP 1. Considering the results, the third experiment was conducted in liquid medium, in a factorial experiment 2<sup>3</sup>, varying glucose, pH and concentration of effluent. In this experiment biomass, ligninic compounds, color and toxicity to *Daphnia magna* and *Lactuca sativa* were evaluated. In the final step a ten day kinetic was conducted, monitoring parameters every two days. Mycelial growth on solid medium showed best results for *Pleurotus florida* and *Phanerochaete chrysosporium*. In liquid medium best results were obtained for *P. florida* cultivated on 10% of effluent Kraft, pH 7 and by adding 10 g / L glucose. Result of removing color removal was about 65% and ligninic compounds around 95%. Regarding the kinetic assay correlation was observed between lignin and color removal and the formation of biomass. Production of manganese peroxidase was 593.98 U/mL. *Pleurotus florida* showed potential for biodegradation of compounds present in wastewater Kraft, but further studies should be conducted.

**Key words:** Biodegradation. Kraft effluent. *Phanerochaete chrysosporium*. *Agaricus bisporus*. *Pleurotus florida*.

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Representação simplificada da estrutura da celulose.....	16
<b>Figura 2 -</b>	Esquema geral do processamento <i>kraft</i> de pasta de papel.....	18
<b>Figura 3 -</b>	Poluentes originados nas diferentes etapas de fabricação do papel e celulose.....	20
<b>Figura 4 -</b>	Etapas dos processos metodológicos do trabalho.....	30
<b>Figura 5 -</b>	Figura 5: Fotografia do cultivo do inóculo em Erlenmeyers cultivados a 26°C por 7 dias. a) <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725; b) <i>Pleurotus florida</i> PSP 1; c) <i>Agaricus bisporus</i> ABI 25.....	32
<b>Figura 6 -</b>	Fotografia dos frascos de Erlenmeyers contendo a suspensão de células a) <i>Agaricus bisporus</i> ABI 25; b) <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725; c) <i>Pleurotus florida</i> PSP 1.....	33
<b>Figura 7 -</b>	Representação da área de contagem da Câmara de Neubauer.....	34
<b>Figura 8 -</b>	Fotografia de uma placa de Petri demonstrando a marcação dos quatro raios.....	36
<b>Figura 9 -</b>	Fotografia de sementes de <i>L. sativa</i> germinadas na placa de <i>Petri</i> com papel filtro umedecido com água deionizada.....	42
<b>Figura 10 -</b>	Fotografia das diluições do efluente Kraft para o teste com <i>D.magna</i> .....	43
<b>Figura 11-</b>	Fotografia mostrando a formação de pellets 10% efluente, pH 7,0 e adição de glicose, após 10 dias de tratamento fúngico em agitação com 26°C.....	53

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 -</b>	Representação do crescimento médio em mm/dia do <i>Agaricus bisporus</i> ABI 25 durante 7 dias de cultivo em meio com diferentes concentrações de efluente, acrescidos de ágar 1,5% à 26°C.....	46
<b>Gráfico 2 -</b>	Representação do crescimento médio em mm/dia do do <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 7 dias de durante cultivo em meio com diferentes concentrações de efluente, acrescidos de ágar 1,5% à 26°C.....	47
<b>Gráfico 3 -</b>	Representação do crescimento médio em mm/dia do do <i>Pleurotus florida</i> 7 dias de durante cultivo em meio com diferentes concentrações de efluente, acrescidos de ágar 1,5% à 26°C.....	47
<b>Gráfico 4 -</b>	Representação da biomassa em g durante os 10 dias nas diversas condições do delineamento experimental.....	51
<b>Gráfico 5 -</b>	Remoção de compostos lignínicos relacionando diversos parâmetros.....	54
<b>Gráfico 6 -</b>	Representação da biomassa em mg durante os 10 dias da melhor condição do delineamento experimental.....	56
<b>Gráfico 7 -</b>	Representação da concentração das enzimas Lignina Peroxidase, Manganes Perosidase e Lacase, produzidas por <i>Pleurotus florida</i> na melhor condição do delineamento experimental.....	60
<b>Gráfico 8-</b>	Estudo com <i>D. magna</i> mostrando a imobilidade em diferentes concentrações.....	63
<b>Gráfico 9 -</b>	Representação do efeito da toxicidade dos efluentes em diversas concentrações utilizando a <i>Lactuca sativa</i> .....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Variáveis e níveis de estudo - Planejamento fatorial $2^3$ .....	37
Tabela 2 -	Matriz padrão para o planejamento experimental $2^3$ feito individualmente para cada fungo.....	37
Tabela 3 -	Resultados das análises físico-químicas do efluente Kraft.....	44
Tabela 4 -	Velocidade média em mm/dia e desvio padrão do crescimento radial dos fungos cultivados em efluente kraft solidificado com 1,5% de Agar.....	48
Tabela 5 -	Resultados das análises da otimização em meio líquido, com planejamento fatorial $2^3$ .....	50
Tabela 6 -	Remoção (%) dos parâmetros do efluente, em ensaio cinético.....	56

## LISTA DE SIGLAS

AOX	Compostos Orgânicos Halogenados
CE	Concentração Efetiva
CI50	Concentração letal 50
DAQBI	Departamento de Química e Biologia
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNS	Ácido 3,5 dinitrossalicílico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ECF	<i>Elemental Chlorine Free</i>
LiP	Lignina peroxidase
MnP	Manganês peroxidase
PDA	<i>Potato Dextrose Ágar</i>
pH	Potencial Hidrogênioônico
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV-vis	Ultravioleta - visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
3.1 INDÚSTRIAS DE PAPEL E CELULOSE.....	15
3.2 COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA MADEIRA.....	16
3.3 PROCESSOS KRAFT.....	18
3.4 EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE.....	20
3.5 BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MADEIRA.....	21
3.5.1 Sistemas Enzimáticos Encontrados em Fungos Ligninolíticos.....	23
3.5.1.1 Lignina peroxidase (LiP) .....	24
3.5.1.2 Manganês peroxidase (MnP) .....	25
3.5.1.3 Lacase.....	25
3.6 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE.....	26
3.6.1 <i>Daphnia magna</i> .....	26
3.6.2 <i>Lactuca sativa</i> .....	27
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	30
4.1 ETAPA 1: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	31
4.2 FUNGOS.....	32
4.2.1 Preparo e quantificação dos inoculos.....	32
4.3 ETAPA 2: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EFLUENTE SOBRE A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL.....	35
4.3.1 Preparo de poços.....	35
4.3.2 Inoculação e Medição do Crescimento Radial.....	36
4.4 ETAPA 3: OTIMIZAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO EM CULTIVO LÍQUIDO.....	37
4.5 ETAPA 4: ACOMPANHAMENTO DA CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO NA MELHOR CONDIÇÃO DA ETAPA 3.....	38
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
4.6.1 Determinação da Biomassa Micelial.....	38
4.6.2 Remoção de Cor, Compostos Aromáticos, Lignínicos e Lignosulfônicos.....	38
4.6.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO) .....	39
4.6.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO <sub>5</sub> ).....	39
4.6.5 Medição do Potencial Hidrogênioônico (pH).....	40
4.6.6 Atividades Enzimáticas.....	40
4.6.6.1 Manganês peroxidase (MnP) .....	41
4.6.6.2 Lacase.....	41

4.6.7 Bioensaio de Toxicidade.....	41
4.6.7.1 <i>Lactuca sativa</i> .....	41
4.6.7.2 <i>Daphnia magna</i> .....	43
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	44
5.1.1 Análises Físico-Químicas.....	45
5.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EFLUENTE SOBRE A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL.....	46
5.3 OTIMIZAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO EM CULTIVO LÍQUIDO.....	49
5.4 ACOMPANHAMENTO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO NA MELHOR CONDIÇÃO DA ETAPA 3.....	56
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	66
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, há uma crescente preocupação com a qualidade do meio ambiente, devido ao aumento dos processos industriais e da densidade populacional. Os recursos naturais têm se tornado cada vez mais escassos devido ao uso indiscriminado, à elevação dos padrões de vida e à contaminação de toda ordem (SILVA; ESPOSITO, 2004).

Dentre as atividades industriais, a de papel e celulose é uma das mais importantes do mundo e segundo dados da Associação Brasileira de Celulose e Papel (BRACELPA, 2009), o Brasil se consolidou como o 4º e 10º lugar na produção mundial de celulose e papel respectivamente. Porém, apesar dos avanços ocorridos nos últimos anos, esta indústria ainda é uma das maiores consumidoras de água, que pode chegar até a 60 m<sup>3</sup> por tonelada de papel, mesmo com as mais modernas e eficientes técnicas operacionais (THOMPSON et al., 2001). Dessa forma, há a geração de grandes volumes de águas residuárias na extração da polpa celulósica, sendo a técnica de polpação predominante no mundo o processo Kraft. Esse processo é responsável pela geração de efluentes com alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), concentrações de fenóis, turbidez, sólidos suspensos, compostos aromáticos cromóforos e organoclorados, causando impacto ambiental nos corpos receptores (VIDIC; SUIDAM; BRENNER, 1994).

Acompanhando o crescimento da industrialização também surgem novas alternativas promissoras para o tratamento de efluentes (DURAN et al., 2002). Nos últimos anos, vários estudos têm focado na capacidade das bactérias e fungos de degradar compostos, sendo denominada biodegradação ou biorremediação (POINTING, 2001). Essa técnica busca acelerar o que a natureza levaria dezenas de anos para executar (BARROS, 2004)

O processo de biorremediação utilizando basidiomicetos para o tratamento de efluentes industriais contendo compostos lignínicos tem se mostrado eficiente em função do complexo enzimático produzido por estes organismos (SCHMIDT; WESCHSLER; NASCIMENTO, 2003). Entre os

gêneros mais estudados estão *Picnoporus*, *Phanerochaete* e *Pleurotus* (NOZU et al., 2010).

Experimentos conduzidos por Valli e Gold (1991) revelaram que a degradação de 2,4-diclorofenol (DCP) por *Phanerochaete chrysosporium* depende da concentração de nitrogênio no meio. Em cultivos com limitação de nitrogênio (1,2 mM de tartarato de amônio), 50% do 2,4-DCP foi degradado a CO<sub>2</sub> em 24 dias de cultivo, enquanto apenas 8% de degradação foi observada com 12 mM da mesma fonte de nitrogênio. Já 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*.

Neste contexto, este trabalho visa estudar a capacidade e a eficiência de fungos ligninolíticos em degradar compostos presentes no efluente Kraft proveniente da indústria de papel e celulose.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o tratamento de efluente do processo Kraft, oriundo da indústria de papel e celulose, por basidiomicetos produtores de enzimas degradadoras da lignina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efluente do processo Kraft segundo os parâmetros físico-químicos e toxicológicos;
- Avaliar em meio sólido o efeito de diferentes concentrações do efluente sobre a velocidade de crescimento dos fungos *Agaricus bisporus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus florida*;
- Otimizar em cultivo líquido a biodegradação do efluente através de um delineamento experimental ( $2^3$ ) com as melhores condições do meio solidificado;
- Acompanhar a cinética de tratamento do efluente na melhor condição obtida através do delineamento experimental;

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 INDÚSTRIAS DE PAPEL E CELULOSE

A indústria de papel e celulose é atualmente uma das mais importantes do mundo. Na última década, o país aumentou sua produção em 36,1%, com crescimento médio de 3,1% ao ano, seguindo as mudanças na economia brasileira. O desenvolvimento socioeconômico e o aumento de renda da população, com a inserção de novos consumidores no mercado, resultaram em mais demanda por livros, cadernos, jornais e revistas, embalagens para alimentos, remédios e itens de higiene pessoal. Com 14,1 milhões de toneladas, o Brasil se consolidou como o 4º produtor mundial de celulose, distanciando-se da Suécia, que ficou na 5ª colocação, com 11,8 milhões de toneladas (BRACELPA, 2010). Em relação à produção de papel, embora tenha crescido 4,4% na comparação com 2009/2010, chegando a 9,8 milhões de toneladas, o país perdeu uma posição, ficando em 10º lugar. O resultado da produção de celulose, em 2006, levou o Brasil a passar da sétima para a sexta posição, como produtor mundial, ultrapassando o Japão e aproximando-se do patamar dos grandes produtores europeus, Suécia e Finlândia (BRACELPA, 2009).

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

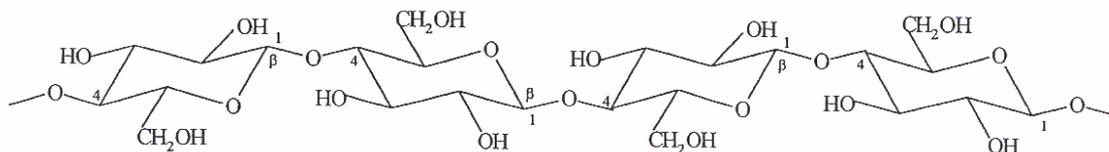
Apesar de sua indiscutível importância econômica estas empresas apresentam um elevado potencial de contaminação ambiental, não só pela presença de compostos recalcitrantes, mas também pelo elevado volume de

efluente gerado, que deve ser tratado antes de seu lançamento nos corpos aquáticos receptores (ALMEIDA et al., 2004).

### 3.2 COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA MADEIRA

A grande disponibilidade de madeira no mundo e principalmente sua renovabilidade, fazem desse material um interessante foco de estudos (FERRAZ, 2001). A madeira é um biocomposto natural constituído principalmente por fibras. Sua composição química apresenta cerca de 40-50% de celulose 20-35% de hemicelulose, 20-30% de lignina e 1-3% de extrativos (compostos alifáticos, incluindo alcanos, álcoois, ácidos graxos, esteróis, compostos fenólicos, cinzas (menos que 1%) e compostos minerais presentes em pequenas quantidades. As quantidades relativas dos componentes da madeira variam com o tipo de madeira e com o tipo de parede celular (GARCIA, 2009). Geralmente, classifica-se a madeira em dois tipos: as *Gymnospermae* ou madeiras duras (*hardwood*), que são as folhosas e as *Angiospermae* ou moles (*softwood*), que são as resinosas (TAVARES, 2006).

A celulose é um polímero de cadeia longa composto por unidades  $\beta$ -D glicopirranose unidas por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 1). As suas cadeias apresentam entre 4000 e 10000 unidades de D-glucose anidra. A celulose está estruturalmente ligada à hemicelulose e à lignina, não sendo assim um substrato facilmente acessível. A forma cristalina é resistente ao ataque químico e à degradação microbiana enquanto a forma amorfa é primeiramente atacada e degradada (TAVARES, 2006).



**Figura 1: Representação simplificada da estrutura da celulose.**  
**Fonte: Tavares (2006).**

A hemicelulose é um polissacarídeo associado à celulose, definindo as propriedades estruturais na parede celular vegetal e desempenhando funções na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (SJOSTROM, 1981). É constituída por unidades de açúcares, como pentoses, hexoses e ácidos hexurônicos. A cadeia principal pode ser constituída por um único tipo de unidade, ou por dois ou mais de açúcares (FENGEL, 1984). Devido ao baixo grau de polimerização e à sua natureza amorfa, as hemiceluloses são degradadas mais facilmente do que a celulose. Apesar disso, ainda é necessário um sistema enzimático complexo para a sua degradação, devido à sua estrutura variável e ramificada (TAVARES, 2006). Tal como a celulose, grande parte da função das hemiceluloses é dar resistência à parede celular, atuando como matriz de suporte para as microfibrilas de celulose (TAVARES, 2006).

A lignina é um dos compostos aromáticos mais abundantes na biosfera e das plantas vasculares (AGAPITO, 2007). Na madeira, encontra-se associada à celulose e à hemicelulose. É um polímero de estrutura amorfa, aromática, altamente ramificada e insolúvel em água. Apresenta-se sob uma rede tridimensional com ligações cruzadas (TAVARES, 2006).

A formação da lignina deve-se a uma reação química que envolve fenóis e radicais livres. A sua formação resulta de variados acoplamentos de espécies radicais que surgem por uma polimerização iniciada enzimaticamente por peroxidases de espécies radicais dos percussores de fenilpropano (SJOSTROM, 1981; HAMMEL, 1997).

O tipo de lignina varia consoante a natureza da madeira. Nas madeiras de resinosas a lignina é constituída por unidades de tipo  $p$ -coumarílico e coniferílico. Nas madeiras de folhosas, a lignina é formada a partir de unidades dos três alcoóis (SJOSTROM, 1981).

### 3.3 PROCESSO KRAFT

O processo mais empregado para separar a lignina e hemicelulose da celulose é o processo Kraft (Figura 2), que remove aproximadamente 90% da lignina presente na madeira. Empregando-se uma combinação de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio em elevadas temperaturas ( $\sim 170^{\circ}\text{C}$ ), a lignina é degradada efetivamente em fragmentos solúveis em água e fibras de polpa, predominantemente, compostas de celulose e hemicelulose (PERISSOTTO; RAMOS, 2002). Os 10% restantes têm que ser eliminados nos processos de branqueamento, que normalmente são realizados com cloro, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, conforme os estágios de branqueamento empregados (GARG; MODI, 1999). Este efluente, é alcalino, com um pH de aproximadamente 12, apresenta alta concentração de espécies fenólicas. A descrição do processo ao sulfato ou Kraft, referido abaixo, diz respeito ao processo cuja matéria-prima é a madeira de *E. globulus*.

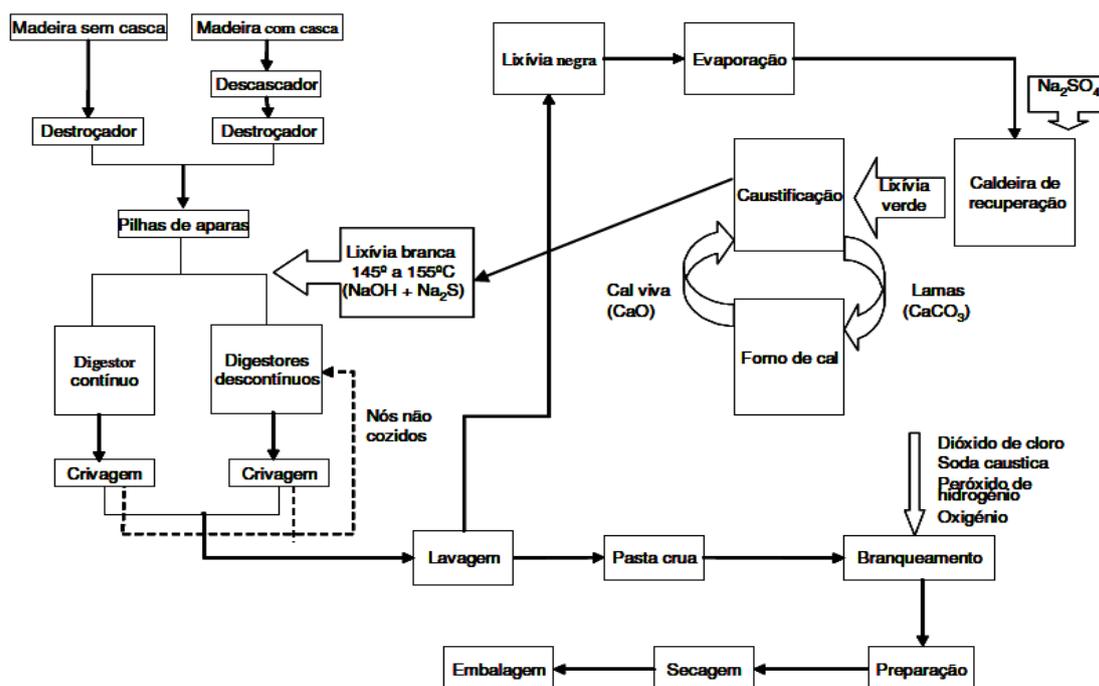


Figura 2: Esquema geral do processamento Kraft de pasta de papel.  
Fonte: AGAPITO (2007).

A matéria-prima é recepcionada na forma de toras, com ou sem casca, que são transformadas em aparas no destroçador. O cozimento das aparas de madeira é feito em reatores denominados digestores. No digestor, as aparas de madeira são tratadas, a uma temperatura entre os 145 e os 155°C, com lixívia de cozimento (lixívia branca), sendo esta constituída essencialmente por hidróxido de sódio (NaOH) e sulfureto de sódio (Na<sub>2</sub>S). Durante o cozimento Kraft os constituintes não celulósicos da madeira, como a lignina, são degradados e solubilizados, obtendo-se a separação das fibras de celulose. O hidróxido de sódio reage com a lenhina para separar as fibras e o sulfureto de sódio protege as moléculas de hemicelulose, favorecendo a reação de deslignificação. Após este tratamento, obtém-se a denominada “pasta crua”, que é lavada com água e crivada para remoção de impurezas sólidas, as chamadas incozidos. Do cozimento resulta ainda a lixívia negra, composta por água, compostos orgânicos da madeira e compostos inorgânicos usados no cozimento (AGAPITO, 2007).

Depois da operação de lavagem, a pasta apresenta uma coloração acastanhada, devido à lignina residual presente. É então efetuado o processo de branqueamento, que remove ou descolora a lignina residual, obtendo-se como produto final a pasta branqueada de eucalipto. O branqueamento é uma operação oxidativa, em que a pasta é tratada com agentes oxidantes, havendo alternância entre os estágios de reação química oxidante e os estágios de dissolução alcalina. No final de cada um dos estágios são realizadas operações de lavagem, que permitem a extração dos compostos sucessivamente solubilizados (AGAPITO, 2007).

No processo de oxidação usa-se como reagente o dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) que oxida, solubiliza e descolora a lignina, sem degradar a celulose. As fases de extração são realizadas recorrendo-se à aplicação de NaOH, O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e conduzem a uma aumento da reatividade da pasta, obtendo-se brancuras mais elevadas e mais estáveis. O NaOH é utilizado na primeira extração alcalina para dissolver as cloro lignina e outras matérias coradas. O O<sub>2</sub> oxida e solubiliza a lenhina, conduzindo a uma diminuição do consumo do dióxido de cloro nas fases seguintes. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimina alguns grupos cromóforos

que conferem cor à pasta, permitindo um branqueamento mais eficaz (AGAPITO, 2007).

A pasta branqueada é conduzida às torres de armazenamento e de seguida é submetida a um processo de secagem, obtendo-se um produto acabado para a expedição (AGAPITO, 2007).

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

### 3.4 EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE

Os efluentes da indústria de pasta e do papel são poluidores. Embora o volume gerado durante a etapa de branqueamento seja cerca de 10m<sup>3</sup> por tonelada de polpa, é nessa etapa que se formam os compostos mais deletérios para o ambiente, como demonstrado na Figura 3.

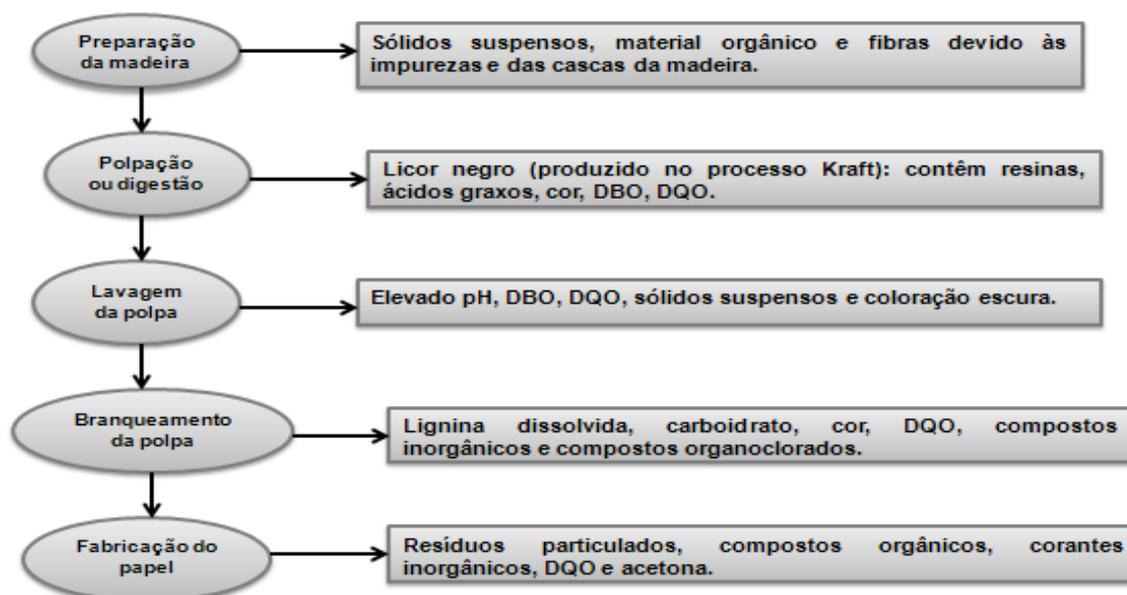


Figura 3: Poluentes originados pelas diferentes etapas de fabricação do papel e celulose. Fonte: Adaptado de Pokhrel e Viraraghavan (2004).

Durante o processo convencional de branqueamento, utiliza-se cloro para a remoção da lignina residual presente nas fibras celulósicas, sendo gerada uma enorme variedade e quantidade de substâncias organocloradas recalcitrantes e altamente tóxicas (ALMEIDA et al., 2004), tais como dioxinas, clorocatecóis, cloroguaiacóis e clorofenóis (XIE et al., 1986; ODENDAHL, 1994).

Segundo Durán (2004), os efluentes originados na produção e no branqueamento das polpas Kraft podem causar toxicidade aguda ou crônica, mutagenicidade, deficiência de oxigênio, eutrofização nos corpos d'água receptores e, conseqüentemente, modificações nas comunidades de plantas e de animais. Em função desses impactos ambientais, esforços têm sido realizados no sentido de reduzir ou eliminar o uso de compostos clorados nas etapas de branqueamento da polpa Kraft, buscando-se por meio de estudos, nos últimos anos, a substituição desses compostos por agentes à base de oxigênio (oxigênio, peróxido de hidrogênio e ozônio). A produção de polpa totalmente livre de cloro (TCF- *total chlorine free*) permanece praticamente a mesma, o agravante é que o efluente das TCF tem apresentado toxicidade crônica e os compostos ainda não foram identificados. Dessa forma, novas alternativas têm sido buscadas e a tendência atual é a produção de polpas livres de cloro elementar (ECF), por meio de processo que emprega dióxido de cloro ao invés de cloro elementar (GARCIA, 2009).

### 3.5 BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MADEIRA

Segundo Rabinovich et al. (2004) a decomposição da matéria orgânica é um processo que ocorre naturalmente pela ação de microrganismos como fungos e bactérias. Tais organismos se utilizam dessas substâncias orgânicas para a obtenção de nutrientes e energia. No caso particular de compostos orgânicos de elevada toxicidade e complexidade, são poucos os organismos capazes de não somente degradá-los, mas também de suportar as condições

adversas que esses compostos impõem ao ambiente em que se encontram depositadas (OKADA, 2010).

Vários organismos, como bactérias e fungos, são capazes de degradar a madeira, sendo que, em ecossistemas terrestres naturais, os fungos da classe *Basidiomycetes* são os considerados os melhores. Morfologicamente, são caracterizados pela produção de esporos de origem sexuada (estruturas denominadas basídios), apresentam micélio dicariótico durante maior parte do ciclo sexual e hifas septadas que podem formar anéis (alças de conexão envolvidas na manutenção da dicariose característica desse grupo) (ALEXOPOULOS et al., 1996). Na natureza, desempenham importante papel na ciclagem de nutrientes. Crescem, principalmente, sobre madeira em decomposição e outros resíduos de origem vegetal (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Os fungos são classificados de acordo com as diferenças de padrões de degradação da madeira que apresentam, levando-se em conta a característica macroscópica da degradação (BLANCHETE, 1991; HATAKKA, 1994; TUOR, 1995). Desta forma, podem ser divididos em fungos de degradação ou podridão branca, podridão parda e podridão mole.

Os basidiomicetos causadores de podridão branca possuem um sistema enzimático que os tornam capazes de utilizar fontes complexas de carbono, sendo assim responsáveis pela degradação da celulose, hemicelulose e da lignina, quebrando-a em moléculas menores até  $\text{CO}_2$  e água, originando resíduo de coloração clara, por isso, são denominados fungos ligninocelulíticos. Os causadores de podridão parda, por sua vez, removem, seletivamente, a celulose e a hemicelulose da madeira, com capacidade causar limitadas mudanças na lignina, observando-se uma coloração escura nos locais degradados (GUGLIOTTA, 2001; MATHEUS; OKINO, 1998). Os fungos de podridão mole podem degradar tanto os polissacarídeos quanto a lignina, porém em velocidades muito reduzidas (KIRK; CULLEN, 1998).

Fungos da podridão branca começaram a ser utilizados como alternativa para realizar a descoloração de efluentes e degradação de compostos

xenobióticos a partir da década de 1980. O início dos estudos sobre estes fungos em processos de biorremediação se deve à presença de seus complexos enzimáticos, capazes de catalisar a degradação de uma grande variedade de compostos aromáticos (BURATTO, 2010). De acordo com SILVA et al. (2000) biorremediação é a descontaminação do ambiente, utilizando a habilidade natural dos organismos em mineralizar, transformar ou até mesmo combinar compostos poluentes com outras moléculas.

Segundo Souza (2009) esses fungos secretam enzimas que convertem polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. De acordo com Moreira Neto (2006), estudos sobre a degradação da lignina por basidiomicetes ligninolíticos fornecem informações para a aplicação destes fungos em inúmeras pesquisas envolvendo a biodegradação de diversos xenobióticos.

### 3.5.1 Sistemas enzimáticos encontrados em fungos ligninolíticos

Enzimas são proteínas com atividade catalítica, são constituídas por uma parte proteica, porém podem estar integradas a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. Existe uma grande variedade de enzimas, sendo a maioria encontrada em pequenas quantidades. Algumas enzimas extracelulares são produzidas em grandes quantidades por certos organismos e são capazes de digerir materiais nutritivos insolúveis, como celulose, proteínas e amido. Sua utilização é feita em processos biotecnológicos industriais, ajudando a reduzir a poluição do meio ambiente (FORGIARINI, 2006).

Um aspecto importante do uso de enzimas na degradação de poluentes consiste na sua seletividade e eficiência (MELO et al., 2008), tendo como vantagens em relação aos catalisadores químicos, como reutilização, maior especificidade, menor consumo energético maior velocidade de reação e redução dos custos de maquinaria e laboratoriais (MUSSATO et al. 2007).

As enzimas envolvidas no mecanismo de degradação de compostos recalcitrantes por fungos ligninolíticos são do grupo fenoxidases, como a Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP) e Lacases. Segundo Kamida et al. (2005), os fungos diferem na habilidade de degradação destas substâncias, devido às características individuais qualitativas e quantitativas de suas enzimas.

Entre os fungos, produtores de enzimas lignolíticas, os mais estudados para a degradação de compostos com lignina são o *Phanerochaete chrysosporium* e os gêneros *Pleurotus*, *Trametes* (BETTIN, 2010) e *Ceriporiopsis subvermispota* (AGUIAR, 2012).

Segundo Agapito (2007) os fungos de podridão branca, como o *Phanerochaete chrysosporium*, produzem enzimas, incluindo a lignina peroxidase e a manganês peroxidase, as quais são capazes de degradar não só a lignina, mas também ligninas cloradas. Este fungo revelou ser bastante eficiente na descoloração de efluentes papaleiros, enquanto que o fungo *P. flavidoalba* demonstrou ser o mais eficiente na produção de enzimas extracelulares como a lignina peroxidase e a manganês peroxidase, no estudo realizado por Selvam et al. (2002).

#### 3.5.1.1 Lignina Peroxidase (LiP)

As peroxidases são produzidas por um grande número de microrganismos e plantas. Elas catalisam uma variedade de reações, sendo que todas requerem a presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) para sua ativação. O peróxido de hidrogênio primeiro oxida a enzima, a qual oxida o substrato. As peroxidases, entre elas a lignina peroxidase, manganês peroxidase e outras peroxidases de diferentes fontes, têm sido usadas em escala laboratorial para o tratamento de contaminantes aromáticos em meio líquido (KARAM; NICELL, 1997).

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

#### 3.5.1.2 Manganês Peroxidase (MnP)

A ação do Manganês Peroxidase (MnP) é muito semelhante à lignina peroxidase (LiP), entretanto, além do peróxido de hidrogênio esta enzima requer íons  $Mn^{+2}$  e oxida Mn(II) a Mn(III) (CRAWFORD; POMETTO, 1988). É extracelular, glicosilada, tem massa molar de 45-47 kDa e possui um grupo prostético heme (heme-proteínas). Entretanto, é dependente do peróxido do hidrogênio e do íon  $Mn^{+2}$ . Sabe-se, além disso, que os  $\alpha$ -cetoácidos, como o lactato, estabiliza sua atividade oxidativa (DURÁN, 2004).

Segundo Hatakka (1994) e Tuor e Fiecher (1995), a biodegradação de madeira e de lignina por fungos basidiomicetos tem sido atribuída a MnP. A razão para isso é que essa enzima gera espécies oxidantes pequenas, de fácil penetração na madeira o que explicaria o ataque inicial a estes substratos. Por outro lado, o fato de que esta enzima oxida apenas estruturas fenólicas, impõe uma limitação a sua capacidade de degradar integralmente ligninas de alta massa molecular (KIRK; FARRELL, 1987).

#### 3.5.1.3 Lacase

Lacases são fenol oxidases produzidas por fungos e por plantas, pertencentes ao grupo de oxidases que complexam cobre. Essas enzimas são

segregadas na maioria dos basidiomicetos e suas massas molares estão dentro da faixa de 60-100 kDa (DURÁN, 2004).

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

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

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

### 3.6 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE

#### 3.6.1 *Daphnia magna*

Utilizada como organismos - testes e também conhecidas como pulga d' água, as Daphnias compõem o zooplâncton como consumidores primários e secundários, os microcrustáceos fazem a ligação entre níveis inferiores e superiores da cadeia alimentar. São facilmente encontradas em lagos e

represas de águas continentais (FRELLO, 1998). Segundo KNIE (2004), a *Daphnia magna* possui tamanho médio de 5 a 6 mm e alimentam-se, através, da filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares. É considerado um organismo filtrador, alimentam-se de algas, bactérias e detritos orgânicos presentes na água. A filtração é essencialmente efetuada pelas patas torácicas, que agem como peneiras para selecionar partículas presentes na água (BUIKEMA e SHERBERGER, 1977).

As *D. magna* atendem as exigências das normas dos ensaios ecotoxicológicos e estão entre os organismos mais utilizados nos bioensaios, como representantes dos invertebrados aquáticos. A sua utilização se deve ao ciclo de vida relativamente curto com elevada taxa reprodutiva, necessidade de pequenos espaços para sobrevivência, facilidade de adaptação às condições de laboratório, facilidade de manejo, e, principalmente, ampla sensibilidade a grande variedade de produtos químicos, como os agrotóxicos (ARAUCO et al., 2005; VILLARROEL et al., 2003). Por isso, vários trabalhos descritos na literatura classificam a *D. magna* como um dos organismos mais sensíveis aos contaminantes ambientais.

De acordo com Furley et al. (2001), os compostos tóxicos podem resultar em significantes reduções no número de uma particular população de bactérias do tratamento secundário tendo como resultado, a alteração da eficiência de biodegradação de substâncias e da qualidade final do efluente tratado. Assim sendo, os testes de toxicidade são ferramentas biológicas úteis para se avaliar a qualidade de efluentes de fábricas de celulose Kraft, bem como mudanças na qualidade deste efluente em função de alterações no processo (DUBE; MACLATCHY, 2000).

### 3.6.2 *Lactuca sativa*

As plantas representam uma parte essencial dos ecossistemas, seja em ambientes aquáticos ou terrestres. Elas em conjunto com outros organismos fotossintetizantes, tais como as algas, produzem oxigênio e importam

compostos orgânicos e inorgânicos que sustentam quase todas as outras formas de vida (WANG, 1989).

Em geral, o uso de testes de toxicidade com plantas (fitotoxicidade), oferece algumas vantagens quando comparados a outros organismos, isto porque elas podem apresentar maior sensibilidade ao estresse ambiental, sendo fáceis de manipular, armazenar, e, além disso, oferecem uma boa correlação de baixo custo, simplicidade e efetividade quando comparados a outros bioensaios (WANG, 1989).

Outras vantagens em se utilizar biomarcadores com plantas esta na grande variedade de “*end points*” que é possível de ser avaliado, ou seja, através de uma única espécie é possível registrar para cada ensaio a taxa de germinação, inibição de crescimento, biomassa, atividade enzimática, etc (BAGUR-GONÇALVEZ et al., 2010; RIZZO, 2011).

Uma das espécies mais utilizadas na avaliação toxicológica de amostras ambientais é a Alface (*Lactuca sativa* L.), e como organismo teste, tem mostrado sensibilidade a diversos agentes estressores, possuindo requisitos alguns importantes como: fácil disponibilidade, rápido crescimento e germinação, bem como importância econômica (RODRÍGUEZ; PERERA, 2009).

Segundo Sobrero e Ronco (2004), o bioensaio de toxicidade com sementes de alface é considerado uma prova estática de toxicidade aguda (120 horas de exposição), em que se podem avaliar os efeitos fitotóxicos de compostos químicos puros ou misturas complexas durante o processo de germinação das sementes e emergência da plântula durante os primeiros dias de crescimento. Como parâmetro de avaliação dos efeitos fitotóxicos, determina-se a inibição da germinação e inibição de crescimento da raiz, seja ela através do comprimento total (hipocótilo e radícula), ou separadamente, do registro de cálculo de inibição do hipocótilo e radícula.

Este ensaio pode ser aplicado na avaliação da toxicidade de compostos puros, de águas superficiais (lagos e rios), águas subterrâneas, águas para o

consumo humano, águas residuárias domésticas e industriais, lixiviados de solos, sedimentos, lodos e outras matrizes sólidas (SOBRERO; RONCO, 2004).

## 4 METODOLOGIA

O estudo da biodegradação do efluente Kraft por basidiomicetos foi realizado em quatro etapas, conforme demonstrado na Figura 4.

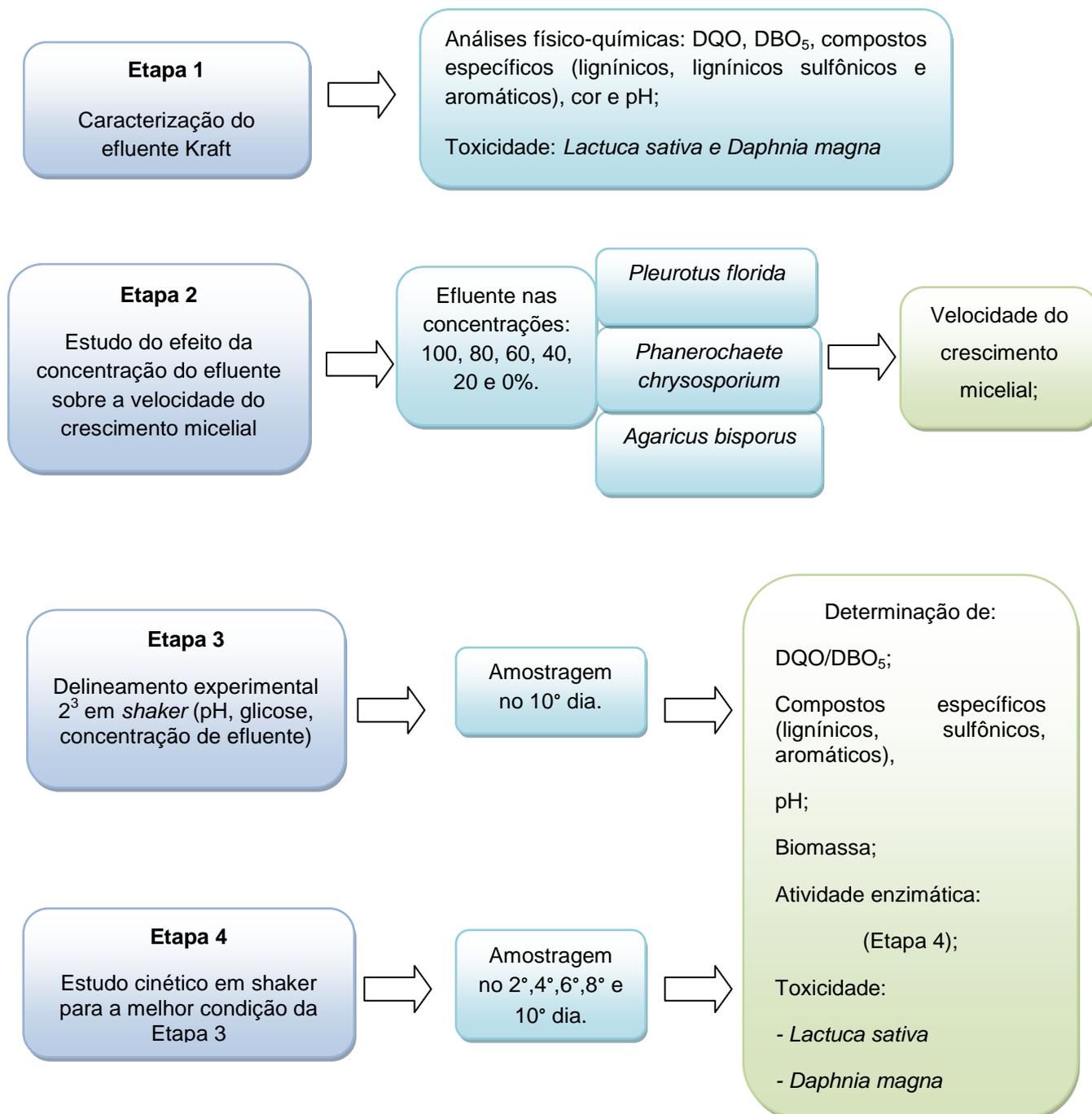


Figura 4: Etapas dos processos metodológicos do trabalho.

As análises e experimentos foram realizados em duplicata e acompanhados de amostras padrões (branco).

Toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho foi cordialmente oferecida pelo Departamento de Química e Biologia – DAQBI da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sede Ecoville, sendo todos os materiais e equipamentos empregados, nos processos de tratamento e controles analíticos, pertencentes a este departamento.

Todo o material utilizado nos experimentos foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1,1 atm por 15 minutos. Após os estudos o material foram descontaminados antes do descarte, nas mesmas condições mantidas por 30 minutos.

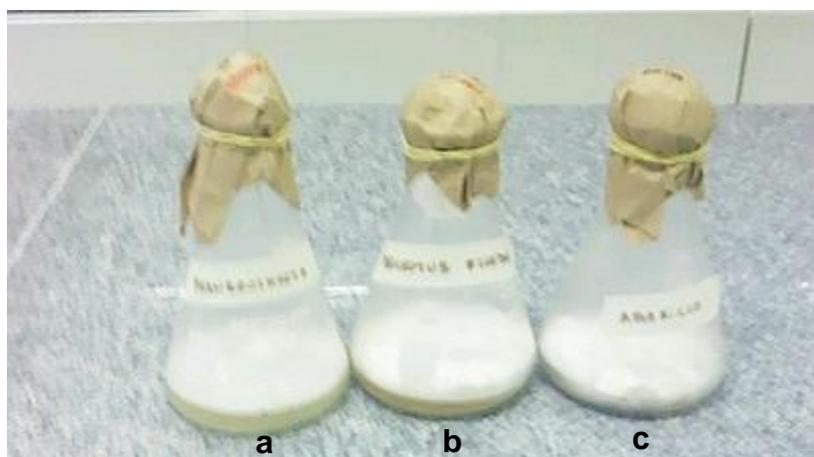
#### 4.1 ETAPA 1: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DO EFLUENTE

As amostras de efluente Kraft empregada neste trabalho foram fornecidas por uma indústria de celulose da região de Curitiba. A indústria utiliza *Pinus taeda* e *Pinus elliotti* como matéria-prima e produz celulose Kraft sem branqueamento. As mesmas foram armazenadas em bombonas de 5 litros e colocadas em geladeira (aproximadamente 6°C), para evitar a degradação do efluente por fotólise e temperatura.

Foram realizadas análises físico-químicas como DQO (4.7.3), DBO<sub>5</sub> (4.7.4) compostos específicos (lignínico, lignínicos sulfônicos e aromáticos – 4.7.2), pH (4.7.5), degradação de cor (4.7.2) e teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* (5.4.) e com *Lactuca sativa* (5.4).

## 4.2 FUNGOS

As cepas dos fungos utilizados neste trabalho foram: *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, o *Agaricus bisporus* ABI 25 e *Pleurotus florida* PSP 1 (Figura 5). As cepas foram cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia – DAQBI/UTFPR, e se enquadram em Nível de Biossegurança 1, ou seja, não apresentam risco para o homem e para o ambiente. Os fungos foram repicados periodicamente em meio PDA (*potato dextrose agar*) e incubados à 26°C.



**Figura 5: Fotografia do cultivo do inóculo em Erlenmeyers cultivados a 26°C por 7 dias.**  
**a) *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725; b) *Pleurotus florida* PSP 1;**  
**c) *Agaricus bisporus* ABI 25.**

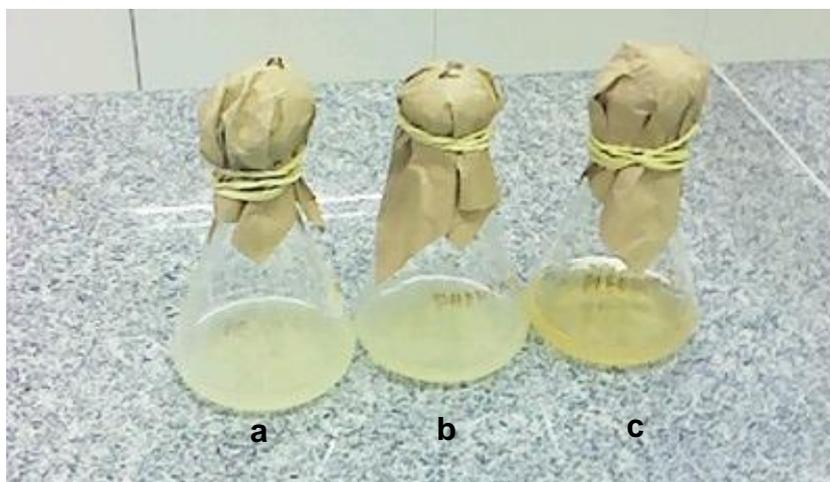
### 4.2.1 Preparo e Quantificação dos Inóculos

O inóculo dos fungos foi preparado segundo o método de Spier (2005), resultando numa suspensão de  $10^4$  células/mL (RODRIGUES et al., 2010).

A suspensão de células foi produzida a partir do cultivo em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio PDA estéril. Depois de

resfriado (45-55°C) o meio foi inoculado em superfície a partir de uma cepa previamente ativada, sendo incubado por 7 dias à 26°C em estufa (Marca De Leo, modelo B3CBE), até completo crescimento (Figura 5).

Um tubo de ensaio contendo 30 mL de água peptonada, 0,2% de Tween 80, 2,0 g de pérolas de vidro e uma barra magnética, foi esterilizado para ser utilizado na recuperação das células dos fungos. As células foram recuperadas da superfície do meio de cultivo vertendo-se a solução sobre o micélio e mantendo o conjunto sob agitação no agitador magnético (Marca d. Tomé) por 15 minutos. A suspensão obtida foi conservada a 4°C por até 30 dias, conforme a figura 6. (SPIER, 2005). Em trabalhos futuros seria interessante realizar o teste de viabilidade dessa suspensão durante o período de estudo.

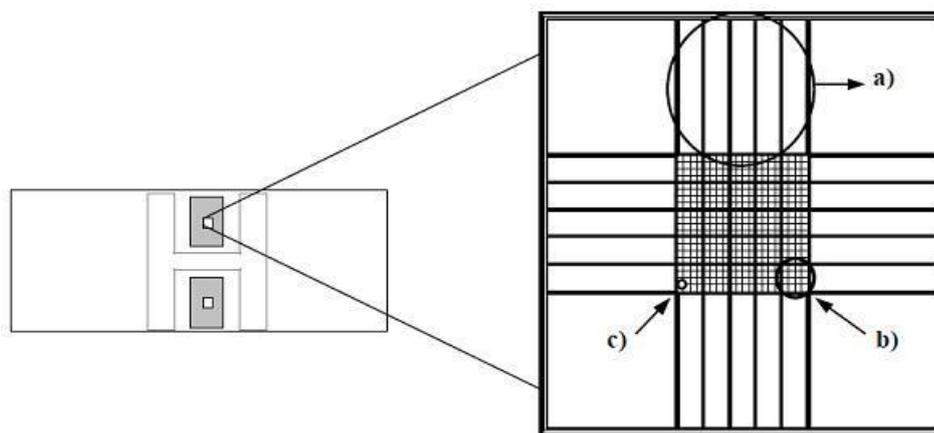


**Figura 6: Fotografia dos frascos de Erlenmeyers contendo a suspensão de células: a) *Agaricus bisporus* ABI 25; b) *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725; c) *Pleurotus florida* PSP 1.**

A determinação da quantidade de células por mL das suspensões foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Figura 7) e posterior confirmação por contagem em placas.

A câmara de Neubauer é composta por uma lâmina de vidro com duas áreas de contagem (uma de cada lado da Câmara), cada uma possuindo 0,1 mm de profundidade. Cada câmara é dividida em 9 quadrados grandes (Figura 7

- a), delimitados por três linhas brancas. O quadrado grande central e subdividido em 25 quadrados médios (Figura 7 - b). Estes 25 quadrados são novamente subdivididos em 16 quadrados menores (Figura 7 - c). Esta superfície marcada tem uma área de  $9 \text{ mm}^2$ . Uma lamínula deve ser utilizada para cobrir as duas câmaras de contagem (VICCINI, 2004).



**Figura 7: Representação da área de contagem da Câmara de Neubauer**  
Fonte: VICCINI, 2004.

Inicialmente a câmara e a lamínula foram limpas com água deionizada. Na sequência, com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota da suspensão de células foi transferida para a câmara. Em seguida, a câmara foi colocada sob o microscópio (objetiva de 40x) para contagem das células. Foram contadas todas as células que estavam dentro da área do quadrado grande central, incluindo aqueles que estavam sobre as linhas superiores e direitas do perímetro externo do quadrado médio. As células que estavam sobre as linhas inferiores e esquerdas deste quadrado não foram incluídas na contagem. Após a contagem, a lamínula foi retirada e juntamente com a câmara, foram limpas com água deionizada, sendo este protocolo realizado em triplicata e repetido para as outras suspensões (MARTINS, 2009).

Depois de realizado o processo de contagem, a quantidade de células por mL foi calculada. O resultado foi expresso em células em  $0,1 \text{ mm}^3$ , este foi convertido em células por ml, seguindo a equação 1:

$$\text{N}^\circ \text{ de células por mL} = \text{n}^\circ \text{ total células} / 0,1\text{mm}^3 \cdot 1000 \text{ mm}^3 / 1\text{mL/fator de diluição} \quad (1)$$

O resultado foi confirmado por contagem em placas, através do plaqueamento em PDA (*potato dextrose agar*), pela técnica do espalhamento, sendo fornecido um resultado em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL. Essa confirmação foi realizada em triplicata (RODRIGUES et al.,2010). Uma alíquota de 0,1 mL da suspensão de células nas placas, sendo em seguida, incubadas por 26°C por 24/48 horas para posterior contagem das colônias (APHA, 1998).

#### 4.3. ETAPA 2: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EFLUENTE SOBRE A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL

##### 4.3.1 Preparo de Placas com Poços

Para o preparo dos meios de cultivo foi utilizado uma mistura de efluente e ágar (1,5%). Diferentes concentrações do efluente foram avaliadas: 100%, 80%, 60%, 40%, 20% e 0%.

As placas foram preenchidas com meio de cultivo com *lay-out* semelhante ao utilizado em antibiogramas, com poços no centro, conforme procedimento descrito por Ferronato e Salmasso (2010). Distribuiu-se 15 mL do meio em placas de Petri mantendo-as em repouso até resfriamento do meio.

Em seguida foram colocados cilindros de 8 mm de diâmetro previamente autoclavados no centro da placa, com o auxílio de uma pinça estéril, evitando sempre que o cilindro se depositasse no fundo da mesma. Posteriormente, adicionou-se mais 15 mL de meio, mantendo as placas em repouso até a completa solidificação.

#### 4.3.2 Inoculação e Medição do Crescimento Radial

Nos poços das placas foram adicionadas 0,1 mL da suspensão de células das cepas, em seguida as placas foram incubadas a 26°C. O acompanhamento do experimento foi feito através do crescimento radial (mm), medido com auxílio de um paquímetro durante 7 dias, sendo marcados quatro raios contando a partir do centro até a sua extremidade, como mostra a figura 8.



**Figura 8: Fotografia de uma placa de Petri demonstrando a marcação dos quatro raios.**

Foi construído um gráfico de crescimento radial (mm) x tempo (dia) para avaliar o crescimento das cepas (SPIER, 2005).

#### 4.4 ETAPA 3: OTIMIZAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO EM CULTIVO LÍQUIDO

Nesta etapa, procedeu-se um delineamento experimental ( $2^3$ ) com o objetivo avaliar a biodegradação, através da otimização das condições de cultivo.

Em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo (Tabela 1 e 2) foram inoculados *Pleurotus florida*. Foi feita a inoculação de 4 mL da suspensão com de células com  $1,2 \times 10^4$  UFC. mL<sup>-1</sup> em cada frasco.

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

Após o período de incubação as amostras foram filtradas em papel Whatmann n°1 e o sobrenadante foram analisados em relação aos parâmetros especificados no item 4.7.

**Tabela 1: Variáveis e níveis de estudo - Planejamento fatorial  $2^3$ .**

Variáveis	Nível (-)	Nível (+)
pH	8,3	7,0
Glicose (g. L <sup>-1</sup> )	0	10
Concentração de Efluente (%)	10	20

**Tabela 2: Matriz padrão para o planejamento experimental  $2^3$  feito individualmente para cada fungo.**

Níveis/ ensaios	pH	Glicose	% Efluente	Resposta
1	-	-	-	Velocidade de Descoloração e Atividade Enzimática
2	+	-	-	
3	-	+	-	
4	+	+	-	
5	-	-	+	
6	+	-	+	
7	-	+	+	
8	+	+	+	

#### 4.5 ETAPA 4: ACOMPANHAMENTO DA CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO NA MELHOR CONDIÇÃO DA ETAPA 3

Foi realizado um estudo cinético em *shaker* para a condição de cultivo que apresentou maior biodegradação na etapa 3, segundo experimento e análises conduzidos conforme descrito no item 4.4.

#### 4.6 ANÁLISES

##### 4.6.1 Determinação da Biomassa Micelial

Para a determinação do peso da biomassa micelial, as amostras dos experimentos realizados em *shaker* foram filtradas em papel Whatmann n°1 (previamente seco por 24 h a 60°C e pesado). A biomassa filtrada foi lavada com 50 mL de água destilada estéril. O papel filtro com o micélio foi colocado em estufa a 60°C durante 48 horas. O peso seco da biomassa foi determinado gravimetricamente em balança analítica (RUEGGER, 2001).

##### 4.6.2 Remoção de Cor, Compostos Aromáticos, Lignínicos e Lignosulfônicos

As análises de remoção de cor do efluente bruto e após o tratamento biológico foram realizadas no comprimento de onda de 440 nm, em Espectrofotômetro UV-VIS Cary-50 Varian, em cubeta de quartzo (10 mm) (FIELD; LETTINGA, 1987; SIERRA-ALVAREZ et al., 1990).

A remoção dos compostos aromáticos foi determinada no comprimento de onda 254 nm, compostos lignínicos em 280nm e os lignosulfônicos em 346

nm, ajustando o pH para 7 em cubeta de quartzo através da adaptação do método descrito por ÇEÇEN et al. (2003).

#### 4.6.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO foi determinada através do método de refluxo fechado colorimétrico seguindo os procedimentos 5220 C5-12 do *Standard Methods* (APPHA, 1995).

Utilizando-se tubos rosqueáveis, foram adicionados 2,0 mL das amostras, 1,5 mL de solução digestora ( $K_2Cr_2O_7$ ,  $HgSO_4$ ,  $H_2SO_4$  concentrado e água destilada) e 3,5 mL de  $H_2SO_4/AgSO_4$  a cada tubo. Os tubos foram rosqueados firmemente, homogeneizados com cuidado e, então, colocados no digestor por 2 horas a  $150^\circ C$ . Após a digestão, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e submetidas à leitura de absorvância de 600 nm em espectrofotômetro UV-vis (Cary-win50), utilizando-se uma cubeta de quartzo (10 mm) (NOZU et al., 2010). A concentração da demanda de  $O_2$  da amostra, em mg/L, foi obtida a partir de uma curva de calibração que utilizou biftalato de potássio como padrão (APHA, 1995).

#### 4.6.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio ( $DBO_5$ )

A análise da Demanda Bioquímica de Oxigênio ( $DBO_5$ ) foi determinada pela diferença entre o oxigênio dissolvido inicial e o residual após os 5 dias de incubação a  $20 \pm 1^\circ C$  (APHA, 1995).

#### 4.6.5 Medição do Potencial Hidrogênioônico

A medição do pH foi realizada em pHmetro digital, modelo Digimed DM2, utilizando-se um eletrodo de vidro, previamente calibrado com brancos (pH 4,0 e pH 7,0), imerso nas amostras levemente agitadas, até o estabelecimento do equilíbrio (NOZU et al., 2010).

#### 4.6.6 Atividades Enzimáticas

As atividades enzimáticas de manganês peroxidase (MnP) e lacase (La) foram utilizadas pequenas alíquotas do meio de cultivo líquidos pós-cultivo, sendo realizadas análises em triplicata e as leituras de absorvância efetuadas com auxílio de espectrofotômetro UV-vis (Cary-win50). Os resultados de atividade enzimática foram calculados pela equação 2 (PERREIRA, 2011).

$$U/L = (\Delta Abs / \xi \cdot R \cdot t) \cdot 10^6 \quad (2)$$

Onde:

U/L = Unidade Internacional (micromol por minuto)

$\Delta Abs$  = Absorvância (Abs final – Abs inicial)

$\xi$  = Coeficiente de absorção molar

R = Volume da solução da amostra (mL)

t = tempo de reação em minutos

$10^6$  = Conversão da medida para litro.

Coeficientes de absorção molar:

Lacase (525 nm) =  $65000 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Manganês Peroxidase (610 nm) =  $4460 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$

#### 4.6.6.1 Manganês peroxidase (MnP)

Foram adicionados 0,5 mL da amostra a 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de  $\text{MnSO}_4$  2,0 mM, 0,1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,0 mM preparado em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,0) (SARTORI, 2011) e 0,1 mL de vermelho de fenol (0,1%). A amostra foi analisada na temperatura de 30°C após 5 minutos de reação (interrompida pela adição de 0,04 mL NaOH) no comprimento de onda de 610 nm (KUWAHARA, 1984).

#### 4.6.6.2 Lacase

A atividade de lacase foi determinada segundo o protocolo de Szklarz et Al. (1989), adicionando 0,6 mL de extrato enzimático a um tubo contendo 0,1 mL siringaldazina com 1,0 mM em etanol absoluto, 0,6 mL tampão citrato fosfato 0,05 M e 0,1 mL água deionizada. A reação ocorreu após 10 minutos e a leitura em 525 nm (SZKLARZ et al., 1989).

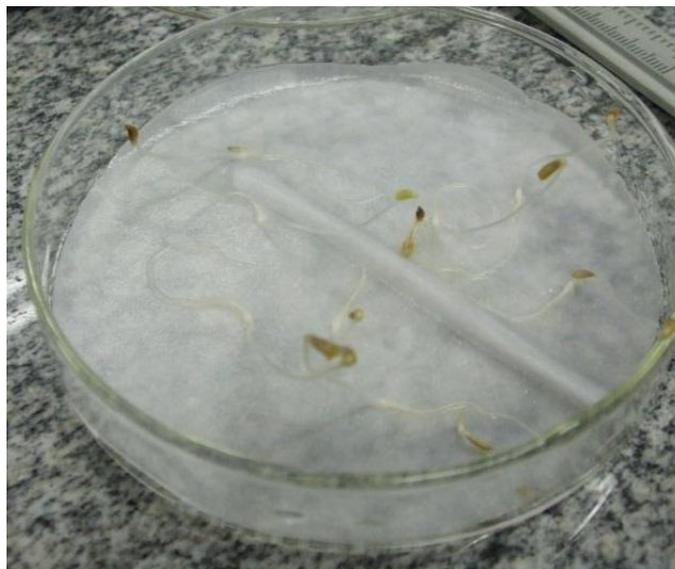
#### 4.6.7 Bioensaio de toxicidade

##### 4.6.7.1 *Lactuca sativa*

Os bioensaios com sementes de alface foram realizados de acordo com os métodos propostos em Sobrero e Ronco (2004). O método do bioensaio de toxicidade aguda com a semente de alface (*Lactuca sativa*) é o método da taxa de germinação e comprimento de raiz, o qual tem como base à verificação da germinação das sementes e a propagação da raiz do vegetal submetido a um meio contaminado com o efluente da indústria de papel e celulose.

Foram analisados os efluentes brutos nas concentrações 100%, 20% e 10% e os meios líquidos dos após tratamento biológico realizado em *shaker*. As placas de Petri autoclavadas (121°C/15 min) foram forradas com papel filtro (do tipo Whatman nº3, com 90 mm de diâmetro), receberam 10 sementes de alface e 2,5 mL de efluente dos respectivos experimentos (Figura 9). Foi realizado um controle negativo contendo água destilada deionizada e um controle positivo com o herbicida glifosato 2%. As placas ficaram incubadas (estufa Quimis 316 – B24) no escuro a 26°C por 5 dias. Após o tempo de incubação foi verificada a quantidade de sementes germinadas e medido o comprimento de suas raízes em cm com o auxílio de um paquímetro, correspondente a cada concentração, controle negativo e positivo (Adaptado de NOZU et al., 2010).

Os estudos foram realizados em triplicatas e calculados as médias, desvios-padrão e porcentagem de germinação, sendo considerado para cálculo, o registro de sementes que germinaram normalmente, considerando como critério, o aparecimento efetivo da raiz.



**Figura 9: Fotografia de sementes de *L. sativa* germinadas sobre papel filtro umedecido com água deionizada, após cultivo de 7 dias em 26°C.**

#### 4.6.7.2 Bioensaio com *Daphnia magna*

Este bioensaio utilizou como bioindicador a *Daphnia magna*, que é um organismo que apresenta alta sensibilidade a tóxicos, alta disponibilidade e abundância, e facilidade de cultivo e adaptabilidade às condições laboratoriais.

Foram analisados o efluente bruto e os tratados biologicamente, conforme descritos nos itens 4.4, 4.5 e 4.6. Em cada série de experimento foi adicionados para cada respectiva diluição 10 organismos jovens (entre 2 a 24 h de vida), sendo expostas em copos descartáveis de 25 mL (com três repetições para cada diluição), totalizando 30 indivíduos (ALVES; SILVANO, 2006).

Após 24 horas de exposição em incubadora com fotoperíodo e temperatura controlada, foram observados o número de organismos que não apresentaram mobilidade. Calculando em seguida a CE (I)50 (concentração efetiva) que se baseia nas condições em que não ocorra mortalidade das daphnias, quando estas são expostas ao dicromato de potássio em determinado tempo e concentração (CETESB, 1990). Sendo então preparados diluições de: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 0% (controle negativo com água destilada de diluição), conforme a figura 10.



**Figura 10: Fotografia das diluições do efluente Kraft para o teste com *D. magna*.**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

#### 5.1.1 Análises físico-químicas

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas de caracterização do efluente *Kraft* nas concentrações 100%, 20% e 10%.

**Tabela 3: Resultados das análises físico-químicas do efluente *Kraft*.**

Parâmetros	100%	20%	10%
pH	8,6 ± 0,1	8,3 ± 0,1	8,0 ± 0,1
DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	700 ± 8,6	428 ± 28,9	302 ± 21,2
DBO <sub>5</sub> mg (O <sub>2</sub> /L)	250,5 ± 5,6	80 ± 3,4	21 ± 6,8
Cor (VIS <sub>440</sub> ) em absorbância	0,73 ± 0,3	0,18 ± 0,4	0,17 ± 0,1
Compostos Aromáticos (UV <sub>254</sub> )	4,56 ± 0,2	2,01 ± 0,1	1,90 ± 0,2
Compostos Lignínicos (UV <sub>280</sub> )	4,39 ± 0,2	1,72 ± 0,3	1,64 ± 0,3
Compostos Lignosulfônico (VIS <sub>346</sub> )	2,80 ± 0,5	0,62 ± 0,2	0,49 ± 0,4

É possível observar a partir dos dados (Tabela 3) que a concentração de DBO<sub>5</sub> e DQO no efluente bruto 100% não tratado fornece uma relação de DBO<sub>5</sub>/DQO de 0,36 ± 0,07, o que indica que este efluente pode ser tratado biologicamente (ARAUJO, 2011). Valores semelhantes foram encontrados por Chamorro (2010), que obteve valores de 0,34 ± 0,007 desta relação, para efluentes de celulose kraft de outra indústria.

Pode-se se observar um valor de pH para o efluente 100% na ordem de 8,6, o que indica que o efluente é proveniente do processo básico. Segundo

Braile (1993) a concentração hidrogeniônica é um importante parâmetro de qualidade de despejos indústrias. A faixa de concentração adequada para a existência de vida (micro-organismos e plantas) é muito estreita e crítica. O pH está associado, entre outros fatores, à disponibilidade de nutrientes na forma iônica e à solubilidade de íons metais, os quais podem ser altamente tóxicos aos fungos. As enzimas atuantes no sistema ligninolítico demonstram um pH ótimo de atividade que, de maneira geral, situa-se entre 3,5 e 7 (MOREIRA; NETO, 2006).

Verifica-se que o efluente bruto (100%) possui elevada concentração de compostos aromáticos e de grupamentos cromóforos. A cor do efluente da indústria de papel e celulose é grandemente responsabilizada pela presença de ligninas e seus derivados, taninos polimerizados, nos quais são advindos dos despejos da polpação, branqueamento e reciclos dos processos. Tem sido demonstrado que a lignina é convertida em tio-lignina e alcali-lignina no processo Kraft e ligno-sulfatos no processo sulfeto (ALI E SREEKRISHNAN, 2001).

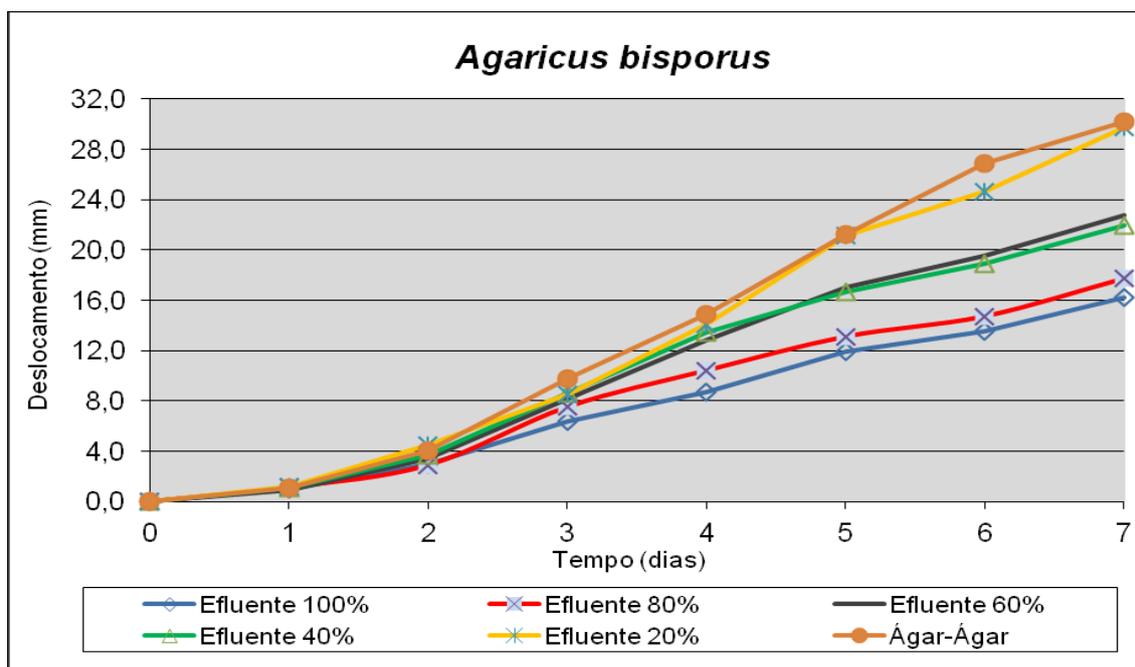
Duwe (2013) encontrou o valor de  $0,70 \pm 0,01$  para o parâmetro de cor, mostrando concordância com o valor encontrado nesse trabalho. Porém, Klenk et al. (2012) e Vanzetto et al. (2011) encontraram valores menores de 0,20 e 0,41, respectivamente, demonstrando que há uma grande variação entre os efluentes, devido ao fato de possuírem características diferentes que são influenciadas pela matéria-prima e pelo processo produtivo.

Os resultados dos testes de toxicidade serão apresentados no final do trabalho com o intuito de comparar valores antes e pós-tratamento biológico.

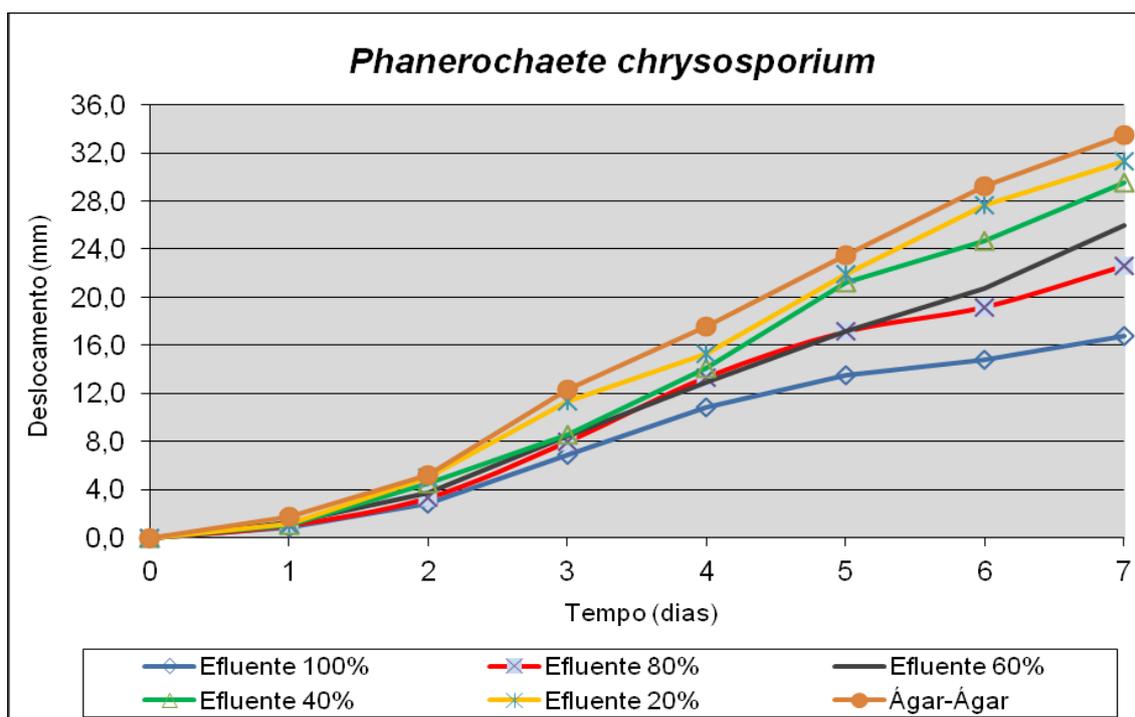
## 5.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EFLUENTE SOBRE A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL

A concentração inicial de células utilizadas para o inoculo dos fungos *Agaricus bisporus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus florida* no meio líquido foram de  $2,0 \times 10^6$ ,  $1,6 \times 10^5$  e  $1,2 \times 10^4$  UFC. mL<sup>-1</sup>, sendo necessário uma maior diluição do último fungo devido a ele crescer em maior quantidade e apresentar um maior número de hifas.

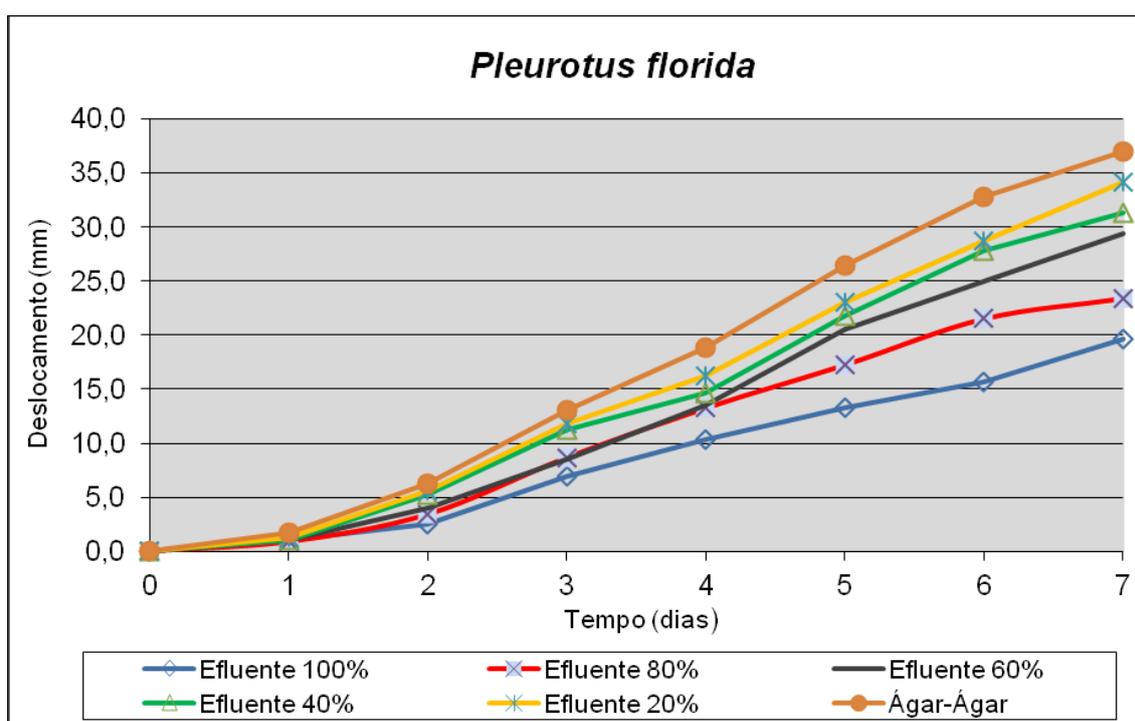
Os gráficos 1, 2 e 3 mostram os resultados do crescimento radial analisado pelo aumento do diâmetro do micélio das cepas (mm) em função do tempo (dias) à temperatura de 26°C. Observa-se que as todas as cepas apresentaram crescimento nas diferentes condições estudadas, com redução da velocidade decorrente do aumento da concentração do efluente Kraft, ou seja, com a variação da concentração de efluente no meio de cultura sólido pode ocorrer o efeito de supressão da velocidade de crescimento dos fungos.



**Gráfico 1:** Representação do crescimento médio em mm/dia do *Agaricus bisporus* ABI 25 durante 7 dias de cultivo em meio com diferentes concentrações de efluente, acrescidos de ágar 1,5% à 26°



**Gráfico 2:** Representação do crescimento médio em em mm/dia do *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 durante 7 dias de cultivo em meio com diferentes concentrações de efluente, acrescidos de ágar 1,5% à 26°C.



**Gráfico 3:** Representação do crescimento médio em mm/dia do *Pleurotus florida* PSP 1 durante 7 dias de cultivo em meio com diferentes concentrações de efluente, acrescidos de ágar 1,5% à 26°C.

Em testes preliminares de repique dos fungos, foi observado que as cepas de *Agaricus bisporus* demonstraram crescimento mais lento quando comparado ao crescimento das cepas de *Pleurotus florida* em PDA, por este motivo o monitoramento foi acompanhado durante os 7 dias.

A tabela 4 mostra a velocidade de crescimento média dos fungos estudados. É possível notar que a maior velocidade é encontrada no meio sem efluente. Isso indica que os fungos utilizaram o Agar - Agar como nutriente. Ele é um hidrocolóide extraído de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas, consistindo em uma mistura heterogênea de dois polissacarídeos, (agarose e agarpectina) e sua composição são principalmente de fibras e sais minerais (P, Fe, K, Cl, I), celulose, anidrogactose e uma pequena quantidade de proteínas.

**Tabela 4:** Velocidade média e desvio padrão do crescimento radial dos fungos cultivados em efluente Kraft solidificado com 1,5% de Agar.

Efluente	<i>A. bisporus</i>		<i>P. chrysosporium</i>		<i>P. florida</i>	
	Velocidade Média	DP	Velocidade Média	DP	Velocidade Média	DP
0%	4,31	0,25	4,71	0,40	5,28	0,17
20%	3,19	0,08	4,47	0,01	4,88	0,34
40%	3,16	0,18	4,21	0,47	4,47	0,18
60%	3,14	0,17	3,72	0,13	4,44	0,51
80%	2,53	0,15	3,23	0,24	3,29	0,39
100%	2,32	0,16	2,80	0,16	2,75	0,21

DP = desvio padrão

Nota-se que houve crescimento fúngico em todas as concentrações de efluente, contudo *Agaricus bisporus* diminuiu a velocidade do crescimento com a adição de 20% de efluente no meio de cultivo, indicando possível presença de compostos tóxicos para este fungo, o que não foi observado para os demais. Interessante observar que a velocidade de crescimento de *P. chrysosporium* e *P. florida* são iguais para efluente a 20 e 40%, porém optou-se dar continuidade ao estudo de otimização dos meios de cultivo a concentração de 20% que apresentou o maior valor, com velocidade média de crescimento

de 4,88 mm/dia. Contudo, os resultados indicam que devem ser feitos estudos futuros com *Phanerochaete chrysosporium*.

Massai (1996) também cultivou *Lentinus edodes* em efluente Kraft na concentração de 20%, obtendo redução de cor, ligninas, fenol e guaiacol.

Duwe (2013) realizou estudos com o mesmo tipo de efluente e observou também que a melhor concentração de degradação desse tipo de efluente é com 20% de efluente, apresentando uma diminuição na velocidade do crescimento de 57% para *Phanerochaete chrysosporium*, 37% para *Pleurotus ostreatus*.

Marino et al. (2008) estudaram o *P. ostreatus* na degradação de serragem da casca de coco, que apresenta taninos que reduzem o crescimento fúngico, verificando o crescimento micelial de 6,6 mm/dia.

De acordo com Duwe (2013) o acompanhamento da velocidade do crescimento micelial pode não estar relacionado com maior biodegradação do efluente, porque os microrganismos podem simplesmente tolerá-lo. A análise da biodegradação é mais exata através do cultivo destes um organismo em meio líquido otimizado, objeto de análise do próximo estudo.

### 5.3 OTIMIZAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO EM CULTIVO LÍQUIDO

A tabela 5 apresenta um planejamento fatorial, os valores correspondentes de remoção, em porcentagem, de seis parâmetros de qualidade de efluentes.

Durante os estudos realizados na tabela 5, percebeu-se que alguns resultados de remoção produziram valores negativos, como se houvesse produção de cor e fenóis. Uma das explicações encontradas seria devido ao fato dos compostos aromáticos ao serem biodegradados formarem frações menores, que interferem nos resultados. Beg, Zafar e Sfiah (1986) observou o mesmo em relação à lignina em seu estudo sobre a biodegradabilidade do arroz por *Pleurotus ostreatus*, explicando que esta “produção de lignina”

durante o experimento foi em consequência da degradação de polissacarídeos que fizeram com que frações glicídicas fossem liberadas no meio.

Os estudos realizados por Ruas (2008) sobre a degradação de efluente Kraft em lodo ativado constatou que compostos intermediários presentes no efluente podem ser produzidos por ação de microrganismos, causando interferência no método espectrofotométrico.

Observando a tabela 5, foi possível perceber que a melhor condição para remoção de cor (63,6 – 68,6%) e compostos lignínicos (94,36 – 98,76%) foi com 10% de efluente e com a adição de glicose. De acordo com Sanjust et al. (1991) em estudo de descoloração do efluente da indústria de óleo de oliva, observaram uma redução de 40 a 60% da cor por *Pleurotus florida*.

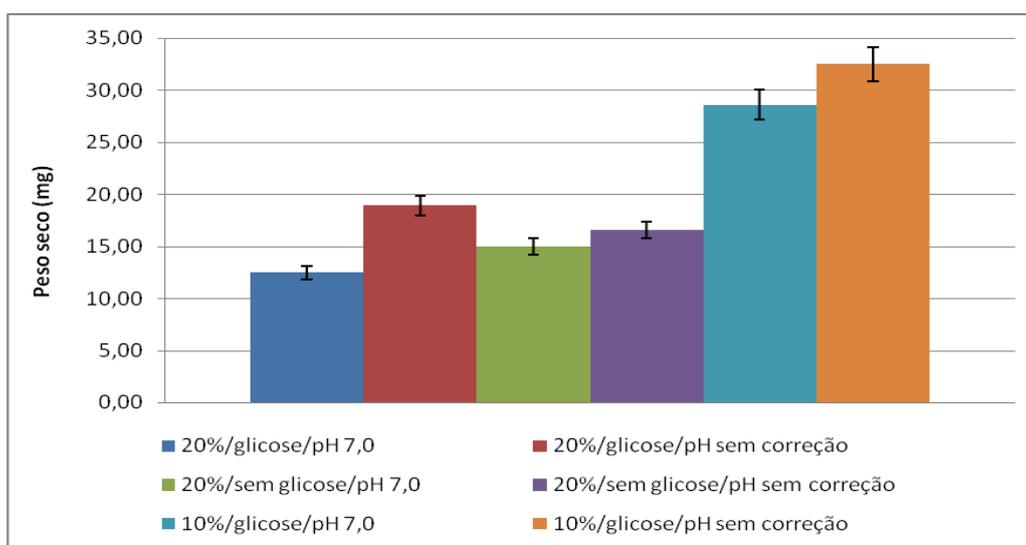
**Tabela 5: Resultados das análises da otimização de cultivo de *Pleurotus florida* em meio líquido, com planejamento fatorial  $2^3$ , em 10 dias, 26°C, 120rpm.**

Nível	pH	Glicose (g/L)	Efluente (%)	Remoção de DQO (%)*	Remoção de DBO (%)*	Remoção de Cor (%)*	Remoção de Lignínicos (%)*	Biomassa (mg)	Glicose consumida (g)
1	8,0	0	10	0	-	58,0 ±0,1	84,60 ±18,4	32,00 ±17,4	-
2	7,0	0	10	0	45,51 ±21,3	59,6 ±0,4	89,60 ±24,4	29,55 ±12,6	-
3	8,0	10	10	35,14 ±16,8	0	63,6 ±0,1	94,36 ±32,2	30,75 ±26,3	0
4	7,0	10	10	45,8 ±12,2	0	68,3 ±0,3	98,76 ±17,4	33,20 ±8,6	0,48 ±0,03
5	8,3	0	20	0	0	16,1 ±1,1	40,48 ±17,5	14,20 ±17,2	-
6	7,0	0	20	48,29 ±18,7	35,53 ±25,3	18,3 ±0,6	44,44 ±23,3	19,25 ±11,7	-
7	8,3	10	20	56,23 ±31,3	0	29,6 ±0,8	45,83 ±14,6	15,20 ±19,6	0
8	7,0	10	20	61,14 ±22,0	0	41,8 ±0,9	46,54 ±9,35	19,60 ±16,1	0,42 ±0,13

Nota: (-) análise não realizada.

Após o período de 10 dias foram realizadas análises de DQO e DBO e os níveis de DQO diminuíram 61,14% e a DBO de 45,5% de redução, demonstrando a eficiência do tratamento fúngico. Duwe (2013) encontrou valores de redução da DQO 38 – 66% utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus*, cultivado em 20% de efluente kraft e com adição de 10g/L de glicose.

Segundo o gráfico 4 é possível observar que a maior formação de biomassa ocorreu nas menores concentrações de efluentes estudadas no delineamento com e sem adição de glicose.



**Gráfico 4: Representação da biomassa em mg durante os 10 dias nas diversas condições do delineamento experimental.**

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. Entretanto o trabalho de Silva et al. (2009) sobre a capacidade em degradar 2,4-diclorofenol, importante poluente encontrado nos efluentes da indústria de papel e celulose discorda desta afirmação utilizando o *Pleurotus ostreatus*. 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 (DUWE, 2013).

De acordo com as pesquisas realizadas por Gern (2005) observou-se que 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) que a produção de biomassa aumentava com o aumento da concentração de glicose.

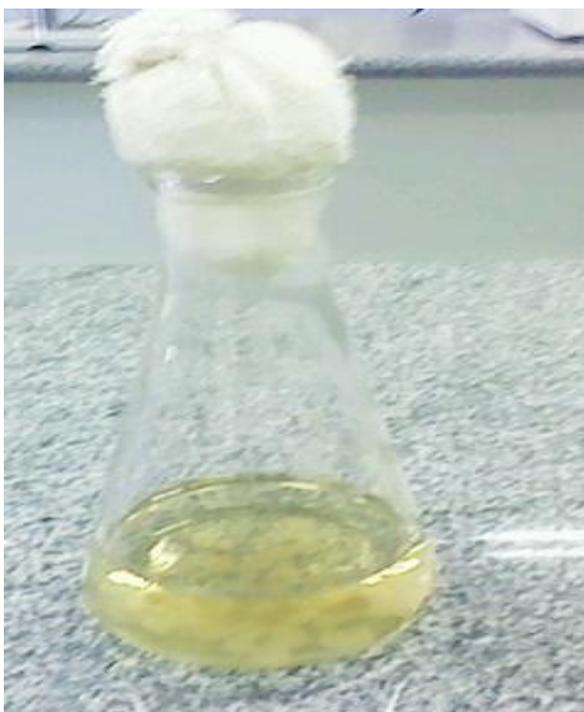
O fungo pode ter adsorvido algumas substâncias no micélio, tal fenômeno é conhecido como bioadsorção. Segundo Lopes (2012) a bioadsorção é um método “espontâneo” de remoção de AOX em estações de tratamento que incluem o processo biológico nas estações de tratamento de efluentes. Esta adsorção não foi objeto de estudo, mas sugere-se para experimentos futuros.

Ao final do cultivo em meio líquido observou-se que os fungos inoculados formaram *pellets* (Figura 11). Este fato pode ser explicado através dos estudos realizados por Rodrigues et al. (2010), que observou que em concentrações muito elevadas de células no inoculo resultam em crescimento na forma filamentosa, o que conduziria à diminuição da eficiência do tratamento, enquanto que em concentrações de  $10^4$  células/mL de inoculo, os fungos tenderiam a formar *pellets*, estrutura que permitiria a produção de enzimas específicas que poderiam favorecer a obtenção de maior eficiência do processo. Neste trabalho foi necessária fazer uma diluição para o inoculo do *Pleurotus florida* para a adição no meio líquido para  $1,2 \times 10^4$  UFC. mL<sup>-1</sup>, concordando assim com esse estudo.

Rodrigues (2006) também observou a formação de “pellets” (pequenas esferas aglutinadas) em seus estudos realizados em reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de águas residuária sintética, pois de acordo com Carlile e Watkinson (1994), os fungos produzem compostos extracelulares que lhes conferem capacidade de aderência, o que permitiu a agregação de na forma de “pellets”, sendo que a glicose essencial, como fonte de carbono facilmente assimilada, ajudando na produção de moléculas como polissacarídeos, proteínas e lipídeos, outros compostos que também

favorecem o acúmulo do peso seco (COSTA et al., 2004). Existem também outros fatores de relevância para a formação dos “pellets”, como: espécie do fungo, meio de cultura, agitação, pH, oxigênio dissolvido e quanto ao inoculo utilizado (concentração de células, massa de micélio (PAMBOUKIAN, 1997).

Segundo Celestino et al. (2009), que estudaram a remoção de matéria orgânica de água residuária contaminada com BTX, essa formação de *pellets* pode ter contribuído positivamente para os fungos se desenvolverem e alcançarem melhores remoções, devido ao aumento da superfície de contato. Quanto maior for à superfície de contato das hifas com o resíduo em questão, maior será a degradação (CETEM, 2008). De acordo com Covizzi et al. (2007) as condições de cultivo interferem nas características físicas, químicas e morfológicas das hifas e na tendência destas em formar agregados celulares ou não.



**Figura 11: Fotografia mostrando a formação de pellets 10% efluente, pH 7,0 e adição de glicose, após 10 dias de tratamento fúngico em agitação com 26°C.**

Os gráficos 5 (a), (b) e (c) mostram a % de remoção dos compostos lignínicos, demonstrando que o pH inicial e a temperatura de incubação são fatores que influenciam a produção da biomassa, quantidade de carbono e bioconversão.

Alguns estudos conduzidos com *P. ostreatus*, compilados por Rajarathanam e Bano (1989), mostram que os principais parâmetros culturais afetando a degradação da lignina por esses basidiomicetos são o substrato de crescimento, a fonte de nitrogênio, bem como sua concentração e condições de cultivo. De um modo geral, a carência de uma fonte externa de nitrogênio, temperatura de 25-30°C, disponibilidade de oxigênio e cultivo estático de *Pleurotus*, favorecem a degradação de lignina.

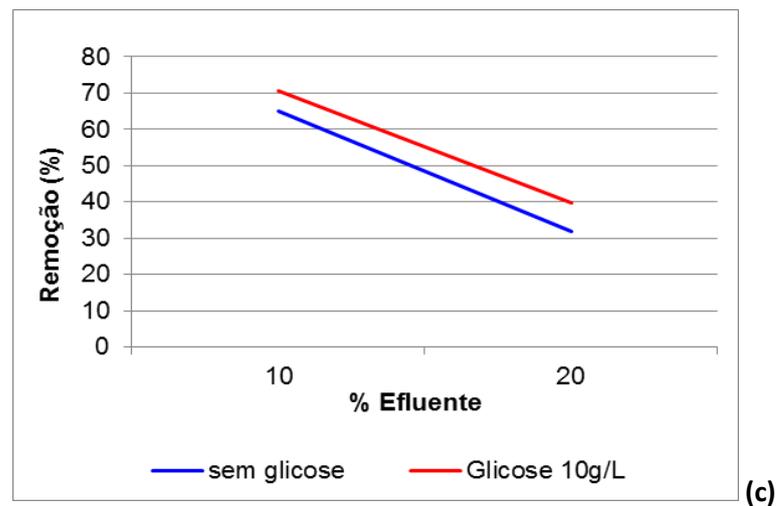
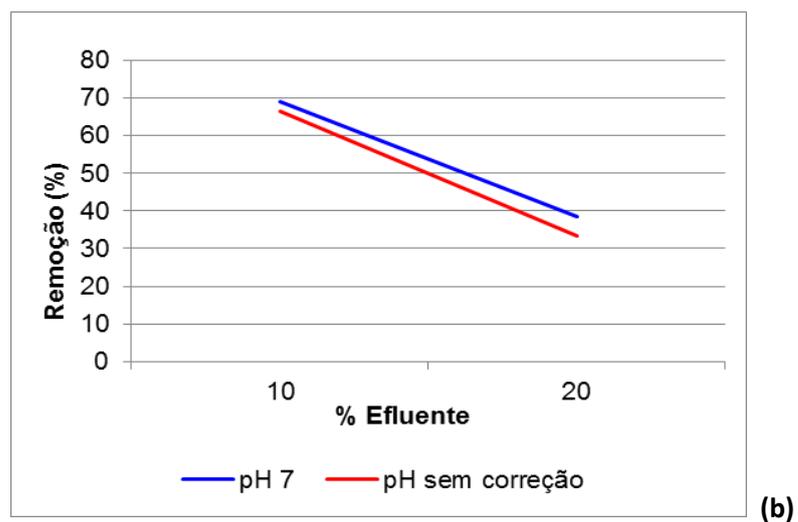
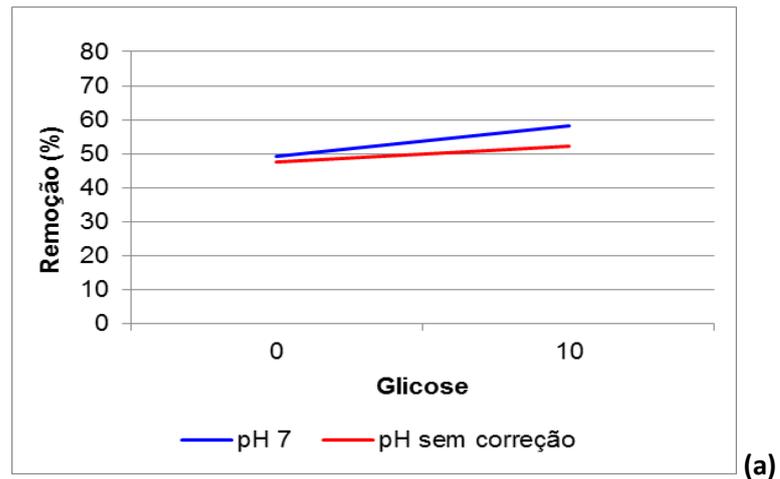


Gráfico 5: Remoção de compostos lignínicos relacionando diversos parâmetros.

Os gráficos 5 (a,b,c) mostram as tendências estatísticas dos resultados obtidos. Percebe-se no gráfico A que a alteração do pH não promoveu maior remoção de compostos lignínicos. Já os gráficos B e C mostram que a remoção foi mais acentuada com efluente na concentração de 10%, independente do pH e da adição de glicose.

Já Soares et al. (2010) notaram que o pH 6 é o melhor valor para o meio de cultura, utilizando o fungo *Aspergillus nidulans* em dois meios distintos de cultura, BDA e Meio Completo a 2% amido, variando os tratamentos com adição ou não de glicose.

Em um estudo realizado por Forgiarini (2005), onde a concentração dos corantes foi de 0,5 g/L e na presença de glicose (10 g/L). Seis corantes testados foram descoloridos, enquanto que na ausência de glicose apenas três. Os resultados sugerem que uma fonte primária de carbono (glicose) é essencial para uma descoloração extensiva do corante (FORGIARINI, 2006).

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.

#### 5.4 ACOMPANHAMENTO DA CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO

Para o estudo da cinética foi utilizado à mesma quantidade de inóculo que para o delineamento, ou seja,  $1,2 \times 10^4$  UFC. mL<sup>-1</sup>.

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos durante o acompanhamento da cinética de biodegradação de efluente kraft por *Pleurotus florida*, em cultivo adicionado de glicose (10 g/L).

**Tabela 6: Remoção (%) dos parâmetros do efluente, em ensaio cinético, utilizando *Pleurotus florida* à 26°C e 10% de efluente Kraft.**

Dia	Cor	DQO	DBO	Ligninicos
2	47,59 ±11,9	-	-	91,41 ±0,67
4	71,68 ± 0,76	-	-	94,29 ±0,57
6	79,37 ±0,34	-	-	97,79 ±0,98
8	83,91 ±0,57	-	-	98,48 ±0,45
10	87,50 ±0,61	56,00 ±32,2	37,52 ±20,2	98,88 ±0,56

Nota: (-) análise não realizada.

A DBO e DQO do efluente bruto (100%) apresentou valores de 250,5 e 700 mg/L respectivamente. Ao analisar os resultados do estudo cinético com o efluente bruto é possível observar que houve uma redução da DBO e DQO de 37,52% e 56% respectivamente, mostrando que esse tratamento é realmente eficiente na remoção de matéria orgânica. No estudo realizado por Kist (2013) sobre a degradação de compostos nitroaromáticos utilizando fungos do gênero *Pleurotus* os parâmetros de DQO diminuíram 55% e a DBO de 51% após 15 dias.

A glicose proporcionou aos fungos melhores condições para o crescimento, promovendo uma adaptação dos microrganismos, resultando em maior crescimento de biomassa e conseqüentemente de melhor eficiência de remoção de DBO, DQO, cor e compostos ligninicos

O trabalho de 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 papaleiro por ozonização catalítica combinado com lodo ativado.

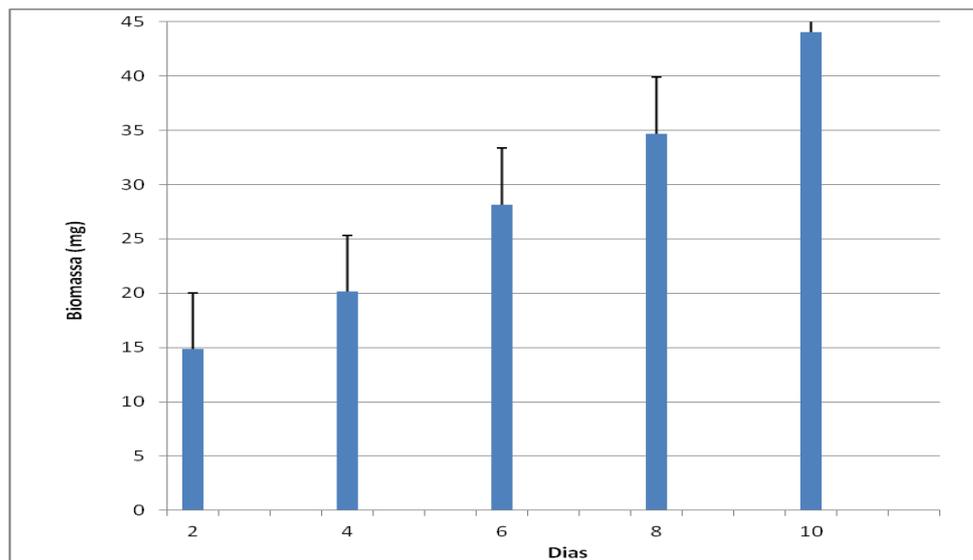
Os resultados obtidos no último dia da cinética deveriam ter sido similares àqueles dos níveis 3 e 4 do estudo anterior (Tabela 5), o que não

ocorreu. Segundo Duwe (2013) uma das hipóteses dos melhores resultados terem sido encontrados no primeiro experimento supõe-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. Isto adverte a necessidade de reproduzir essas análises novamente para comparação.

Camelini (2010) realizou estudos sobre a produção de biomassa do fungo *Agaricus subrufescens* por processos fermentativos sólidos e submersos para obtenção de polissacarídeos bioativos, devido ao fato de que compostos tóxicos podem comprometer a viabilidade dos microrganismos. Neste trabalho apresentou três métodos de preservação do fungo, onde foram observadas variações na viabilidade do micélio e observou que em geral, a velocidade de crescimento radial de *A. subrufescens* diminuiu ao longo do período de preservação. No entanto, maiores velocidades foram obtidas quando o meio BDA foi suplementado com carvão ativo.

Soares e Durán (1998) estudaram a eficiência de remoção de cor e compostos fenólicos de um efluente semelhante incubado com *Trametes villosa*. Estes autores observaram que após 48 horas de incubação, houve remoção de 70% de cor e 80% de compostos fenólicos. Cordi (2008) determinou um remoção de 36% de cor no efluente kraft estudado, por degradação através de lodos ativados.

O gráfico 6 mostra os resultados da biomassa seca de *Pleurotus florida* durante 10 dias, mostrando que não ocorreu inibição de crescimento devido ao efluente, ao contrário, a sua utilização mostrou maior biomassa.



**Gráfico 6 : Representação da biomassa em mg durante os 10 dias da melhor condição do delineamento experimental.**

Ao final do 10<sup>o</sup> dia do estudo, obteve-se crescimento da biomassa micelial de 44,03 mg/100mL. Komura (2009) obteve em seu estudo com o mesmo fungo, cultivado em meio líquido Czapeck por 10 dias, uma biomassa inferior, de 30 mg/mL. Os resultados mostram que a concentração final de biomassa, um resultado direto do crescimento celular e do metabolismo primário, foi diretamente dependente da concentração inicial de glicose (TAVARES, 2006).

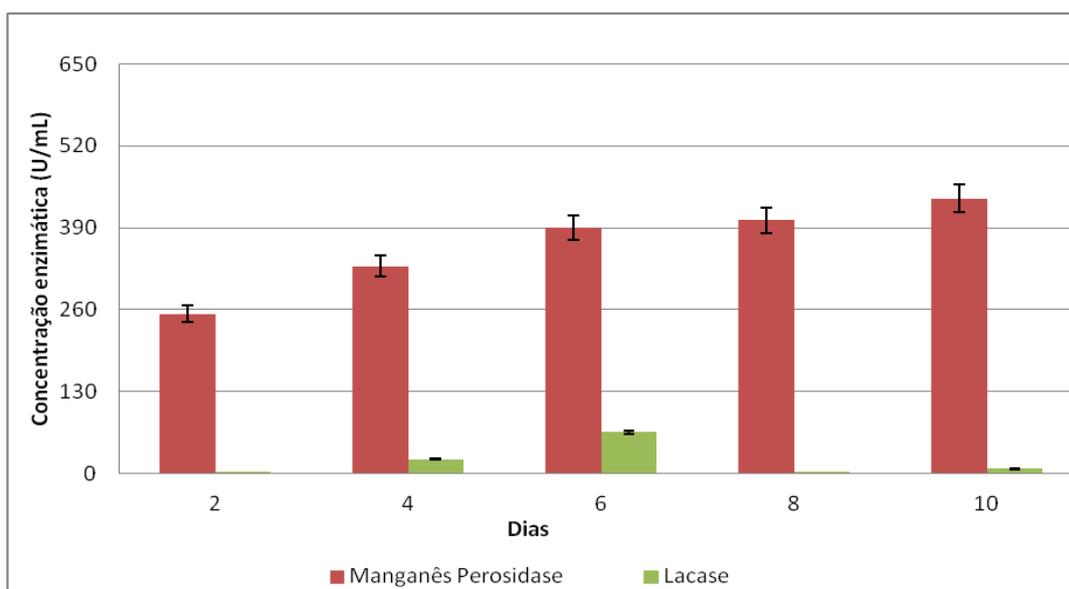
Segundo Tavares (2006) o aumento da biomassa pode ser correlacionado com o consumo de glicose, já que o pico de crescimento ocorre quando os níveis de glicose atingem os valores mais baixos. Após o pico, a biomassa começa a diminuir, possivelmente em consequência da autólise.

De acordo com Kist (2013) a determinação de glicose foi importante para evidenciar o crescimento micelial contínuo e assim, indicar que esta pode ter auxiliado o fungo a adaptar-se ao meio contendo o efluente, seguindo posteriormente a isso uma queda na concentração de glicose. Bonfanti (2006) observou o mesmo em estudo realizado com o fungo *Pleurotus sajor-caju* com o efluente da indústria de papel e celulose.

Duwe (2013) cogitou a hipótese 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.

Outro fator crítico é a tensão de oxigênio, pois o crescimento procede rapidamente quando as culturas em meio líquido são aeradas, entretanto, a atividade ligninolítica ocorre mais rápida alcançando maiores teores quando a atmosfera é de 100% de oxigênio (LEISOLA; WALDNER, 1988).

O gráfico 7 mostra as atividades enzimáticas observadas durante a cinética. Percebe-se que a enzima Manganês Peroxidase está presente em maiores quantidades. A lacase foi produzida somente a partir do 4º dia, porém em pouca quantidade, com o maior valor de 65,23 U/mL.



**Gráfico 7 : Representação da concentração das enzimas, Manganês Peroxidase e Lacase, produzidas por *Pleurotus florida* na melhor condição do delineamento experimental.**

Segundo estudos de Pereira (2011) utilizou a atrazina, com o fungo *P. ostreatus* o mesmo produziu apenas a enzima lacase, cujos valores foram para o sétimo dia (0,533 U/mL) e décimo quinto dia (0,119 U/mL) de cultivo.

É importante elucidar que ainda existem poucos estudos de biodegradação de efluentes de indústrias de papel e celulose utilizando a lacase. A maior parte dos trabalhos divulgados refere-se a estudos de biodegradação por lacase utilizando compostos fenólicos individuais. (BOURBONNAIS et al., 1995, CASTRO; EVTUGUIN; XAVIER, 2003, HUBLIK ; SCHINNER, 2000). A repressão da glicose em fungos e leveduras é grandemente conhecida e acredita-se que ela pode inibir ou induzir os genes de produção enzimática (RONNE, 1995).

A atividade de MnP foi detectada em grande quantidade sendo seu valor máximo obtido no décimo dia com 436,24 U/mL. Em estudo realizado sobre produção de enzimas por Silva (2004) com oito fungos durante 14 dias, a mesma observou a atividade enzimática da MnP somente em três linhagens, sendo que apenas uma apresentou concentração mais alta (2,765 U/mL).

Delamatrice (2005) estudou um efluente da estação de tratamento de Americana São Paulo com *P. ostreatus* e observou a produção de uma concentração maior da enzima MnP concordando com este trabalho.

Nuske et al. (2002) verificaram que a atividade de MnP continuou aumentando até o final do experimento, tal qual observado neste presente trabalho, em que verifica-se a presença desta enzima durante todo o cultivo.

De acordo com estudos de Forgiarini (2006) e Rodríguez et al. (1999), entre as enzimas utilizadas para a descoloração está a lacase, que pode ter influenciado na diminuição de absorvância durante o processo de tratamento, o que contraria os resultados obtidos neste trabalho, porque houve remoção de 87,50% da cor, porém a produção lacase foi bem insignificante comparando com MnP.

Peña-Miranda et al. (1996) que, avaliaram concentrações de glicose entre 1 a 20 g/L na remoção da cor de água residuária contendo melaço e observaram maior remoção da cor por *Aspergillus niger* com 10 g/L de glicose.

Sanjust et al. (1991) em estudo de descoloração do efluente da indústria de óleo de oliva, observaram uma redução de 40 a 60% da cor por *Pleurotus florida*. Segundo Murani et al. (2003) observaram que ao final do ensaio, o tratamento com 15 g/L de glicose mostrou redução média de 42,4% da cor, enquanto que os controles perderam apenas 3,7%. Observações de remoção de cor de efluentes alcalinos foram verificadas por Davis e Burns (1990), que mostraram que lacases foram mais eficientes do que horseradish peroxidase (HRP).

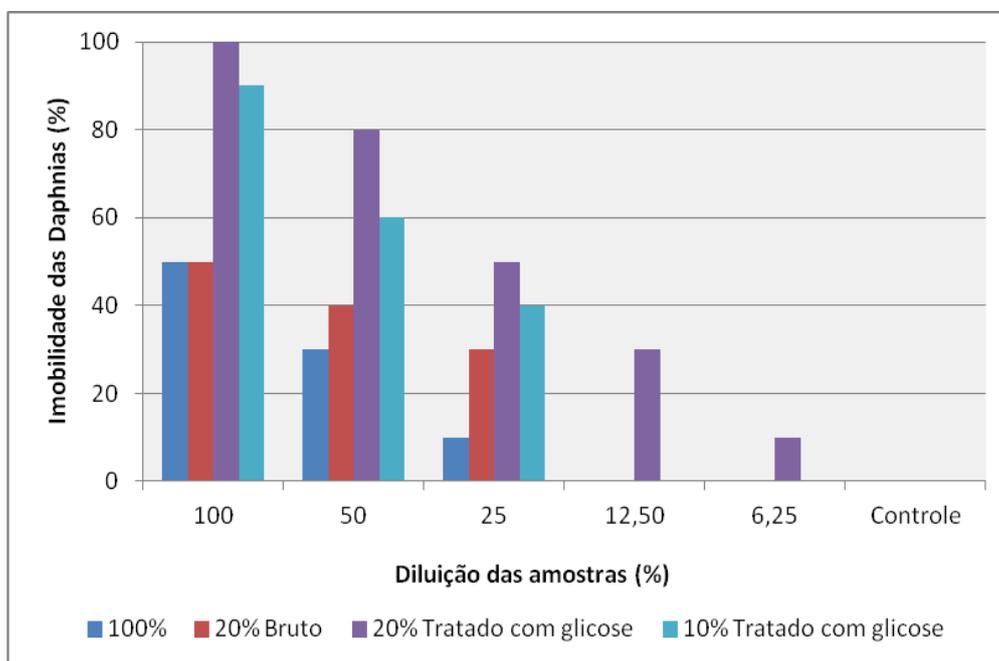
Para degradar efluentes fenólicos, Davis e Burns (1990) mostram que em incubações prolongadas (8 dias) com o fungo *Coriolus versicolor*, foi alcançado 70% a 80% de descoloração, índice maior do que o alcançado com o melhor tratamento enzimático que foi de 48% de remoção em 72 horas por lacase imobilizada. Porém Dellamatrice (2005) afirma que a produção da enzima lacase e manganês peroxidase por *Pleurotus ostreatus* não resultou em descoloração dos resíduos sólidos (corantes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuárias de Americana – SP), durante os 15 dias de incubação, indicando a presença de outros fatores controladores da descoloração.

Para os ensaios de toxicidade do efluente Kraft foram utilizados os efluentes brutos 100%, 20% além dos efluentes tratados biologicamente. Após o tempo de prova (48 horas), observou-se o número de indivíduos imóveis por concentração, como demonstrado no gráfico 8.

O gráfico 8 mostra que houve uma divergência de valores, já que os efluentes tratados com glicose obtiveram um número maior de imobilidade do que o 100%, uma das hipóteses possíveis seria que o teste de toxicidade do efluente 100% foi realizada com um lote de *Daphnia* diferente dos demais testes, porém mesmo assim todos os testes demonstraram que na produção de polpa de celulose existe a formação de uma grande variedade de compostos que podem causar efeitos adversos aos organismos. Segundo Ahtiainen et al. (1996) e Brumley et al. (1997) os constituintes naturais da madeira (fenóis, ácidos graxos e resínicos), presentes principalmente no licor, podem ser os responsáveis pela toxicidade. Hewitt et al. (1996) cita que as dioxinas e os

furanos (organoclorados), encontrados em efluentes do branqueamento à base de cloro e/ou dióxido de cloro, são indutores potenciais de toxicidade. Já Kinane et al. (1981) acreditam que tanto os extrativos naturais da madeira quanto os organoclorados são os vilões da toxicidade do efluente geral de uma fábrica de celulose, justificando assim o estudo de tratamentos alternativos como o biológico.

Kist (2013) observou em seus estudos utilizando efluente da indústria de explosivos, que os testes de toxicidade com *D. magna* demonstraram a eficiência do tratamento fúngico com o fungo *Pleurotus florida*, pois ocorreu diminuição da toxicidade.



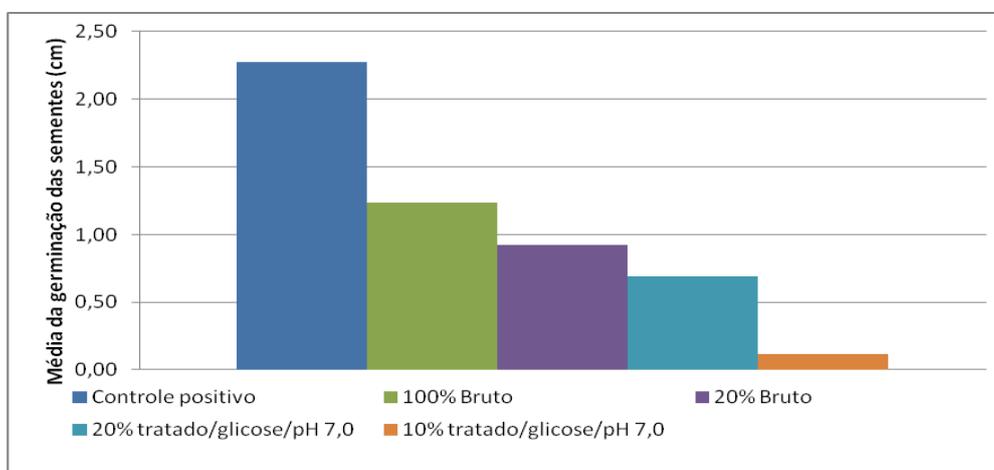
**Gráfico 8 : Representação do estudo com *D. magna* mostrando a imobilidade em diferentes concentrações.**

Os efeitos dos efluentes brutos e tratados também foram avaliados através de germinação e da inibição de crescimento com *Lactuca sativa*, representante dos produtores primários, em que se avaliam os efeitos fitotóxicos de compostos químicos puros ou misturas complexas durante o

processo de germinação das sementes e emergência da plântula, no decorrer dos primeiros dias de desenvolvimento.

Conforme apresentado no gráfico 9 pode-se observar que a adição de glicose influenciou na inibição da germinação da sementes e o surpreendentemente o efluente que possui o melhor resultado de crescimento é o com concentração de 100% (bruto).

Esta divergência de resultados significa que esse ensaio avalia dois processos diferentes (germinação e alongamento da raiz) que podem apresentar sensibilidade aos diferentes compostos e em diferentes níveis.



**Gráfico 9: Representação do efeito da toxicidade do efluente Kraft em diversas concentrações utilizando a *Lactuca sativa*.**

No efluente tratado com 10% de efluente/glicose/pH 7,0 houve uma diminuição acentuada da toxicidade, comparando os outros meios analisados, principalmente com o 100% bruto. Com isso é possível concluir que o tratamento foi eficaz não só na redução de parâmetros físico-químicos, mas também na toxicidade aguda, utilizando *Lactuca sativa*.

Oliveira (2013) conseguiu obter 15% de redução na toxicidade utilizando também a *L. sativa*. O ensaio com alface teve uma sensibilidade mediana, de forma que o efluente bruto apresentou alguma toxicidade, mesmo que baixa, enquanto o tratado apresentou níveis ainda inferiores, quase não apresentando toxicidade. Duwe (2013) observou que houve 32% redução da germinação para *Lactuca sativa* em efluente com concentração de 25%.

Durante o período de germinação e os primeiros dias de desenvolvimento da plântula, ocorrem diversos processos fisiológicos em que a presença de uma determinada substância química pode interferir, alterando a sobrevivência e o desenvolvimento normal da planta, sendo, portanto, uma etapa de grande sensibilidade frente a fatores adversos (SOBRERO;RONCO, 2004).

Embora este ensaio aborde apenas o estágio inicial do ciclo de vida do organismo teste, eles são aceitos como uma medida de efeito primário para as plantas, uma vez que as raízes fazem parte do principal ponto de contato com meios de exposição a contaminantes que podem entrar no organismo vegetal, principalmente em se tratando de contaminantes biodisponíveis através da água e solo (HILLIS et al., 2011). A espécie *Lactuca sativa* mostrou-se capaz de se estabelecer em meio potencialmente tóxico e a se desenvolver parcialmente, apresentando efeitos letais (inibição da germinação) e sub-letais (inibição do desenvolvimento das raízes e das radículas).

De acordo com Palácio et al. (2012), as plântulas de alface sofreram menor inibição no crescimento das raízes e das radículas nas amostras mais diluídas, devido à menor concentração de substâncias tóxicas. O percentual de germinação do efluente bruto 100% foi de 20 %, indicando que o tratamento do efluente Kraft produziu intermediários responsáveis pela elevação da toxicidade. Pequenos valores de percentual de inibição relativa foram registrados para os demais efluentes, no entanto estes valores não apresentaram diferença significativa e, sendo assim, os efeitos potencialmente agudos sobre o indicador não foram detectados.

## 6 CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos indicam que *Pleurotus florida* apresentou potencial de biodegradação de compostos presentes em efluente Kraft. Estes dados são indicativos do uso potencial deste microrganismo para uso em novas tecnologias para tratamento de efluentes deste tipo de indústria.

Na metodologia adotada para o tratamento do efluente gerado pelo método da biorremediação e das condições experimentais concluiu-se que o fungo *Pleurotus florida* é o que possui a melhor capacidade de degradar o efluente Kraft e crescimento micelial em meio solidificado, foi na concentração de 20%, apresentando velocidade média de 4,88 mm/dia. Estas condições foram consideradas no terceiro experimento em meio líquido com frascos agitados.

Para o tratamento em meio líquido em frascos agitados, os melhores resultados de remoção de compostos, em meio líquido, foram obtidos com o 10% de efluente Kraft, pH 7,0 e com adição de 10 g/L de glicose. Foram obtidos valores de remoção de cor (63,6 – 68,6%) e compostos lignínicos (94,36 – 98,76%), os níveis de DQO e DBO diminuíram 61,14% e a DBO de 45,5%, demonstrando a eficiência do tratamento fúngico, além da redução da toxicidade em relação aos bioensaios realizados.

O acompanhamento cinético comparando os resultados de DQO e DQO do efluente bruto (100%) houve uma redução de seus valores em 56% e 37,48% respectivamente e ao final do 10º dia do estudo, obteve-se crescimento da biomassa micelial de 44,03 mg/100mL.

Percebe-se que a enzima Manganês Peroxidase está presente em maior quantidade. A lacase foi produzida somente a partir do 4º dia, porém em pouca quantidade, com o maior valor de 65,23 U/mL. A atividade de MnP foi detectada em grande quantidade sendo seu valor máximo obtido no 10º dia com 436,24 U/mL. Observou-se ligação entre a remoção de cor, lignina e formação de biomassa nos primeiros dias.

Os testes de toxicidade com *D. magna* e da *L. sativa*, demonstraram a eficiência do tratamento fúngico com o fungo *Pleurotus florida*, pois ocorreu diminuição da toxicidade.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Repetição desses experimentos realizando um processo combinado através de um tratamento físico-químico com processos oxidativos avançados, para verificar se ocorre maior redução de carga e matéria orgânica;
- Ensaio de toxicidade durante o período de biodegradação em meio líquido para verificar a diminuição de toxicidade durante o processo;
- Testes de toxicidade com outros níveis tróficos;
- Realizar o teste de viabilidade da suspensão de células durante o período de estudo.
- Realizar a quantificação dos compostos toxicológicos utilizando a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Levantamento de custos e avaliação da viabilidade do processo, para uma futura implementação de sistema de tratamento do efluente *Kraft*;

## REFERÊNCIAS

- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater**. 20 ed. Washintgton, APHA, 1998, 10.18-10.25.
- AGAPITO, M. S. **Tratamento de efluente da indústria de papel e celulose por *Trametes versicolor***. Tese de Mestrado de Gestão Ambiental, Materiais e Valorização de Resíduos. Universidade de Aveiro. 2007.
- 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.
- AHTIAINEN, J.; NAKARI, T.; SILVONEN, J. **Toxicity of TCF and ECF pulp bleaching effluents assessed by biological toxicity tests**. In: **Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents**. St. Lucie Press, Florida, 1996, p.33-40.
- ALABASTER, G.P.; MILLS, S. W. ; OSEBE, A. S.; THITAI, W.N.; PEARSON, H. W.; MARA, D. D. E MUIRURI, P. **Wat. Sci. Tech.** 24: (1) 43, 1991.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ALI, M.; SREEKRISHNAN, T.R. **Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review**. Advances Environ. Res, v. 5, p. 175-196, 2001.
- ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A. **Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio**. Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 818-824, 2004.
- ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.
- ALVES, ACB; SILVANO, S. **Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladóceras, Crustácea) ao dicromato de potássio**. Rev Inst Adolfo Lutz, 65(1):59-61, 2006.
- ARAUCO, L.R.R.; Cruz, C.; MACHADO-NETO, J.G. **Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia***. Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, v.15, p.55-64, 2005.
- ARAUJO, P. L. A.; TAVARES, G. R. C.; COSSICH, S. E.. **Remoção de DQO e cor de efluente da indústria de celulose e papel**. 26º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES. Porto Alegre/RS – Brasil, 2011.

AZBAR, N.; YONAR, T.; KESTIOGLU, K. **Comparison of various advanced oxidation processes and chemical treatment methods for COD and color removal from polyester and acetate fiber dyeing effluent.** Chemosphere vol. 55, n. 1, p. 35-43, 2004.

BALDRIAN, P. **Fungal laccases – occurrence and properties.** FEMS Microbiology Reviews, v. 30, p. 215-242, 2006.

BAGUR-GONZÁLEZ, M. G.; ESTEPA-MOLINA, C.; MARTÍN-PEINADO, F.; MORALES-RUANO, S. **Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site.** Toxicity Assessment, 2010.

BARROS, C. A. **Estudo da degradação de petróleo em solo areno-argiloso com bioaumento fúngico utilizando casca de coco como material estruturante.** Trabalho apresentado na XIV jornada de iniciação científica – CETEM, Em: XIV jornada de iniciação científica, 2004.

BARR, D. P.; AUST, S. D. **Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants.** Environmental Science and Technology, Iowa, v. 28, 1994.

BEG, SHAHJAHAN.; ZAFAR, SAEED.I.; SHAH, F.H. **Rice Husk Biodegradation by *Pleurotus Ostreatus* to Produce a Ruminant Feed.** Agricultural Wastes. Nº 17, p.15-21, 1986.

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

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.

BILA, D. M.; MONTALVÃO, F.; SILVA, A. C.; DEZOTTI, M. **Ozonation of a landfill leachate: evaluation of toxicity removal and biodegradability improvement.** Journal of Hazardous Materials, v. 117, n. 2/3, p. 235-242, 2000.

BONFANTI, P. **Utilização de *Pleurotus sajor-caju* na redução da concentração de compostos fenólicos presentes no efluente da indústria de papel e celulose.** 2006. 105 f. Dissertação em Biotecnologia - Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2006.

BOURBONNAIS, R. et al. **Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonate) on Kraft lignin depolymerization.** Applied and Environmental Microbiology, New York, v.61, p.1876-1880, 1995.

BLANCHETE, R. A. **Delignification by wood-decay fungi**. Annual Reviews Phytopatology, 1991.

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

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

BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Evolução da produção brasileira de celulose e papel**. Disponível em: <http://www.bracelpa.org.br/bra2/?q=node/139>. 2010. Acesso em: 23 fevereiro de 2013.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. Manual de tratamento de águas residuárias industriais. São Paulo: CETESSB, 1993.

BRUMLEY, C. M., ANDERSON, S. M., TAVENDALE, M. H. **Partitioning behavior of pulp mill effluent constituents in recipient matrices and biota**. In: 3<sup>rd</sup> International Conference on Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents, 1997.

BUIKEMA, A.L.; SHERBERGUER, S.R. **Daphnia**. Carolina Tips, v.15, n.10, p.1-5, 1977.

BURATO, P. A. **Biodegradação de Corante Têxtil Azul QR-19 com Fungo Ligninolítico *Pleurotus ostreatus***. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa institucional de iniciação científica (PIBIC) relatório de atividades (agosto/2009 a agosto/2010). Pato Branco, 2010.

CAMPOS, C; DIAS, D. C; VALLE, J. S; COLAUTO, N. B; LINDE, G. A. **Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido**. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 13, n. 1, p. 19-24, jan./jun. 2010.

CAMELINI, C. M. **Produção de biomassa do fungo *Agaricus subrufescens* por processos fermentativos sólido e submerso para obtenção de polissacarídeos bioativos**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2010.

CAPUDI, M.; CASTRO, M. C.; RAMSDORF, W. **Biodegradação fúngica de compostos lignocelulósicos e corantes**. Curitiba, 2002. Trabalho de conclusão de curso – Tecnologia em Química Ambiental. Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná (CEFET-PR).

CASTRO, A.I.R.P, EVTUGUIN, D.V.,XAVIER, A.M.B. **Degradation of biphenyl lignin model compounds by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and heteropolyanion [SiW11VO40]5-**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, New York, v.22, p.13-20, 2003.

CETESB, Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos.** São Paulo: CETESB, 1990.

ÇEÇEN, F., 2003. **The use of UV-VIS measurements in the determination of biological treatability of pulp bleaching effluents.** In Conference Proceedings – 7th International Water Association Symposium on Forest Industry Wastewaters, Seattle Washington, USA.

CELESTINO, P.; BARBOSA, B.; AMARAL, W.; SAMPAIO, G.; RODRIGUES, K. **Efeito do “Tamanho do Inóculo” na Remoção de Matéria Orgânica de Água Residuária Contaminada com BTX.** IV CONNEPI – Congresso de Pesquisa e Inovação de Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. Belém, 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.

CHAMORRO S.; POZO.; JARPA M.; HERNÁNDEZ V.; BECERRA J.; VIDAL, G. **Monitoring endocrine activity in kraft mill effluents treated by an Aerobic moving bed bioreactor system.** Wat. Sci. Technol. 62: 157-161, 2010.

CRAWFORD, D. L., POMETTO, A. L. **Lignin-depolymerization activity of Streptomyces.** In: WOOD, K., KELLOGG, S. T. Methods Enzymol., v. 161, p. 238-249, 1988.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. DA. **Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas.** Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, jul./dez. 2007.

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.

DAVIS, S.; BURNS, R. G. **Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 32, p. 721-726, 1990.

DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP.** 2005. 137 f. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ecologia de Agroecossistemas. Piracicaba, 2005.

DIAS, A.E.X.O. **“Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos”**. In: SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA, R.M., orgs. Resíduos sólidos, ambiente e saúde: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000.

DUBE, M. G. e MACLATCHY, D. L. **Identification and treatment of a waste stream at a bleached kraft pulp mill that depresses a sex steroid in the mummichog (Fundulus heteroclitus)**. Environmental Toxicology and Chemistry, 2000.

DULLIUS, C. H. **Utilização de Fungos para Biodegradação de Corantes Têxteis Sintéticos**. 2004. 72 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2004.

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

DURAN, N.; KUNZ, A.; MORAES, S. G.; PERALTA-ZAMORA, P. **Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis**. Química Nova, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

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

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

EATON, D. C; CHANG, H. -M.; JOYCE, T. W.; JEFFRIES, T. W.; KIRK, T. K. **Method obtains fungal reduction of the colour of extrcation stage kraft bleach effluents**. Tappi Journal, v. 65, p. 89-92, (1981).

FENDEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure reactions**. Berlin: New York: Walter de Gryter, 613 p, 1984.

FERRAZ, A. **Aplicação da Biotecnologia na produção de Papel e Celulose**. Biotecnologia Industrial – Processos] fermentativos e enzimáticos. Vol. 3 – Ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 2010.

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.

FIELD, J. A.; LETTINGA, G. The **methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of a hydrolysable tannin**. *Water Research*, 21, 367 – 374, 1987.

FONSECA, M.J. et al. **Tratamento de efluentes líquidos de indústria de papel e celulose**. Rio Claro – São Paulo, 2003.

FORGIARINI, E. **Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima Horseradish peroxidase (HRP)**. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FRIEDRICH, F. **Emprego de testes de toxicidade aguda para diversos efluentes**. (Relatório de Estágio) – Curso Superior de Tecnologia em Química Ambiental, Centro Federal de Educação Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

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

FREITAS A.C., F. FERREIRA, A.M. COSTA, R. PEREIRA, S.C. ANTUNES, F. GONÇALVES, T.A.P. ROCHA-SANTOS, M.S. DINIZ, L. CASTRO, I. PERES, A.C. DUARTE. **Biological treatment of the effluent from a bleached kraft pulp mill using basidiomycete and zygomycete fungi**. *Sci. Total Environm.*, 407: 3282–3289, 2009.

FRELLO, C. E. **Avaliação da toxicidade aguda do agrotóxico carbofuran utilizando reativos biológicos: *Poecilia reticulata* e *Daphnia magna***. Dissertação - Mestrado em Engenharia Ambiental na Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1998.

FURLEY, T. H., OLIVEIRA, A, C. e MONTENEGRO E. S. **Avaliação do impacto das drenagens sobre a microbiologia da ETE e qualidade do efluente tratado da Aracruz Celulose S.A**. *Revista Engenharia*, 2001.

GARCIA, F. F. **Biodegradação de 2,4 – diclorofenol e 2, 4,6 – triclorofenol por fungos do gênero pleurotus**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, 2009.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. 110 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

GALVÃO. F. J.B. GRIECO, V.M.; ARAÚJO, R.P.A.; ORTOLANO, M.R.;BERTOLETTI, E.; RAMOS, M.L.L.C. **Treatability studies and toxicity reduction in pulp and paper mill effluents**. *Wat. Sci. Tech.*, v. 20 p. 149 - 160, 1988.

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

GNANAMANI, A., M. JAYAPRAKASHVEL, M. ARULMANI, S. SADULLA. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme Microb. Technol.*, 38: 1017-1021, 2006.

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.

GRIECO, V. M. **Tratamento de Efluentes Líquidos Industriais**, de São Paulo 1995.

GUARATITI, Cláudia C. I.; ZANONI, Maria Valnice B. Corants Têxteis. *Quimica Nova*, v. 23, n.1,p.71-78, 2000.

GUGLIOTTA, A. M. **Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes da indústria têxtil.** 2001. Tese (Doutorado em Ciência Biológicas – Botânica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

HAMMEL, K.E. **Fungal Degradation of Lignin**, Cab International Driven by Nature:Plant Litter Quality and Decomposition, pp. 33-45, 1997.

HATAKKA, A. **Lignin modifying enzymes from selected White rot fung: Production and role in lignin degradation.** *FEMS Microbiological Reviews*, 13,125-135. 1994.

HERMANN, K. L. **Produção de manganês peroxidase por *Lentinula edodes* e *Lentinula boryana* cultivadas em biomassa lignocelulosica.** Dissertação de mestrado em Engenharia Ambiental. Universidade Regional de Blumenau, 2011.

HEWITT, L. M., CAREY, J. H., DIXON, D. G., MUNKITTRICK, K. R. **Examination of bleached kraft mill effluent fractions for potential inducers of mixed function oxygenase activity in rainbow trout.** In: *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mills Effluents*, St. Lucie Press, Florida, 1996.

HILLIS, D. G.; FLETCHER, J.; SOLOMON, K. R.; SIBLEY, P. K. **Effects of Ten Antibiotics on Seed Germination and Root Elongation in Three Plant Species.** *Arch Environ Contam Toxicol*, 60:220–232, 2011.

HSUEH, C.L. et al. **Degradation of azo dyes using low iron concentration of Fenton and Fenton-like system.** *Chemosphere*, v. 58, n. 10, p. 1409-1414, 2005.

HUBLIK, G., SCHINNER, F. **Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants.** *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.27, p.330-336, 2000.

JUNIOR C. M.; SILVA R. F.; ANTONIOLLI Z. I.; ANDREAZZA R.; STEFFEN R. B.. **Efeito do pH e cobre sobre o desenvolvimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura.** Santa Maria, RS - 2006.

KAMIDA, H. et al. **Biodegradação de Efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*.** Quim. Nova, v. 28, n. 4, p. 629-632, jul./ago. 2005.

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

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

KEREM, Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrisporium*. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 58, n. 4, p. 1123-1127, 1992.

KINAE, N., HASHIZUME, T., MAKITA, T., TOMITA, I., KIMURA, I. **Kraft pulp mill effluent and sediment can retard development and lyse sea urchin eggs.** **Bulletin Environm. Contam. Toxicology,** 1981.

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.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA / GTZ, p. 289, 2004.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. **Em Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry;** Young, R.; Akhtar, M., eds.; John Wiley & Sons: New York, 1998.

KIRK, T. e FARRELL, R.L. **Enzimtic “Combustion”: the Microbial Degradation of Lignin.** **Annual Reviews Microbiology.**41: 465-505. 1987.

KIST, C. P. **Estudo da degradação de compostos nitroaromáticos utilizando fungos do gênero *Pleurotus*.** 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná. Curitiba, 2013.

KOMURA, D. L. ***Pleurotus ostreatus* variedade *florida*: Caracterização Estrutural de Polissacarídeos do Micélio e Exopolissacarídeos.** 79 f., 2009. Dissertação em Ciências - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. **Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis**. Química Nova, Vol. 25, No. 1, 78-82, 2002.

KUMAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. **Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium***. FEBS Letters, 169, 242-250, 1984.

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.

MATHEUS, D. R.; OKINO, L. K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. (Ed.). **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente, 1998.

MARTÍNEZ, D., L. LARRONDO, N. PUTNAM, S.M. GELPKE, K. HUANG, J. CHAPMAN, K. HELFENBEIN, P. RAMAIYA, J. DETTER, F. LARIMER, P. COUTINHO, B. HENRISSAT, R., BERKA, D. CULLEN, D. ROKHSAR. **Genome sequence of the lignocelluloses degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78**. Nat. Biotechnol., 22: 695-700, 2004.

MARINO, R.H.; ABREU, L.D.; MESQUITA, DE, J.B.; RIBEIRO, G.T. **Crescimento e Cultivo de Diferentes Isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da Casca de Coco**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.75, n.1, p.29-36, jan./mar., 2008

MARTINS, R. L. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

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

MELO, I. S.; AZEVEDO, S. J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2º edição. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, São Paulo. 2008.

MENDES, M. S. **Elementos-traço em *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil. 2008, 160p.

MENEZES, R. C.; SILVA, S. I.; DURRANT, R. L. **Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas**. Campinas, Estudos Tecnológicos - Vol. 5, nº 1, 68-78, abr. 2009.

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

MOREIRA NETO, L.S. **Enzimas Lignofílicas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006, 110f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

MUNARI, F., GAIO, T. A. AND DILLON, A. 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**. Paper presented at XIV SINAFERM, Florianópolis, Brazil, 2003.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. **Enzima: Poderosa ferramenta na indústria**. Ciência Hoje, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4 ed. Sarvier, 2006.

NOZU, L.L.; SALDANHA, P.C.A.; SOARES, M.; BARBOSA, V.M.; MACHADO, A.F.; SILVA, E.R. **Avaliação do tratamento físico-químico e biológico dos resíduos de corantes produzidos em laboratório de microbiologia**. *Acta Scientiarum Technology*. Maringá, v. 32, n. 1, p. 7-13, 2010.

NÜSKE, J.; SCHNEIBNER, K.; DORNBERGER, U.; ULLRICH, R.; HOFRICHTER, M. Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technnology**, v. 30, p. 556-561, 2002.

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

OLIVER, J.H.; HYUNOOK, K.; PEN-CHI, C. **Decolorization of wastewater. Critical review**. **Environmental Science & Technology**, v. 30, n. 4, p. 499-505, 2000.

OKADA, W. S. **Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos**. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PALÁCIO et., al, **Estudo da toxicidade de efluente têxtil tratado por fotofenton artificial utilizando as espécies *Lactuca sativa* e *artemia salina***. ENGEVISTA, V. 14, n. 2. p. 127-134, agosto 2012.

PAWLOWSKY, U.; GLOWSKI, A. M. N.; FERRANTE, E. M. de; BOSA, M. N. Aplicação de Testes de Toxicidade na Tratabilidade de Efluentes de Pesticidas. **19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Foz do Iguaçu: ABES, p. 1-12. 1997.

PELEGRINI, R.; FONSECA, José Alberto Vinha M da; BARBOSA, Martina; PINTO, Nayara de Oliveira; SALAN, Renata Santos; DRAGONI SOBRINHO, BRITO. G., CONEGLIAN. N.N., R. Cassiana M., TONSO, S. **Tratamento de Efluentes Líquidos de Indústria de Papel e Celulose**. In: III Fórum de Estudos Contábeis, 2003, Rio Claro. III Fórum de Estudos Contábeis, 2003.

PEREIRA, P. M. **Avaliação do potencial de fungos na degradação do herbicida atrazina**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

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

POINTING, S. B. **Feasibility of bioremediation by white-rot fungi**. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001.

POKHREL, D.; VIRARAGHAVAN, T. **Treatment of pulp and paper mill wastewater - a review**. Sci. Total Environ. vol.333, p.37–58. 2004.

QUAGLIA, L.J.C.; QUADROS, R.A.Q. **Caracterização da toxicidade aguda dos efluentes setoriais e final da Bahia Sul Celulose**. In: Congresso anual de celulose de papel da abtcp, 28,1995. São Paulo, Anais. São Paulo, 1995.

RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V.; VASILCHENKO, L. G. **Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A Review**. Applied biochemistry and microbiology, v. 40, n. 1, p. 1-17, 2004.

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. **Pleurotus mushrooms: Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes commercial applications and implications**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.28, p.31-113, 1989.

REYS, L. F. **Estudo da degradação de Polietileno Tereftalato (PET) por Fungos Basidiomicetes Lignofílicos**. 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

RIZZO, L. **Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment**. Water research, 45 (15): 4311-4340, 2011.

RODRIGUES, K. A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de águas residuária sintética.** Tese de Doutorado em Hidráulica e Saneamento – Universidade de São Carlos. São Paulo, 2006.

RODRIGUES, K.; VIDAL, C.B.; ANDRADE, M.V.F.; PESSOA-WANDERLEY, C.R.; DUARTE, I.C.S.; MARINHO, G. **Influencia da glicose e da concentração do inoculo fungico no tratamento de efluente da castanha de caju.** Conex. Ci. E Tecnol. V.4, n.1, p. 41-51, Fortaleza/CE, 2010.

RODRIGUEZ, M. T. T.; PERERA, N. M. H. **Determinación toxicológica en aguas de río mediante el empleo de un bioensayo con planta.** Higiene y Sanidad Ambiental, **9**: 505-509, 2009.

RODRÍGUEZ, M. T. T.; GARCÍA, M. M.; PERERA, N. M. H.; NOVO, M. F. **Toxicidad aguda de lixiviados acuosos mediante un ensayo con Lactuca sativa L.** Hig.Sanid. Ambient. 6: 170-172, 2006.

RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. **Current Microbiology**, Vol.38(1), pp.27-32, 1999.

ROYER, G.; DESROCHERS, M.; JURASEK, L.; ROULEAU, D.; MAYER, R. **Batch and continuous decolorization of bleached kraft effluents by a white rot fungus.** Journal of Chemistry Technology and Biotechnhnology, v. 35b, p.14-22 (1985).

RUAS, DIEGO BOTELHO. **Aplicação do processo oxidativo avançado como pó tratamento de reator anaeróbico em efluentes de indústria de celulose com processo Kraft branqueada.** 2008. Dissertação de Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento – Universidade São Carlos, São Paulo, 2008.

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

SANJUST, E.; POMPEI, R.; RESCIGNO, A.; RINALDI, A.; BALLERO, M. Olive milling wastewater as a médium for growth of four Pleurotus species. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 31: 223- 235, 1991.

SCHMIDT, P.; WESCHSLER, F. S.; NASCIMENTO, J. S. **Tratamento do Feno de Braquiaria pelo fungo Pleurotus ostreatus.** Rev. Bras. Zootec., v. 32, n. 6, p. 1866-1871, 2003.

SIERRA-ALVAREZ, R., HARBRECHT, J., KORTEKAAS, S. AND LETTINGA, G. **The continuous anaerobic treatment of pulping wastewater.** J. Ferment. Bioengineer., 70(2), 119-127,1990.

SILVA, R. R. da. **Biorremediação de solos Contaminados com Organoclorados por Fungos Basidiomicetos em Biorreatores.** Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

SILVA, C. M. M. de S. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004.

SILVA, J. H.; MONTEIRO, R. T. R. **Degradação de Xenobióticos por Fungos Filamentosos Isolados de Areia Fenólica.** R. Bras. Ci. Solo, 24:669-674, 2000.

SELVAM, K., SWAMINATHAN, K., SONG, M. H., CHAE, K. **Biological treatment of a pulp and paper industry effluent by *Fomes lividus* and *Trametes versicolor*.** World Journal Microbiology & Biotechnology 18:523-526, 2002.

SJOSTROM, E. **Wood chemistry: Fundamentals and applications.** New York: Academic Press, 223p, 1981.

SOARES, C.H.L., DURÁN, N. **Degradation of low and high molecular mass fractions of Kraft E1 effluent by *Trametes villosa*.** Environmental Technology, New York, v. 19, p.883-891,1998.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. **Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L*).** Centro internacional de investigaciones para el desarrollo: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), México, 2004.

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./abr. 2009.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fungicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido.** Dissertação programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

SRINIVASAN, C., T. M. D'SOUZA, K. BOOMINATHAN. C. A. REDDY. **Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767.** Appl. Environ. Microbiol., 61: 4274 – 4277, 1995.

SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L; LINKINS, A. E. **Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi.** Mycology, 81, 234, 1989.

TARR, M.A. **Chemical degradation methods for wastes and pollutants - environmental and industrial applications.** New York: Marcel Dekker, 2003.

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

TIEN, M.; KIRK, T.K. **Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase.** Proceedings of the National Academy of Science. 81, 2280-2284, 1984.

THOMPSON, JD, PLEWNIAK, F., Ripp, R. et al. **Towards a reliable objective function for multiple sequence alignments.** J.Mol. Biol, 2001.

TUOR, U. W; FIECHER, A. **Enzymes of whitew rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay.** Journal of biotechnology: 4:11-17. 1995.

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 51<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Química., 2011, São Luís.

VALLI, K., AND M. H. GOLD. **Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*.** J. Bacteriol. 173:345-352, 1991.

VILLARROEL, M. J.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. **Acute, chronic and sublethal effects of the herbicides propanil on *Flornia magna*.** Chemosphere, v.53, p.857-864, 2003.

VICCINI, G. **Otimização da produção de esporos do fungo *Clonostachys rósea*– Um biopesticida para a cultura do morangueiro.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Dissertação de mestrado em Ciências Bioquímica, 2004.

VIDIC, R. D.; SUIDAM, M. T. ; BRENNER, R. C. **Impact of oxygen mediated oxidative coupling on adsorption kinetics.** Water reserarch. Oxford. 1994.

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

WANG, W. **Toxicity assessment of the aquatic environment using phytoassay methods.** Illinois Department of Energy and Natural Resources,EUA, 1989.

WILLE, C. N. **Potencial do fungo *Pycnoporus sanguineus* na biopolpação de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii*.** Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Bacharel em Ciências Biológicas. 2007.

YAN, G., AND ALLEN, D.G. **Biosorption of high molecular weight organochlorines in pulp mill effluent.** *Water Res.*, 28(9), 1933–1941, 1994.