

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PPGEMA – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MEIO
AMBIENTE
PAULO DE TARSO FERREIRA SALES

**ESTUDO DA TRATABILIDADE FÚNGICA E FOTOCATALÍTICA DE
EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA DA REGIÃO DE
GOIÂNIA, GO**

Goiânia

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULO DE TARSO FERREIRA SALES

**ESTUDO DA TRATABILIDADE FÚNGICA E FOTOCATALÍTICA DE
EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA DA REGIÃO DE
GOIÂNIA, GO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Meio Ambiente, para obtenção do título de mestre em Engenharia de Meio Ambiente.
Área de concentração: Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.
Orientadora: Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago

Goiânia

2007

PAULO DE TARSO FERREIRA SALES

ESTUDO DA TRATABILIDADE FÚNGICA E FOTOCATALÍTICA DE
EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA DA REGIÃO DE
GOIÂNIA, GO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Meio Ambiente, para obtenção do título de mestre em Engenharia de Meio Ambiente, aprovada em 28 de março de 2007, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago
Presidente da Banca

Profa. Dra. Warde Antonieta da Fonseca-Zang – CEFET-GO

Prof. Dr. Eraldo Henriques de Carvalho - UFG

A Deus, a meus pais e a todos que
fazem parte de minha vida : Obrigado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que souberam entender minhas ausências.

À Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago pelo apoio, ensinamentos, paciência, exemplo de equidade científica.

Aos Professores Ph. D. Luiza Cintra Campos, Ph. D. Eduardo Queija e Dra. Orlene Costa, obrigado pelo apoio científico.

Aos amigos do curso de Mestrado : Tânia, Rogério, Karla, Frederico, João Luiz, Luciney, Fabíolla, Eurivan, Gláucia, Rôsani, Gunter, Helaine, Bruna, Osmar, Wilson, Maura, Cybelle e Adriano.

Aos alunos e pesquisadores do Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia da UFG : Renata Watanabe, Danielle Rocha, Hélio Júnior, Tereza Luiza, Leonardo Nunes.

Às amigas do mestrado Margareth e Waleska.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da UFG : Maria Tereza Bara, Marize Campos, Telma A. Garcia.

Aos pesquisadores do Instituto de Ciências Farmacêuticas : Iram Mundim e Ricardo Rodrigues.

Aos Funcionários da Faculdade de Farmácia da UFG, especialmente à Dona Clélia.

Ao Grupo de pesquisa “Casadinho”: Karla, Gunter, Bruna, Frederico, Alessandro.

Ao meu amigo Alessandro Ribeiro, obrigado pelas ajudas nas análises e por sua amizade.

Ao meu amigo Rodrigo Gennari, obrigado pelos incentivos e apoio.

Ao CNPq (CT-Hidro), obrigado pela apoio financeiro.

Ao IFS (International Foundation of Science), obrigado pelo apoio tecnológico.

"Você não pode provar uma definição. O que você pode fazer,
é mostrar que ela faz sentido"

Albert Einstein

RESUMO

O presente trabalho visa avaliar a eficiência dos métodos de biorremediação e fotocatalise para o tratamento de efluente da área de produção de medicamentos de uma indústria farmacêutica da região de Goiânia-GO. Foram coletadas cinco amostras de 20,0 L cada em amostragem simples do efluente e mantidas a 4° C. O tratamento biológico foi efetuado por meio da inoculação dos fungos: *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Phanerochaetes chrysosporium*, *Schizophyllum commune* e *Ganoderma applanatum*. Os fungos foram colocados em meio de cultura sólido, esperando-se 5 dias para crescimento à temperatura ambiente e em ausência de luz, exceto o *Pycnoporus sanguineus*. O processo biológico foi efetuado em mesa agitadora refrigerada (New Brunswick Scientific) à temperatura de 28° C e 180 rpm na ausência de luz, sendo que foram colocados 100,00 mL de efluente em um erlenmeyer de 250 mL e acrescentado os conteúdos das placas (meio de cultura + fungo). O processo fotocatalítico foi efetuado em reator provido de sistema de refrigeração por água corrente e capacidade total de 500,00 mL, com borbulhamento, agitador magnético, TiO₂ em suspensão (Degussa P-25) e iluminação artificial. As formas de tratamento aplicadas foi usando ambos métodos separadamente e as formas conjugadas. O efluente foi caracterizado de acordo com *Standard Methods of Water and Wastewater*, bem como a foi determinada a atividade enzimática de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. A melhor forma de tratamento visando a diminuição de DQO da amostra 1 e 5 foi usando-se o fungo *S. commune* (78 %), sendo o efluente *in natura* e com indutor em meio sólido em 48 h de tratamento (amostra 1) e tendo o efluente *in natura* sem tratamento prévio da amostra (78 %) em 48 h de tratamento, para amostra 5. A maior produção de lacase (amostra 1 e 5) foi do *T. versicolor* em 96 h de tratamento, usando o indutor em meio sólido e para a amostra 2, a maior produção foi usando o efluente autoclavado e efluente *in natura*. A produção de manganês peroxidase teve maior expressão na amostra 1 quando se usou o *P. chrysosporium* em efluente autoclavado em 48 h de tratamento e *G. applanatum* em 72 h de tratamento de efluente fotocataliticamente tratado durante 7 min. Para a amostra 5, o *P. chrysosporium* com efluente autoclavado tratado em 24 apresentou maiores resultados e *P. sanguineus* em 72 h de tratamento com efluente autoclavado. Não foi detectada a enzima lignina peroxidase nas formas de tratamento biológico estudadas. Os processos combinados de tratamento biológico inicial seguido da fotocatalise vice-versa, não apresentaram eficiência que pudesse ter os dados comparados com o processo *in natura*.

Palavras Chave : Tratabilidade, fungos, fotocatalise, DQO.

ABSTRACT

This paper tended to assess the efficiency of bioremediation and photocatalysis methods for the treatment of the effluent from a pharmaceutical industry in Goiânia-GO. Five 20L-samples were collected and kept at 4°C. The bioremediation treatment was done with the inoculation of the following fungi: *pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Phanerochaetes chrysosporium*, *Schizophyllum commune* e *Ganoderma applanatum*. The fungi were inserted in a solid culture medium and kept for 5 days to grow at room temperature and in the absence of light, except the *Pycnoporus sanguineus*. The biologic process was done with the use of a Shaker (New Brunswick Scientific) at 28°C and 180 rpm in the absence of light. It contained a 250mL-Erlenmeyer filled with 100mL of the effluent and the contents of the dishes (culture medium + fungi). The photocatalytic process was performed in a reactor with a total capacity of 500,00 mL equipped with running water refrigeration system, bubbling, magnetic shaker, TiO₂ in suspension (Degussa P-25) and artificial lightning. Both conjugated forms and separate methods were used in the forms of treatment. The effluent was categorized according the Standard Methods of Water and Wastewater as well as the enzymatic activity of Laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase. The best form of treatment aiming the reduction of COD of the samples 1 and 5 was using the fungus *S. commune* (78%) with the effluent *in natura* and with inductor in solid medium in 48h of treatment (sample 1) and having the effluent *in natura* without previous treatment of the sample (78%) in 48 h of treatment for sample 2. The highest production of Laccase (samples 1 and 5) was from *T. versicolor* in 96h of treatment using the inductor in solid medium and for sample 5, the highest production was using the autoclaved effluent and the effluent *in natura*. The production of manganese peroxidase had its greatest expression in sample 1 when *P. chrysosporium* in autoclaved effluent in 48 h of treatment and *G. applanatum* in 72h of treatment of effluent treated photocatalytically during 7 minutes were used. Regarding sample 5, *P. chrysosporium* with autoclaved effluent treated in 24 h and *P. sanguineus* in 72h of treatment with autoclaved effluent showed better results. Lignin peroxidase enzyme was not detected in the forms of biological treatment studied. The process combined with the initial biological treatment followed by photocatalysis presented low efficiency due to the absorption of soluble microbial products, especially in sample 5, which presented higher concentration of organic components.

Key word: Treatmente, fungi, photocatalysis, COD.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Características físico-químicas e bioquímicas das amostras provenientes da indústria farmacêutica.	61
Tabela 2 – Relação do crescimento micelial, nos meios de cultura sólidos BGA, com indutor em meio sólido com amostra 1 e 5.	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Reações de degradação de madeira por fungos e espécies enzimáticas envolvidas.	29
Quadro 2 - Características das enzimas ligninolíticas.	35
Quadro 3 - Detalhes sobre a coleta das amostras	52
Quadro 4 - Características e tipos de análises realizadas nas amostras do efluente líquido.	54
Quadro 5 – Relação de códigos para identificação de cada espécie de fungo.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do ABTS (BOURBOUNNAIS et al., 1995).	31
Figura 2 - Ciclo catalítico da lacase (TORRES; BUSTOS-JAIMES; BORGNE, 2003).	37
Figura 3 - Ciclo catalítico da lignina peroxidase (MARTINEZ, 2002).	40
Figura 4 - Ciclo catalítico da manganês peroxidase (HOFRICHTER, 2002).	43
Figura 5-Representação esquemática dos princípios da fotocatalise heterogênea (A: Espécies aceptora, B: Espécies doadoras) (KUNZ, 2002).	44
Figura 6 - Esquema do reator fotocatalítico: (1) jaqueta de água para controle de temperatura; (2) tubo de quartzo para lâmpada; e (3) barra de agitador magnético.	59
Figura 7– Espectro de 300 a 750 nm da amostra 1. (a) 24 horas de tratamento, (b) 48 horas de tratamento, (c) 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente <i>in natura</i> serve como comparação da modificação do efluente.	63
Figura 8 – Espectro de 300 a 750 nm dos controles da amostra 1, dos respectivos fungos.	64
Figura 9 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da amostra 1, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato, em 610 nm.	66
Figura 10 – Variação do pH durante o tratamento da amostra 1 com os fungos. O pH do efluente <i>in natura</i> foi de 2,7.	66
Figura 11 – Variação da concentração de fenol total medido espectrofotometricamente em 700 nm, durante o tratamento biológico da amostra 1.	67
Figura 12 – Variação da concentração de proteínas nos caldos filtrados da amostra 1, em relação ao tempo de tratamento.	68
Figura 13 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da amostra 1, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH da reação foi igual a 5,0 e seringaldazina foi usada como substrato.	69
Figura 14 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da amostra 1. A linha mais escura indica que abaixo dela, observa-se a degradação da matéria orgânica do efluente <i>in natura</i> .	70
Figura 15 – Espectro de 300 a 750 nm do efluente autoclavado e posteriormente filtrado da amostra 1. (a) – 24 horas de tratamento, (b) – 48 horas de tratamento, (c) – 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente <i>in natura</i> serve como comparação da modificação do efluente.	75

Figura 16 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da amostra 1 autoclavada, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato.	73
Figura 17 – Variação do pH durante o tratamento com os fungos, usando-se a amostra 1 autoclavada. O pH do efluente <i>in natura</i> é 2,7.	73
Figura 18 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da amostra 1, previamente autoclavados, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico, usando o efluente autoclavado. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.	74
Figura 19 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da amostra 1 . A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente autoclavado.	75
Figura 20 – Espectro de 300 a 750 nm do efluente tratado com indutor em meio sólido. (a) – 24 horas de tratamento, (b) – 48 horas de tratamento, (c) – 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. Notar que o espectro do efluente <i>in natura</i> serve como comparação da modificação do efluente.	77
Figura 21 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da amostra 1, efluente tratado com indutor em meio sólido, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato.	78
Figura 22 – Variação do pH durante o tratamento com os fungos, usando indutor em meio sólido na amostra 1. O pH do efluente <i>in natura</i> foi 2,7.	78
Figura 23 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da amostra 1, usando-se indutor em meio sólido, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico, usando o efluente tratado com usando indutor em meio sólido. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.	79
Figura 24 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da amostra 1. A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente , usando indutor em meio sólido.	80
Figura 25– Espectro de 300 a 750 nm da Amostra 5 filtrado. (a) 24 horas de tratamento, (b) 48 horas de tratamento, (c) 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente <i>in natura</i> serve como comparação da modificação do efluente.	82
Figura 26 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da Amostra 5, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato.	83
Figura 27 – Variação do pH da Amostra 5, durante o tratamento com os fungos. O pH do efluente <i>in natura</i> foi de 6,40.	83
Figura 28 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados	84

da Amostra 5, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.

Figura 29 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da Amostra 5. A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente *in natura*. 85

Figura 30– Espectro de 300 a 750 nm da Amostra 5 previamente autoclavada e posteriormente filtrada. (a) 24 horas de tratamento, (b) 48 horas de tratamento, (c) 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente *in natura* serve como comparação da modificação do efluente. 87

Figura 31 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da Amostra 5 autoclavada, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato. 88

Figura 32 – Variação do pH da Amostra 5, durante o tratamento com os fungos, com efluente autoclavado. O pH do efluente *in natura* foi de 6,40. 88

Figura 33 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da Amostra 5 autoclavada, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato. 89

Figura 34 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da Amostra 5 . A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente , usando efluente autoclavado. 90

Figura 35– Espectro de 300 a 750 nm da Amostra 5 filtrada, com indutor em meio sólido. (a) 24 horas de tratamento, (b) 48 horas de tratamento, (c) 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente *in natura* serve como comparação da modificação do efluente. 91

Figura 36 – Variação do pH durante o tratamento com os fungos, com indutor em meio sólido. O pH do efluente *in natura* é 6,40. 92

Figura 37 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da Amostra 5 , com indutor em meio sólido, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato. 93

Figura 38 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da Amostra 5. A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente , usando efluente tratado com indutor em meio sólido. 94

Figura 39 – Fotos comparativas dos meios sólidos, utilizando-se o meio BGA e meios com indução das amostras 1 e 2. (a) *P. chrysosporium* (b) *L. edodes* (c) *T. villosa* (d) *T. versicolor* e (e) *P. sanguineus* 95

Figura 40- Variação da absorvância da amostra 1 tratada fotocataliticamente após 5 min e temperatura mantida a 28°C, de acordo com a variação da massa do catalisador 96

usado em 450,00 mL de efluente.	
Figura 41 – Espectro de 300 a 750 nm da amostra 1 tratada fotocataliticamente. O espectro do efluente <i>in natura</i> serve como comparação da modificação do efluente.	97
Figura 42 – Variação do pH da amostra 1, durante o tratamento fotocatalítico, usando-se 0,1 g de TiO ₂ .	97
Figura 43 – Curva de decaimento de fenóis totais da amostra 1, acompanhado durante 30 min.	98
Figura 44 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial, durante o tratamento fotocatalítico da amostra 1.	98
Figura 45 – Curva de decaimento de fenóis totais da Amostra 5 durante o tratamento fotocatalítico, acompanhado durante 80 min.	99
Figura 46 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial, durante o tratamento fotocatalítico da Amostra 5.	99
Figura 47 – Espectro de 300 a 750 nm da amostra 1 tratada com <i>Trametes versicolor</i> em 96 h de tratamento (22a) e com o <i>Lentinus edodes</i> 72 h(22b), com posterior tratamento fotocatalítico. Notar que O espectro do efluente <i>in natura</i> e do tratamento de biorremediativo serve como comparação da modificação do efluente.	100
Figura 48 – Variação do pH durante o tratamento combinado da amostra 1, usando-se 450,00 mL de efluente e 0,1 g de TiO ₂ , usando o efluente previamente tratado por <i>Lentinus edodes</i> em 72 h (LE 76 h) e <i>Trametes versicolor</i> (TVe 96 h).	101
Figura 49 – Espectro de 300 a 750 nm da amostra 1 previamente tratada por processo fotocatalítico, durante oito minutos. (a) – 24 horas de tratamento, (b) – 48 horas de tratamento, (c) – 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente <i>in natura</i> e do tratado fotocataliticamente serve como comparação da modificação do efluente.	102
Figura 50 – Variação do pH da amostra 1 durante o tratamento biológico, usando-se o efluente fotocataliticamente tratado durante 8 minutos com 0,1 g de TiO ₂ .	103
Figura 51 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da amostra 1 previamente tratado com fotocatalise em 8 min, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato.	104
Figura 52 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados, usando-se o efluente fotocataliticamente tratado durante 8 min. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.	105
Figura 53 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da amostra 1 . A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente , usando um efluente previamente tratado fotocataliticamente durante 8 min.	106
Figura 54 – Espectro de 300 a 750 nm da Amostra 5 tratada fotocataliticamente durante 20 min. (a) 24 horas de tratamento, (b) 48 horas de tratamento, (c) 72 horas	107

de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. Notar que o espectro do efluente *in natura* e o fotocataliticamente tratado servem como comparação da modificação do efluente.

Figura 55 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da Amostra 5 do efluente previamente tratado com fotocátalise em 20 min, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato. 109

Figura 56 – Variação do pH durante o tratamento biológico da Amostra 5, usando-se o efluente fotocataliticamente tratado durante 20 minutos, com 0,2 g de TiO₂. 109

Figura 57 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da Amostra 5, usando-se o efluente fotocataliticamente tratado durante 20 min. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato. 110

Figura 58 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da Amostra 5. A linha mais escura indica que abaixo dela, tem se a degradação da matéria orgânica do efluente , usando um efluente previamente tratado fotocataliticamente durante 20 min. 111

Figura 59 – Espectro de massa da amostra 1 em modo positivo, com relação m/z entre 50 e 1000 Da. (a) *G. applanatum* (b) *P. chrysosporium* (c) *P. sanguineus* (d) *S. comunne* (e) *L. edodes* (f) *T. versicolor* (g) *T. villosa* e (h) Efluente *in natura*. Todos os espectro são relativos aos tratamentos com o efluente *in natura* e fungos. 113

Figura 60 - % mortalidade dos náuplios de *A. salina*, submetidos ao teste de toxicidade da amostra 1. As amostras correspondem a 96 h de tratamento 115

Figura 61 – Espectro de massa da Amostra 5 em modo positivo, com relação m/z entre 50 e 1000 Da. (a) *G. applanatum* (b) *P. chrysosporium* (c) *P. sanguineus* (d) *S. comunne* (e) *L. edodes* (f) *T. versicolor* (g) *T. villosa* e (h) Efluente *in natura*. Todos os espectro são relativos aos tratamentos do efluente *in natura* e fungos. 115

Figura 62 - % mortalidade dos náuplios de *A. salina*, submetidos ao teste de toxicidade da Amostra 5. As amostras correspondem a 96 h de tratamento. 118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
CP	Clorofenol
DCP	Diclorofenol
TCP	Triclorofenol
PCP	Pentaclorofenol
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ST	Sólidos Totais
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
pH	Potencial Hidrogeniônico
LiP	Lignina Peroxidase
MnP	Manganês peroxidase
ABTS	2,2,9-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)
Redox	redução e oxidação (potencial)
MM	Massa Molar
N-	Ligação com grupo amino
pI	Ponto Isoelétrico
AV	Aceto Vanilona
DMB	2,6-di- methyl-1,4-benzoquinona
HAA	Ácido 3-hidroxianitranílico
HBT	3-hidróxibenzotriazol
K _f	Potencial de estabilidade
POA	Processos Oxidativos Avançados
UV	Ultra Violeta
<i>m/z</i>	relação massa carga
EI	Eletron Iozination
NMP/100mL	Número Mais Provável por cem mililitros
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE/EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
CLAE/EM/EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a dois espectrômetros de massas em série

CG-EM/EM	cromatografia gasosa acoplada a dois espectrômetros de massas em série
CL ₅₀	Concentração Letal média
BGA	Meio agar batata
P/V	relação peso volume
OD	Oxigênio Dissolvido
GA	<i>Ganoderma applanatum</i>
LE	<i>Lentinus edodes</i>
PC	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
PS	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
SC	<i>Schizophyllum commune</i>
TVe	<i>Trametes versicolor</i>
TVi	<i>Trametes villosa</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio-Ambiente
ϵ	coeficiente de absorvidade molar
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda máximo
PMS	Produto Microbiano Solúvel

LISTA DE SÍMBOLOS

kg	quilograma
km	quilômetro
$m^3 \cdot dia^{-1}$	metro cúbico por dia
$mg \cdot L^{-1}$	miligrama por litro
h	hora
kDa	quiloDalton
mV	miliVolt
$g \cdot mol^{-1}$	gramas por mol
u	unidade
$ng \cdot L^{-1}$	nanogramas por litro
$\mu g \cdot L^{-1}$	microgramas por litro
$g \cdot kg^{-1}$	gramas por quilograma
L	litro
NTU	Unidades de Turbidez
rpm	rotações por minuto
nm	nanômetro
$mg \cdot L^{-1}$ de Pt/Co	miligrama por litro de platina cobalto
mg	miligrama
mg de $O_2 \cdot L^{-1}$	miligrama de oxigênio por litro
μm	micrômetro
atm	atmosfera (pressão)
°C	graus centígrados
m	massa
z	carga
m/z	relação massa carga
g	grama
E_o	Potencial de oxi-redução
R	Substrato
P	Produto
cm	centímetro
mm	milímetro
E_o	Potencial
$\mu L \cdot min^{-1}$	microlitro por minuto
μL	microlitro
$mol \cdot L^{-1}$	mol por litro

U.mL ⁻¹	unidade por mililitro
mmol.L ⁻¹ .cm ⁻¹	milimol por litro por centímetro
mmol.L ⁻¹	milimol por litro
ΔAbs mL ⁻¹ min ⁻¹	Variação da absorbância por mililitro por minuto
mL min ⁻¹	milimol por minuto
J .m ² s ⁻¹	Joules metro quadrado por segundo
Min	minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Efluente da Indústria Farmacêutica	24
2.2	Tratamento do Efluente Líquido da Indústria Farmacêutica	27
2.3	Processos Biológicos para o Tratamento de Efluentes da Indústrias Farmacêutica	28
2.4	Enzimas Lignolíticas	34
2.4.1	Lacase	36
2.4.2	Lignina Peroxidase	39
2.4.3	A Manganês peroxidase	41
2.5	Processo de Fotocatálise heterogênea	43
2.6	Espectrometria	46
2.6.1	Espectrometria UV-vis	46
2.6.2	Espectrometria de massas	46
2.7	Ensaio de toxicidade usando Artemia salina	48
3	OBJETIVO GERAL	50
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5	METODOLOGIA	52
5.1	Coleta do Efluente	52
5.2	Microrganismos	52
5.3	Meios de cultura	53
5.3.1	Meio ágar batata	53
5.3.2	Meio ágar batata e efluente	53
5.3.3	Condições de crescimento da cultura	53
5.4	Métodos Analíticos de caracterização	53
5.4.1	Determinação de fenóis totais	55
5.4.2	Determinação das Atividades Enzimáticas Antes e Após O Tratamento do Efluente com Fungos	55
5.4.3	Determinação de Proteína	56
5.4.4	Determinação de açúcares redutores	57
5.5	Determinação da toxicidade aguda com Artemia salina	57
5.6	Avaliação do Crescimento Micelial Radial dos Fungos	57

5.7	Realização dos Tratamentos	58
5.8	Preparação e manutenção das Amostras	59
5.9	Espectros no UV-vis	50
5.10	Ensaio de Espectrometria de massa	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
6.1	O Método de Tratamento Biológico	52
6.1.1	Tratamento da Amostra 1	52
6.1.1.1	Efluente <i>in natura</i>	52
6.1.1.2	Efluente autoclavado	70
6.1.1.3	Indução no Meio Sólido	75
6.1.2	Tratamento da Amostra 2	80
6.1.2.1	Efluente <i>in natura</i>	80
6.1.2.2	Efluente autoclavado	86
6.1.2.3	Indução no Meio Sólido	90
6.2	Efeito da indução no meio sólido no crescimento micelial	94
6.3	O Método Fotocatalítico	96
6.3.1	Tratamento da Amostra 1	96
6.3.2	Tratamento da Amostra 5	99
6.4	O Processo Combinado: Biológico e Fotocatálise	100
6.4.1	Tratamento da Amostra 1	100
6.4.1.1	Tratamento Biológico Seguido de Fotocatálise	101
6.4.1.2	Tratamento da Amostra 1: Fotocatálise Seguido de Tratamento Biológico	101
6.4.2	Tratamento da Amostra 5	106
6.5	Avaliação da distribuição de massas, usando espectrômetro de massa e sua relação com a toxicidade do efluente	111
6.5.1	Tratamento da Amostra 1	111
6.5.2	Tratamento da Amostra 5	115
7	CONCLUSÕES	119
8	RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	121
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
	APÊNDICE	138

INTRODUÇÃO

A Química é um importante instrumento para o desenvolvimento sócio-econômico de um país e partindo desse pressuposto, a síntese de novos produtos que atendessem à demanda industrial foi incrementada a fim de atender às necessidades da indústria moderna. Mas com a industrialização, a geração de rejeitos tomou outra conotação no meio ambiente, pois, por exemplo, para a indústria farmacêutica especializada em síntese orgânica para produzir 1 kg produto final, gera-se de 25 a 100 kg de lixo químico (CORREIA et al., 2002).

Com a evolução dos processos industriais e o conseqüente surgimento de inúmeros produtos que rapidamente tornaram-se de primeira necessidade, a atividade industrial adquiriu um caráter essencial na sociedade contemporânea. Embora sua importância seja indiscutível, a atividade industrial costuma ser responsabilizada, muitas vezes com justa razão, pelo fenômeno de contaminação ambiental, principalmente graças a dois fatores de extrema importância: o acúmulo de matérias-primas e insumos, que envolve sérios riscos de contaminação por transporte e disposição inadequada e ineficiência dos processos de conversão, o que necessariamente implica na geração de resíduos (FREIRE et al., 2000).

Embora exista a preocupação universal em se evitar episódios de contaminação ambiental, estes eventos prejudiciais continuam acontecendo, principalmente porque, em função dos fatores acima comentados, grande parte dos processos produtivos são intrinsecamente poluentes. Ao longo das décadas, a atividade industrial tem produzido rejeitos gasosos, líquidos e sólidos nocivos ao meio ambiente (FREIRE et al., 2000). Os processos industriais que utilizam grandes volumes de água contribuem significativamente para a contaminação dos corpos d'água, principalmente pela ausência de tratamento para os grandes volumes de efluentes líquidos produzidos. Dentro deste contexto, uma importante parcela do processo de contaminação no Estado de Goiás, pode ser atribuída às atividades das diversas indústrias farmacêuticas, principalmente a partir do final da década de 90.

Substâncias farmacêuticas são quaisquer substâncias ou produtos usados que se pretende usar para modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos em benefício de quem o recebe (WHO, 1972). Elas são um grupo de substâncias que até recentemente vinham sendo expostas ao meio ambiente com muito pouca atenção. A partir da década de 80 encontram-se relatos de dados sobre a ocorrência destes produtos na superfície de águas naturais e nos efluentes de estações de tratamento de esgoto (HALLING-SORENSEN et al., 1998; HIRSCH et al., 1999). Mais recentemente, compostos farmacêuticos

têm sido detectados no solo e na água potável, mas pouco se conhece sobre o risco imposto aos humanos por esta contaminação (KÜMMERER, 2000). Diante destas constatações, o monitoramento de resíduos de drogas no ambiente aquático tem ganhado muito interesse (HIRSCH et al., 1999).

Segundo Arjona e Ruiz (1997), as indústrias de medicamentos são produtoras de uma quantidade considerável de resíduos, devido ao descarte de medicamentos acabados que são rejeitados pelo controle de qualidade, das perdas inerentes aos processos e, sobretudo, das embalagens que transportam os insumos e matérias primas.

A pesquisa das substâncias possivelmente encontradas nos efluentes da indústria de medicamentos se justifica na medida em que somente será possível propor um tratamento adequado aos resíduos desse tipo de indústria quando estes estiverem bem conhecidos e quantificados. O tratamento do efluente da indústria farmacêutica tem maior complexidade, pois está relacionada diretamente ao processo produtivo como a síntese, a fermentação, a extração e formulação. Além de uma grande variedade de produtos lançados no efluente da indústria farmacêutica, a fração orgânica biodegradável e refratária apresentam relações com grande variância, o que pode apresentar maior dificuldade para os tratamentos biológicos mineralizarem tais contaminantes (BALCIOGLU, OETKER, 2003).

No Brasil várias indústrias farmacêuticas utilizam sistemas como lodo ativado e lagoas aeróbias e anaeróbias. Os sistemas de tratamento das indústrias farmacêuticas do estado de Goiás estão sendo implantadas agora, sendo que algumas já possuem o sistema de lodo ativado. Diante do que foi exposto, fica clara a necessidade de pesquisas nesta área, para se definir sistemas eficazes no tratamento de efluentes de indústria farmacêutica.

O presente projeto visa avaliar a eficiência dos métodos de tratamento biológico com fungos e fotocatalise para o tratamento de efluente de uma indústria farmacêutica, por meio da inoculação dos fungos: *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Phanerochaetes chrysosporium*, *Schizophyllum commune* e *Ganoderma applanatum* e para a fotocatalise, usando-se fonte de radiação artificial, bombeamento de ar e agitação magnética, com o catalisador (TiO_2) disperso. Os métodos de tratamento aplicados foi usando ambos métodos separadamente e as formas conjugadas. Para a avaliação das melhores formas de tratamento, foram usados os dados gerados sobre a relação entre DQO (Demanda Química de Oxigênio) e a DQO inicial, a produção enzimática de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, diminuição da absorvância no comprimento de onda característico.

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Um caminho obrigatório a ser seguido pelas indústrias farmacêuticas, autalmente, seja pelos fundamentos da competitividade, seja por motivos éticos, é a obtenção de um certificado ISO 14000, tendo reconhecimento mundial e pode representar um alívio para a população, principalmente nos tempos atuais em que os usuários de produtos farmacêuticos são atemorizados pela freqüente adulteração de medicamentos. A lógica desse caminho é lógico, considerando-se que, ao mencionar a indústria farmacêutica, faz-se referência direta a um setor que tem como objetivo o prolongamento e a melhoria da qualidade da vida humana, o que só pode ser possível no contexto de um meio ambiente saudável (GONÇALVES, 2000).

Partindo de avaliações do impacto ambiental relativo ao efluente da indústria farmacêutica, faz-se necessário estudo do processo de degradação dos contaminantes, sendo que de acordo com os princípios da química verde que propõe o uso de catalisadores no processo de tratamento de resíduos (PRADO, 2003), a tratamento biológico com fungos (fungos) e fotocatalise heterogênea têm grandes perspectivas no uso como técnica de mineralização de compostos recalcitrantes presentes nas águas residuárias da indústria farmacêutica. Melo e colaboradores (2006) propõem além de descontaminar o efluente, avaliar a toxicologia usando-se microrganismos (*Selenastrum capricornutum*), eles também propõem um estudo de citotoxicidade, usando-se células (fibroblastos), a fim de melhorar a avaliação da viabilidade de processos de tratamento.

O efluente da indústria farmacêutica objeto deste estudo é despejado na rede de esgoto da empresa de saneamento local, sendo o despejo final no rio Meia Ponte, considerando que essa bacia cobre cerca de 10% da área do estado de Goiás e está relacionada a 43% da população goiana e muitos municípios lançam seus efluentes em rios dessa bacia, embora, cerca de 42% do manancial abastece a população da capital, Goiânia. Em muitos pontos do percurso, a água se mostra imprópria para consumo e a degradação do rio, já pode ser observada em vários trechos, o que compromete o abastecimento de água potável a população dessa região (www.meiaponte.org/bacia.htm). A bacia hidrográfica do rio Meia Ponte ocupa uma área de 11480 km² que se distribui pelo centro-sul do Estado de Goiás, entre as coordenadas 48° 46' 48" e 49° 44' 51" de longitude oeste e 16° 06' 38" a 18° 32' 53" de latitude sul. Esta bacia, que abrange 35 municípios, tem como rio principal o Meia Ponte, cuja extensão é de 546,372 km, sendo afluente do rio Paranaíba e pertencente à bacia hidrográfica do rio Paraná, estando sua bacia incluída na região das cabeceiras ou "Espinha Dorsal" (IPH, 1998). Existem 248 indústrias instaladas ao longo da bacia, o lançamento de resíduos sólidos é

da ordem de 10 toneladas/dia e o lançamento de esgoto doméstico 183 mil m³.dia⁻¹, no trecho do rio percorrido em Goiânia, o comprometimento das águas é devido principalmente aos frigoríficos, laticínios, esgotos domésticos e lixo hospitalar. Devido à alta taxa de concentração populacional e das atividades econômicas, a região apresenta inúmeros problemas ambientais, como a ocupação desordenada do solo, que acarreta processos erosivos e assoreamento dos cursos d'água, e os depósitos de lixo que contaminam as águas superficiais e do lençol freático (IPH, 1998).

2.1- Efluente da Indústria Farmacêutica

Substâncias farmacêuticas já foram detectadas em efluentes líquidos hospitalares, domiciliares, águas superficiais e em águas de abastecimento. Muitos países já pesquisaram a presença de tais contaminantes : Brasil (STUMPF et al., 1999 e UMBUZEIRO,2001), Canadá (TERNES et al., 1999a), Inglaterra (ASHTON et al., 2004), França (ANDREOZZI et al., 2003), Alemanha (HEBERER, 2002; TERNES, 1998; TERNES et al., 2001), Grécia (KOUTSOUBA et al., 2003), Itália (CALAMARI et al., 2003), Espanha (FARRÉ et al., 2001), Suíça (SOULET et al., 2002; GOLET et al., 2002; BUSER et al., 1998), Suécia (ANDREOZZI et al., 2003) e Estados Unidos (KOLPIN et al., 2002) .

Embora compostos farmacêuticos sejam farmacologicamente e clinicamente testados, dados sobre a ecotoxicidade destes compostos ativos são geralmente limitados. Valores de toxicidade aguda são nas faixas de mg.L⁻¹ (HALLING-SORENSEN et al., 1998; WEBB, 2001), embora, níveis mais baixos foram detectados em águas superficiais, o que poderá ser possível avaliar apenas a toxicidade crônica (WEBB,2001).

As águas residuárias, principalmente as industriais que contêm compostos orgânicos e metais pesados, quando lançadas no meio ambiente, sem tratamento adequado, provocam profundos danos tanto à vida aquática como ao homem. O impacto da descarga dessas substâncias no corpo receptor, com rios e lagos, tem sido muito forte. Uma consequência imediata e bastante visível é a ocorrência de peixes mortos cada vez mais frequentes nas águas de superfície. Além disso, efeitos subseqüentes como bioacumulação ou penetração na cadeia alimentar dos sistemas aquáticos também são detectáveis, causando disfunção do sistema endócrino reprodutor dos seres que vivem nesse meio, o que influencia a propagação das espécies (BERTOLETTI, 1989).

Suspeita-se que muitos destes compostos tóxicos sejam potentes agentes carcinogênicos (BERTOLETTI, 1990). Além disso, como as águas residuárias normalmente

contém na sua composição mais de um composto orgânico, deve-se levar em consideração o efeito sinérgico desses compostos (BERVOETS et al., 1996; VANEGAS et al., 1997). Outro aspecto relevante relativo a toxicidade do meio aquático é a concentração de matéria orgânica encontrada nos efluentes que interagindo com metais ou compostos orgânicos, podem influenciar na toxicidade desses agentes (KOPPINKE; POERSCHMANN; STOTTMEISTER, 1995).

Antibióticos tem efeitos diferentes que os outros xenobióticos, pois seu alvo específico são as bactérias. O aumento do uso de antibióticos nas últimas cinco décadas causou uma seleção genética de bactérias mais resistentes (JORGENSEN; HALLING-SORENSEN, 2000). Considerando que o desenvolvimento da resistência à antibióticos é favorecida pela poluição das concentrações deles na água e sedimento (KÜMMERER ; HENNINGER, 2003).

Nos últimos anos, há um crescente interesse no efeito de genotoxicidade provenientes do lançamento de compostos genotóxicos ao meio ambiente. A genotoxicidade é medida pela capacidade de substâncias danificarem o DNA e cromossomos das células. Muitas substâncias farmacêuticas são genotóxicas, bem como citostáticas (SORSA et al., 1985). Tais substâncias são muito tóxicas a humanos (mutagênico, carcinogênico e teratogênico), sendo este grupo de importante estudo para o efeito ambiental (DAUGHTON; TERNES, 1999). A toxicidade pode mascarar a genotoxicidade, principalmente se a amostra for um agente mutagênico fraco, fazendo-se necessário o uso de teste de toxicidade e de genotoxicidade, a fim de se ter uma melhor avaliação dos resultados (KARGALIOGLU et al., 2002). Muitos estudos retrataram mutagenicidade de águas residuárias (FILIPIC; TOMAN, 1996; JOLIBOIS; GUERBERT; VASSAL, 2003; JOLIBOIS; GUERBET, 2005) em águas superficiais (UMBUZEIRO et al., 2001; KUTLU et al., 2004) e águas de abastecimento (PARK et al., 2000). A ausência de atividade mutagênica em efluentes já foi relatada em muitos estudos (SHISHIDA et al., 2000; MONARCA et al., 2000) e outros autores relataram a redução parcial de compostos mutagênicos por tratamentos biológicos (ONO et al., 1996; HU et al., 2003).

As indústrias farmacêuticas do Estado de Goiás apresentam uma produção diversificada, podendo-se citar antibióticos, antifúngicos, antigripais, broncodilatadores, antivirais, vitaminas, produtos dermatológicos, hormônios, dentre outros. Sabe-se que a indústria farmacêutica é uma das que contribui ao processo de contaminação ambiental de seus resíduos gerados, principalmente durante os processos de síntese de fármacos que utilizam uma gama de compostos halogenados, tanto como reagente, solvente ou

intermediário (NEW et al., 2000). O emprego destes solventes orgânicos é responsável pela presença de compostos tóxicos no resíduo, inclusive fenóis.

Os fenóis compõem uma família de compostos orgânicos aromáticos caracterizados por um grupo hidroxila ligado a um átomo de carbono do anel aromático, de origem biológica ou sintética. Estas moléculas são antropogênicas e xenobióticas. Podem ocorrer como líquidos incolores ou sólidos brancos à temperatura ambiente, muitos apresentam odor forte e característico e são altamente tóxicos e cáusticos. Estes compostos são poluentes ambientais provenientes de efluentes de indústrias diversas, inclusive da indústria farmacêutica (KUMARAN; PARUCHURI, 1997).

Embora o uso de fenol como um agente anti-séptico no tratamento de ferimentos e em cirurgias foi de um inquestionável valor no estabelecimento da importância de técnicas assépticas na medicina e tenha ajudado a salvar a vida de muitos pacientes, a toxicidade deste composto já era evidente, quando do seu uso popular e contemporâneo como um agente suicida, quando administrado oralmente (POWLOWSKI; SHINGLER, 1994). Enquanto o uso do fenol como um anti-séptico tenha acabado por volta de um século, sua aplicação como um desinfetante geral continuou, a medida que novos usos para o fenol e seus derivados surgiram. Fenol e seus derivados clorinados, 2-clorofenol (2-CP), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP) e pentaclorofenol (PCP), são contaminantes fenólicos comuns.

Grandes quantidades de diferentes corantes químicos são usadas em várias aplicações industriais, sendo que uma significativa proporção destes aparece na forma de resíduos. Neste contexto, os diversos corantes utilizados em vários segmentos industriais aparecem como um grande problema ambiental. Muitas dessas substâncias possuem propriedades mutagênicas e/ou carcinogênicas. Adicionalmente, o descarte de corantes em rios e lagos prejudica a absorção de energia luminosa, alterando os ecossistemas aquáticos (FERREIRA et al., 1999), afetam também o efluente quanto a estética e a solubilidade do gás na água (FU ; VIRARAGHAVAN, 2001).

Os corantes azo são o tipo de corante artificial mais comumente usado na indústria têxtil, farmacêutica, de papel, de alimentos, de cosméticos e outras indústrias (KNAPP; NEWBY, 1995) e eles são responsáveis pela alta coloração presente nas águas residuárias.

Outra questão também bastante preocupante são os resíduos gerados na produção de antibióticos porque o não tratamento ou um tratamento ineficiente destes resíduos pode levar a uma grande alteração da microbiota do leito receptor do efluente, acarretando inclusive o desenvolvimento de microrganismos resistentes (KÜMMERER, 2004). Os

antibióticos encontram-se distribuídos em várias classes, sendo o grupo dos compostos β -lactâmicos o de maior destaque, considerando-se a diversidade de compostos e principalmente o grande uso dos mesmos pela população, implicando obviamente numa grande produção industrial e conseqüentemente uma grande descarga de resíduos β -lactâmicos nos efluentes industriais.

Certamente além das substâncias mencionadas, outros compostos orgânicos, biodegradáveis ou não, são descartados nos efluentes destas indústrias. O resultado desta complexa geração de resíduos é um efluente apresentando grande variação quanto aos parâmetros físico-químicos, biológicos e químicos como Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Totais (ST) e pH. Nos processos de síntese química e de fermentação estes parâmetros encontram-se elevados e com uma variação de pH de 4 a 11 e de 4 a 8 respectivamente. Para a extração de produtos naturais, os valores de DBO, DQO e ST apresentam-se em níveis baixos e o pH varia de 6 a 8 (USEPA, 1983). Saravane e colaboradores (2001) apresentaram o efluente desta indústria como contendo várias formas de drogas degradadas, que contribui para a uma alta demanda química de oxigênio (DQO), de sólidos voláteis e de solvente orgânico.

2.2 - Tratamentos do Efluente Líquido da Indústria Farmacêutica

Existem diferentes tipos de tratamento de efluentes, sendo necessária a caracterização do efluente final a ser tratado para melhor escolha do tratamento a ser adotado. Uma crescente preocupação com as questões ambientais vem estimulando o estudo de alternativas para o tratamento de efluentes industriais. Na indústria farmacêutica, uma larga variedade de compostos estruturalmente diferente são usados dentro de um curto período de tempo e por isso seu efluente é extremamente variável em composição. Esta inespecificidade certamente acarreta dificuldades na definição do melhor sistema de tratamento a ser realizado, mas é sabido que para sistemas biológicos de tratamento, a inespecificidade como requerido para o tratamento do efluente farmacêutico, pode ser obtida usando-se ou as lignina peroxidases de fungos lignolíticos ou processos inespecíficos de redução catalisadas por várias bactérias sob condições anaeróbias (STOLZ , 2001). Rosén e colaboradores (1998) estudaram em escala laboratorial e piloto um tratamento biológico (lodo ativado) para o efluente de uma indústria farmacêutica e demonstraram que a combinação de fungos e bactérias no tratamento removeu maior toxicidade do efluente do que o tratamento convencional com bactérias.

Para o tratamento do efluente da indústria farmacêutica tem-se relato do emprego de processos físico-químicos (YIANG BIAN et al., 1998) e de processos biológicos aeróbios e/ou anaeróbios (EL-GOHARY et al., 1995; NEW et al., 2000; SARAVANE et al., 2001; MOHAN et al., 2001; NANDY ; KAUL, 2001).

Atualmente há uma forte tendência em incrementar o tratamento biológico de efluentes industriais de uma maneira geral, visto que este processo acarreta menores conseqüências ao meio ambiente se comparado aos tratamentos físico/químicos. Há na literatura inúmeros estudos e avanços sobre o biotratamento de resíduos gerados em atividades produtivas diversas como a indústria têxtil, a de papéis, a de soda, a de alimentos e a indústria química em geral. A maioria dos estudos relacionam-se a resíduos de corantes (KAPDAN et al., 2000; FU ; VIRARAGHAVAN, 2001; STOLZ, 2001; NOVOTNÝ et al., 2001; ROBINSON et al., 2001). De forma mais pontuada, pode-se citar também pesquisas sobre o tratamento de produtos químicos distintos tais como anilina (O'NEILL et al., 2000), compostos fenólicos, compostos aromáticos policíclicos (ROCKNE ; STRAND, 2001).

Estudos preliminares, realizados recentemente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia da UFG, do lodo coletado na estação de tratamento de uma indústria farmacêutica em Anápolis, demonstraram a ocorrência de diferentes fungos de coloração micelial branca. Esse fato, somado ao grande número de estudos e resultados positivos obtidos com o emprego de fungos de decomposição branca no tratamento de produtos químicos diversos, levaram à definição da escolha deste tipo de microrganismo a ser testado frente a um efluente farmacêutico, além da utilização de bactérias.

2.3-Processos Biológicos para Tratamento de Efluentes

Embora biorremediação seja um termo relativamente novo, ele descreve um processo que tem existido desde o início da vida. Uma grande variedade de compostos orgânicos recalcitrantes e tóxicos ocorrem naturalmente, existem na natureza e ela tem desenvolvido caminhos para mineralizá-los. A biorremediação utiliza as funções naturais dos microrganismos de transformação, mineralização ou complexação de compostos, direcionando-as para o controle de poluentes ambientais orgânicos ou inorgânicos.

Segundo Kunz et al. (2002), a possibilidade de usar microrganismos versáteis capazes de degradar de maneira eficiente contaminantes é de grande importância principalmente devido ao baixo custo operacional. Outra grande vantagem é a possibilidade

de uso em grandes volumes, com a total mineralização dos compostos orgânicos em CO₂ e H₂O (ou CH₄ e CO₂) (FREIRE et al., 2000).

O processo aeróbio, característico dos fungos que produzem enzimas extracelulares, vem sendo bastante estudado, principalmente na degradação e transformação de compostos organoclorados em compostos menos tóxicos (FREIRE et al., 2000). A degradação por fungos pode ser classificada por fungos de decomposição branca que possuem a capacidade de degradar simultaneamente os componentes da parede celular da madeira, lignina, hemicelulose e celulose, enquanto os fungos de decomposição marrom apresentam a capacidade de despolimerizar os polissacarídeos da parede celular da madeira, hemicelulose e celulose. As enzimas envolvidas nestes processos de degradação correspondem a espécies de grande atividade química, que podem, portanto, ser utilizadas na degradação de compostos químicos de estrutura diversa (ALEXOPOULUS, 1996). O Quadro 1 relaciona os tipos de fungos e dois tipos de substrato para a ação enzimática.

Em essência, a biorremediação fundamenta-se na utilização dos compostos tóxicos de interesse como substrato para o crescimento e a manutenção de Microrganismos. Dependendo da natureza do aceptor de elétrons, os processos biológicos podem ser divididos em aeróbios ou anaeróbios. Nos aeróbios, que levam à formação de CO₂ e H₂O, o aceptor de elétrons é oxigênio molecular. Nos anaeróbios, que degradam a CO₂ e CH₄, o oxigênio molecular está ausente, sendo que algumas formas de carbono, enxofre e nitrogênio participam como aceptores de elétrons (ex. NO₃⁻, SO₄⁻², CO₂) (FREIRE et al., 2000).

Quadro 1 – Tipos de reações de degradação de madeira por fungos e espécies enzimáticas envolvidas (ALEXOPOULUS et al., 1996).

TIPO DE FUNGO	CELULOSE	LIGNINA
Decomposição Branca	HIDROLÍTICAS (endo e exoglucanases)	FENOL OXIDASES Lacase, lignina peroxidase, manganês peroxidase
	OXIDATIVAS (celobiose) OXIDOREDUTASES (celobiose-quinona redutase)	
Decomposição Marrom	DESPOLIMERIZAÇÃO OXIDATIVA (radicais livres de oxigênio, metaloproteínas)	DESMETILAÇÃO
	HIDROLÍTICAS (endoglucanases, complexos polipeptídicos).	

O Processo aeróbio mais utilizado está representado pelos sistemas de lodos ativados. Este processo consiste na agitação dos efluentes na presença de microorganismos e ar, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria

orgânica (KUNZ, 2002) Infelizmente, o processo apresenta o grande inconveniente de ser bastante susceptível à composição do efluente (cargas de choque), além de produzir um grande volume de lodo (KUNZ, 2002). Um dos graves problemas associados ao tratamento aeróbio de efluentes, corresponde a perdas de substratos tóxicos por volatilização (FREIRE, 2000).

O uso de fungos capazes de degradar compostos orgânicos parece ser um método bastante promissor para o tratamento deste efluente, em particular, os fungos de decomposição branca que possuem um sistema enzimático extracelular capaz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos (BARR; AUST, 1994). Entretanto, em organismos eucariotos, os xenobióticos podem promover a alteração de sistemas enzimáticos responsáveis por processos vitais, como cita Jonsson (2005):

- Aumento da atividade enzimática no meio extracelular por extravasamento da proteína para este meio, com conseqüente diminuição desta atividade no meio intracelular;
- Aumento da atividade enzimática no meio extracelular ou intracelular por ativação enzimática, através da interação direta do agente químico com a enzima;
- Aumento da atividade enzimática intracelular por indução na síntese da proteína;
- Diminuição da atividade no meio extracelular ou intracelular por inibição, através da interação direta do agente químico com a proteína.

Os principais fungos de decomposição branca que tem sido utilizados como agentes biotransformadores são *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Trametes villosa*, *Phanerochaete chrysosporium* (KAPDAN et al., 2000; FU ; VIRARAGHAVAN, 2001; STOLZ, 2001; NOVOTNÝ et al., 2001; ROBINSON et al., 2001). Enzimas como lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase são produzidas por estes fungos.

O *Phanerochaete chrysosporium* é um fungo de decomposição branca muito utilizado em estudos de remediação de efluentes, em função da sua capacidade para produzir uma grande diversidade de enzimas. Esse microrganismo tem sido utilizado com sucesso na degradação de muitas substâncias recalcitrantes, dificilmente degradadas em condições naturais, como os compostos organoclorados, principalmente devido à produção de significativas quantidades de lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) (KHINDARIA; GROVER; AUST, 1998). Essas enzimas extracelulares apresentam um elevado poder oxidante, o que faz com que possam ser utilizadas não somente para tratamento de efluentes que contenham o seu substrato habitual, mas também numa grande variedade de espécies químicas similares à estrutura básica da lignina (TUOR, 1995).

O *Trametes villosa* é um fungo conhecido na degradação da lignina do efluente Kraft da indústria papelreira por meio da lacase e tal degradação não se verifica na lignina presente na madeira *in natura* quando se usou o fungo na madeira natural. Isso se deve ao tamanho da molécula da enzima, não ser capaz de penetrar na macro-molécula da lignina (poros da madeira) e atacar os grupos fenólicos (LUND et al.,2003).

O *Trametes versicolor* apresentou uma boa oxidação da lignina, mas também de outros não fenólicos, com a inclusão do mediador ABTS ou 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate). Detectou-se que no efluente Kraft, os dois tipos de enzimas lacase produzidas pelo fungo inibiu ou reduziu a produção de radicais fenóxi provenientes da lignina e a adição do ABTS (Figura 1) preveniu a polimerização da lignina (BOURBONNAIS et al.,1995). Este fungo também já foi estudado, inoculando-o ao lodo ativado, para tratamento de efluente de indústria de óleo de oliva (DHOUIB, 2006). O uso deste fungo para aumentar a eficiência da deslignificação do efluente da indústria papelreira, devido à alta produção de lacase que este fungo apresenta, bem como a produção de xilanases (BAJPAI et al., 2006). Foi usada a lacase do *T. versicolor* para a degradação de triclosan (agente bactericida de importante uso) foi estudado, usando-se o polietileno glicol e ABTS, o que aumentou a eficiência do método enzimático (KIM; NICELL, 2006). O tratamento de benzeno e tolueno sendo que o benzeno foi totalmente removido durante 52 h de incubação e o tolueno foi totalmente removido em 36 h (DEMIR, 2004),

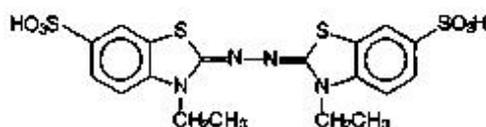


Figura 1 – Fórmula estrutural do ABTS (BOURBONNAIS et al., 1995).

O *Lentinus edodes* apresentou grande capacidade de adsorção e aumentou a produção de lacase em soluções contendo alguns metais, principalmente zinco e cobre. Em contrapartida, a produção de manganês peroxidase foi inibida em presença de íons cádmio (HATVANI; MÉCS, 2003). A descoloração do corante antraquinona (remazol brilhante laranja) foi estudada por Barbosa e Santiago (2005), o que mostrou que esse fungo teve maior eficiência em descolorir tal corante, dentre os outros seis fungos estudados, em doze dias de crescimento em meio sólido. Um efluente da indústria papelreira foi tratado por cinco fungos, inclusive o *L. edodes*, sendo que se verificou a diminuição da lignina (71%) e redução da matéria orgânica 48 %, feita por meio de DQO (WU; XIAO; YU, 2005). A biorremediação

usando esse fungo foi responsável pela redução de pentaclorofenol em solo, de acordo com Pletsch ; de Araújo e Charlwood (1999).

O *Schizophyllum commune* já foi testado para tratar efluente da indústria papelreira (BELSARE; PRASAD, 1988), tendo como principal objetivo o descoloração do mesmo. Também já foi estudado seu uso para a redução de carbono orgânico dissolvido em efluente têxtil (LEE, KASSIM, LEE, 2004). A descoloração dos corantes azo acid orange 7, acid red 18 e do corante reativo black 5 também foi estudado por Renganathan et al. (2006), demonstrando que o aumento da concentração dos corantes teve um efeito inibitório na descoloração.

O fungo *Ganoderma applanatum* já foi utilizado para tratar efluente da indústria papelreira (lignina celulose) (LANG; ELLER; ZAGRAZIL, 1997) e no tratamento de corante reativo, conforme estudos de Vaithyanathan e colaboradores (2005).

Pycnoporus sanguineus foi usado na descoloração de corantes tipo trifenilmetano, conforme estudos de Pointing e Vrijmoed (2000) e para a degradação do corante índigo, em efluente da indústria têxtil (BALAN; MONTEIRO, 2001). Estudos comparativos mostraram que as lacases produzidas por este fungo possuem menor eficiência na degradação da lignina do efluente Kraft, mesmo quando usado em conjunto com o ABTS, mostrando que a eficiência da lacase está relacionada à localização estrutural do sítio de ativação do substrato, controlando não só o potencial redox, mas também a especificidade da enzima (BOURBONNAIS et al., 1997).

O Processo enzimático vem sendo bastante estudado, cabendo às enzimas ligninolíticas (lignina peroxidase e manganês peroxidase) um papel de destaque, em função da sua capacidade para degradar um grande número de substâncias tóxicas e persistentes (FREIRE et al., 2000). A lacase (produzida por fungos) também vem ganhando importância, pois ela é uma fenoxidase, capaz de desmetilar compostos orgânicos que é um inicial e importante passo em processos de biodegradação de cadeias poliméricas, com subsequente decomposição de macromoléculas de lignina pelo rompimento de anéis aromáticos e ligações C_a - C_b em estruturas fenólicas. Em processos de oxidação de muitos compostos (principalmente de compostos fenólicos) a lacase apresenta uma grande especificidade para um grande número de compostos xenobióticos e efluentes industriais (DURAN; ESPOSITO, 2000).

A LiP é produzida por grande parte dos fungos basidiomicetos de decomposição branca, tais como *Phanerochaete chrysosporium*, *Geotrichum candidum*, *Phlebia tramellosa*, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Penicillium sp*, *Pleurotus ostreatus*,

Pycnoporus cinnabarinus, *Pycnoporus oryzae*, *Irpex Lactex* e *Bjerkandera adusta* (SANTIAGO, 1999; STOLZ, 2001; NOVOTNÝ et al., 2001). Durán e colaboradores (1997) e FERRER e colaboradores (1992) também detectaram e purificaram a LiP a partir de culturas do ascomiceto *Crhysonilia sitophila*.

As MnP são produzidas por uma série de fungos de decomposição branca com *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Panus tigrinus*, *Trametes villosa*, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* entre outros (SANTIAGO, 1999; STOLZ, 2001, NOVOTNÝ et al., 2001). Nas culturas de *Lentinus edodes*, fungo atualmente selecionado para o tratamento de efluentes, a principal peroxidase extracelular detectada foi MnP (FORRESTER et al., 1990).

O complexo lignina peroxidase produzido por *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, em função de algumas de suas características, principalmente relacionadas à baixa especificidade e conseqüentemente largo espectro de ação catalítica, vem sendo focado como um complexo enzimático de elevado potencial de emprego tecnológico na área de tratamento de resíduos industriais. Nas culturas lignolíticas, dois tipos de enzimas extracelulares são detectadas - lignina peroxidase e manganês peroxidase (TIEN; KIRK, 1984; ANDERSON et al., 1985). Estes fungos são naturalmente fortes degradadores, e mineralizam parcialmente ou completamente uma larga variedade de poluentes orgânicos recalcitrantes, tais como clorofenóis, nitrotoluenos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (BARR; AUST, 1994).

Xenobióticos que são degradados pelo *Phanerochaete chrysosporium* também incluem várias substâncias coloridas presentes em efluentes industriais tais como corantes azo, heterocíclicos, poliméricos e trifenilmetanos, que têm se mostrado susceptíveis às modificações, acompanhadas de descoloração, catalisadas pelas lignina peroxidases (KLING, 1997; KAPDAN et al., 2000 e NOVOTNÝ et al., 2001).

As lacases, outro grupo de enzimas extracelulares que apresenta ação na biodegradação de substâncias coradas (KIM; SHODA, 1999; SCHLIEPHAKE et al., 2000, SCHERER; FISCHER, 2001) e na oxidação de fenóis e anilinas (BARR; AUST, 1994; THURSTON, 1994), são produzidas pela maioria dos fungos basidiomicetos de decomposição branca, tais como *Phanerochaetes chrysosporium*, *Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Phlebia radiata*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus sp.*, *Penicillium chrysosporium*, etc. Diversos ascomicetos e alguns deuteromicetos, com *Batryospheria sp.*, *Trichoderma sp.*, também produzem lacases (GIANFREDA; XU; BOLLAG ; SHODA, 1999, SCHLIEPHAKE et al., 2000, STOLZ, 2001).

Sideróforos, definidos como ligantes específicos de Fe (III), chegando a apresentar constante de estabilidade (K_f) = 10^{30} , são amplamente produzidos por espécies aeróbicas e facultativamente por espécies anaeróbicas, onde eles desempenham a função de seqüestrar e transportar Fe (III). São quelantes de baixo peso molecular (400-2000 g.mol⁻¹), excretados sob condições de deficiência de ferro. Na variedade de microrganismos conhecidos que sintetizam sideróforos estão: bactérias entéricas, bactérias patogênicas de humanos e bactérias fixadoras de nitrogênio (espécies Gram - positivas e negativas), animais, fungos que parasitam plantas; fungos, algas verdes e azuis (cianobactérias) e algas superiores; certas espécies de plantas (fitosideróforos) e alguns tipos de leveduras (NEILANDS, 1995).

Quase todos os quelantes identificados pertencentes à função sideróforos contém pelo menos um ácido hidroxâmico, um catecol e/ou um ácido α -hidroxicarboxílico como sítios ligantes. Um aspecto comum entre estes sítios, é sua capacidade em formar anéis quelatos de cinco membros muito estáveis com Fe (III) (BENITE et al., 2002).

Os sideróforos desempenham a função de solubilizar especificamente ferro, em presença de outros íons metálicos, e incorporá-lo ao metabolismo celular. Este processo é acompanhado por quelação seletiva de Fe (III). Em termos físico-químicos isto pode ser expresso através da formação de maiores constantes de estabilidade, no complexo com Fe (III) do que com Al (III), Cu (II), Ca (II), Zn (II) e outros íons metálicos presentes no meio ambiente. A biodisponibilidade de ferro microbiano é, em grande parte, determinada pela química de coordenação associada ao sideróforo (BENITE et al., 2002).

Santiago (1999) demonstrou que não apenas as enzimas têm importante papel na degradação de poluentes, mas sideróforos podem mimetizar fenoloxidasas, ou mesmo servir como mediadores no mecanismo de oxidação dos poluentes. Tal estudo demonstrou que não somente processos enzimáticos são responsáveis por pela biotransformação, mas processos não enzimáticos podem contribuir fortemente para a biorremediação.

2.4 – Enzimas Lignolíticas

O Quadro 2 relaciona as principais características físico-químicas das enzimas manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase. Há duas maneiras já estudadas de utilização de enzimas ligninolíticas para a degradação de compostos recalcitrantes: a transformação direta de poluentes por culturas ativas de basidiomicetos ligninolíticos e o uso de enzimas extraídas do meio de cultura específico. Entretanto, a escolha da melhor estratégia irá depender dos objetivos e das condições ambientais empregadas durante o processo de tratamento biorremediativo (TRUPKIN et al., 2003).

Quadro 2 - Características das enzimas ligninolíticas (WESENERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003).

EC	MnP (1.11.1.13)	LiP (1.11.1.14)	Lacase (1.10.3.2)
	Mn (II): H ₂ O ₂ oxidoreduases	diarilpropano O ₂ , Oxidoreduases	<i>p</i> -benzenodiol O ₂ H ₂ O ₂ oxidoreduases
Grupo prostético	Heme	Heme	1Cobre tipo I, 1 Tipo II e 2 cobres pareados tipo III
MM (kDa)	32-62,5 (122)	38-47	59-110 (tetrâmeros 390)
Glicosilação	<i>N</i> -	<i>N</i> -	<i>N</i> -
Isoformas	monômeros; mono-, di-,	monômeros; acima de 11	tetrâmeros, vários acima de 15
pI	2,8-7,2	3,2-4,7	2,6-4,5
Faixa de pH	2,6-4,5	2,0-5,0	2,0-8,5
E ₀ (mV)	1510	1450	500-800
Requer H ₂ O ₂	sim	sim	não
Estabilidade	+++	+	+++
Mediadores naturais	Mn ²⁺ , Mn ³⁺	AV, 2Cl-1,4DMB	3-HAA
Especificidade	Mn ²⁺	ampla, aromáticos, fenólicos	ampla, incluindo não fenólicos
Mediadores Sintéticos	ácidos graxos insaturados e Tióis secundários	não	ABTS, HBT e seringaldazina

+ - pouco estável

+++ - muito estável

Há duas maneiras já estudadas de utilização de enzimas ligninolíticas para a degradação de compostos recalcitrantes: a transformação direta de poluentes por culturas ativas de basidiomicetos ligninolíticos e o uso de enzimas extraídas do meio de cultura específico. Entretanto, a escolha da melhor estratégia irá depender dos objetivos e das condições ambientais empregadas durante o processo de tratamento biorremediativo (TRUPKIN et al., 2003).

Entretanto, grande variedade de parâmetros de cultivo afeta a produção e a atividade das enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos como: a disponibilidade de oxigênio, fonte e concentração de carbono e nitrogênio, microelementos, pH e temperatura (VAN DER MERWE, 2002). Tal característica mostra que meios de culturas tem grande influência no processo de biorremediação e o uso de inibidores também podem vir a ser um ponto importante no processo de tratamento de poluentes (ALVES, 2006).

2.4.1-Lacase

Lacases são proteínas globulares contendo entre 10-25% de carboidrato *N*-ligado e elas podem ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, produzidas principalmente por basidiomicetos de degradação branca, mas são também detectadas em fungos de degradação parda e em fungos de degradação mole (DURÁN; ESPOSITO, 1997). As massas molares estão na região de 60-100 kDa. As lacases catalisam oxidação por extração de um elétron de um substrato fenólico gerando um radical fenoxila. (HIGUCHI, 1990).

Por causa da capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, lacases fúngicas vem ganhando atenção para o uso em várias aplicações industriais como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químico-medicinais e remediação de solos e águas contaminadas. Pesquisas recentes têm sido intensas e muito tem sido elucidado sobre a diversidade de lacases e suas utilidades (SCHNEIDER et al., 1999, DURÁN et al., 2002, MAYER; STAPLES, 2002).

Lacases são membros da família de proteínas multi-cobres, que incluem ascorbato oxidase, ceruloplasmina e bilirrubina oxidases. A expressão de genes que codificam a síntese dessa enzima indica que ela pode ser constitutiva ou indutiva. Portanto, em diferentes fungos, a produção da lacase pode ser incrementada sob condições de cultura apropriadas (KLONOWSKA et al. 2002; MAYER; STAPLES, 2002; CLAUS, 2004). Geralmente, a enzima origina-se no citoplasma, mas muitos exemplos de secreção têm sido descritos na literatura, entretanto, pouca atenção tem sido dada a localização sub-celular desta enzima e ao mecanismo de secreção (MAYER; STAPLES, 2002). A produção de lacase é afetada por muitos fatores durante o seu desenvolvimento do fungo, como a composição do meio de cultura (relação C/N), pH, temperatura, taxa de aeração, etc. (KAHRAMAN; GURDAL, 2002).

Por muitos anos, a visão convencional foi a de que *P. chrysosporium* produzia unicamente LiP e MnP. Entretanto, tem sido determinada baixa atividade de lacase produzida por *P. chrysosporium* sob condições de cultivo com altas concentrações de nitrogênio e cobre, o uso de celulose ao invés de glicose como fonte de carbono e o crescimento em cultivo semi-sólido. Entretanto, tem sido sugerido que a identificação de lacase baseada na oxidação do ABTS pode ser um artefato técnico causado por Mn^{3+} presente nas culturas de *P. chrysosporium* (LARRONDO et al., 2003).

Um modelo do ciclo catalítico de lacases, consistente com os dados disponíveis sobre a dinâmica e O espectroscopia da enzima foi proposto (Figura 2). A maior dúvida permanece na parte redutiva do ciclo, onde o mecanismo do agrupamento trinuclear é reduzido. Começando do estado nativo da enzima, uma molécula de substrato reduz o sítio T1. A partir deste ponto, dois mecanismos diferentes podem proceder: (A) o sítio T1 transfere seus elétrons ao sítio T2 e o sítio T1 é reduzido novamente por uma segunda molécula de substrato; os sítios T1 e T2 transferem seus elétrons aos sítios T3. O sítio T1 é reduzido por uma terceira molécula de substrato e um elétron é outra vez transferido ao sítio T2. Este processo re-oxida o sítio T1, que é então reduzido por uma quarta molécula de substrato. Como resultado, uma forma completamente reduzida da enzima é obtida; (B) o agrupamento trinuclear é seqüencialmente reduzido durante três passos de transferência de elétrons do sítio T1, que é seqüencialmente reduzido por uma molécula de substrato, finalizando no mesmo estado reduzido da enzima (TORRES; BUSTOS-JAIMES; BORGNE, 2003).

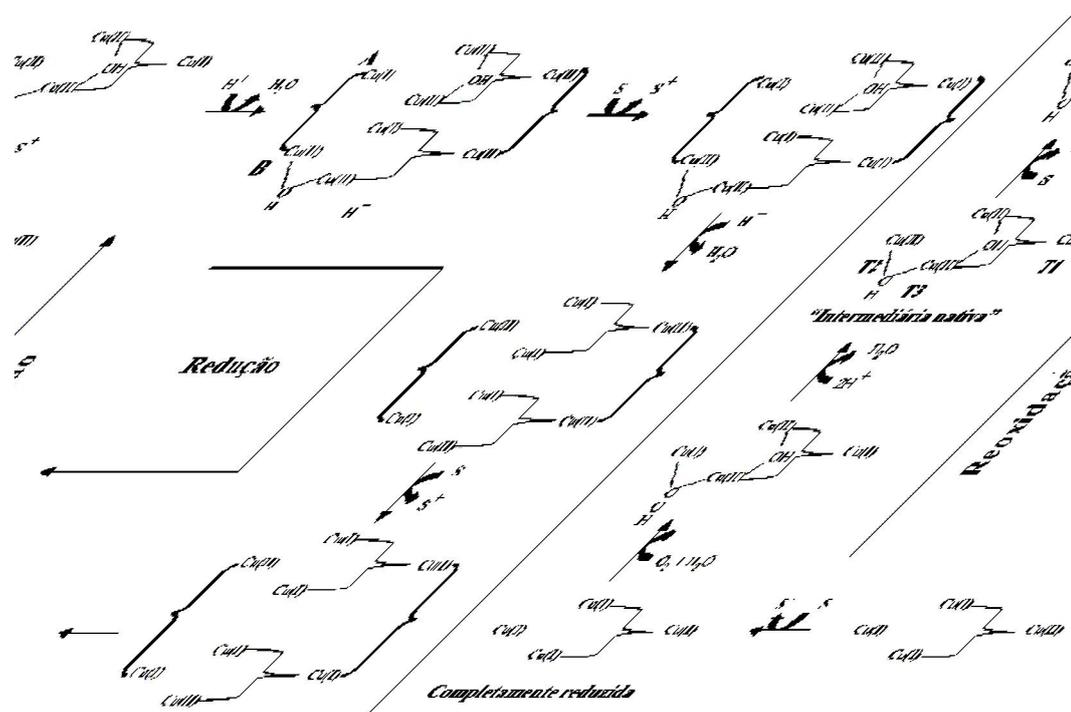


Figura 2 - Ciclo catalítico da lacase (TORRES; BUSTOS-JAIMES; BORGNE, 2003).

A lacase, como uma oxidase multicobre (p-difenil: dioxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2), catalisa uma redução de quatro elétrons de dioxigênio a água. Lacase contém quatro átomos de Cobre os quais tem sido classificados de acordo com seu aspecto no EPR: Tipo 1 ou azul, tipo 2 ou normal e tipo 3 ou sítio de acoplamento de cobre binuclear onde os cobres estão antiferromagneticamente acoplados por meio de uma ponte de ligação (não detectado por EPR) (SUNDARAN et al. 1997). O espectroscopia combinada com cristalografia e

dicroísmo circular magnético e raios-X têm dado uma descrição detalhada do sítio ativo da lacase (COLE et al. 1990; SUNDARAN et al., 1997).

A produção de lacases depende das condições da cultura de um microrganismo e podem ser produzidas em forma constitutiva ou induzida, extra ou intracelularmente, sendo que as formas induzidas em geral possuem maior atividade (BUSWELL; CAI; CHANG,1995). A indução por adição de xilidina ao meio de cultura, fez com que o fungo *Trametes versicolor* produzisse 3 isoenzimas que continham 30 aminoácidos que alteravam a constituição da enzima, mas com trocas deles no sequenciamento da enzima (BOURBONNAIS et al., 1995). Outra consideração a ser feita é que a adição de mediadores, como o ABTS, também é responsável pela taxa igualitária da atividade enzimática das duas principais isoenzimas (BOURBONNAIS et al., 1995). A lacase é responsável por 55% da oxidação da lignina presente no efluente da indústria papelreira, o que faz com que o estudo dessa enzima tão importante no processo de biorremediação. (BOURBONNAIS et al., 1997)

A especificidade pelos substratos varia, dependendo da origem da lacase; assim, lacases de diferentes fungos oxidam diferentes substratos, com diferentes velocidades de reação. Através da preferência pelo substrato é difícil diferenciar entre as lacases e as tirosinases (monofenol monooxigenases), pertencentes também ao grupo das fenoloxidasas cúpricas. Entre os substratos doadores de elétrons para lacases encontram-se polifenóis, fenóis metóxi-substituídos (mono e di-), diaminas e uma série de outros substratos, porém tirosina, substrato de tirosinase, não é oxidada por estas enzimas (REINHAMMAR, 1984; THURSTON, 1994).

Dong e colaboradores (2005) demonstraram que o a fonte de nitrogênio orgânico é um importante incrementador da produção de lacase, bem como o tipo de incubação (estático ou agitado) influenciam no gene de expressão dessa enzima.

Shin (2004) detectou lacase produzida por *Irpex lacteus*, que descoloriu em 93% efluente da indústria têxtil, após oito dias de tratamento, bem como demonstrou que ele obteve melhores resultados quando se usou meio de cultura sólido. López e colaboradores (2004) utilizaram reatores com membranas para imobilizar o fungo e enzimas, no tratamento e descoloração de compostos recalcitrantes presentes em efluente têxtil. Abdulla e colaboradores (2000) trataram corantes tipo antraquinona usando a lacase de *Trametes hirsuta* imobilizada em alumina e Notaram que a degradação do corante depende do tipo de substituinte da hidroxila.

Unal e Kolankaya (2001) usaram o *Trametes versicolor* para a descoloração de efluente da indústria, sendo que a produção de lacase foi induzida pela adição de xilidina ao

efluente. O uso de mediadores, principalmente ABTS, também tem grande valor na degradação da lignina, mas também outros mediadores como a acetovanilona (AV) e aceto seringona (AS) podem aumentar a capacidade de degradação lignolítica (CHO et al., 2004).

Embora o uso de mediadores de lacase aumente a eficiência da degradação de contaminantes orgânicos, a toxicidade e alto valor de mediadores tipo ABTS e HBT são um empecilho para o uso em grande escala, sendo que os mediadores naturais, como a metioninona e a cisteína, são mais indicados na melhoria do processo degradativo (JOHANNES; MAJCHERZYK, 2000).

A produção de lacase usando a xilidina como indutor foi estudada por Garcia; Santiago e Ulhoa (2006), que demonstrou que a síntese enzimática de lacase de *P. sanguineus* era correlata à síntese de cinabarina e que a indução aumenta em nove vezes, comparado a culturas sem indutores.

Freire; Duran e Kubota (2002) desenvolveram um sensor amperométrico para detecção de fenol presente em soluções, baseado na imobilização da lacase, o que pode ser aplicado no controle da poluição deste poluente.

2.4.2 - Lignina Peroxidase

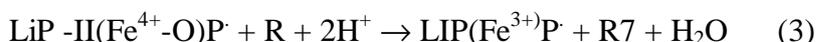
A evolução da síntese enzimática e a secreção de proteínas vêm sendo observadas ao longo da evolução, ocorrendo em leveduras e outros eucariontes, assim como em fungos filamentosos. Durante a evolução de fungos degradadores de lignina, a LiP pode ter sido sintetizada com função de diminuir a toxicidade no meio intracelular, promovendo reações de desaminação de produtos de ácidos aminoaromáticos, posteriormente o mecanismo extracelular, com a presença de LiP, possibilitou a degradação da lignina (RABINOVICH; BOLOBOVA; VASILCHENKO, 2004).

LiP foi descoberta em 1984, em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* (TIEN ; KIRK, 1984). Essas enzimas são os maiores componentes do sistema envolvido na degradação de lignina por este organismo. Desde sua descoberta, LiP tem sido caracterizada molecular e bioquimicamente (JOHJIMA et al., 1999; SUGIURA; HIRAI ; NISHIDA et al., 2003).

Durante o processo de degradação Lignolítica, a LiP é inicialmente oxidada pelo H_2O_2 e oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais aniônicos. Eles reagem reinvadindo com nucleófilos (primariamente H_2O) e com oxigênio molecular, gerando uma “combustão enzimática“ onde ligações C-C e C-O são quebradas, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos. Esta enzima é uma

glicoproteína que contém Fe protoporfirínico IX como grupo prostético e é dependente de H_2O_2 para sua atividade (KIRK et al., 1978).

A lignina peroxidase é uma enzima extracelular, importante no processo degradativo da lignina, que se apresenta como o mais abundante composto polimérico aromático na terra. LiP é uma glicoproteína com massa molecular de 41 kDa, que contém 1 mol de ferro protoporfirina IX por mol de enzima. A LiP catalisa o peróxido de hidrogênio no processo oxidativo multipasso, como se segue:



No esquema acima, R é o substrato e P o porfirina. O composto LiP-I carrega os oxidante duplo do peróxido, um como o centro oxiferril ($Fe^{4+}O$) e o outro como o porfirina π cátion radical (P), com a conseqüente reação não-enzimática (EDWARDS et al., 1993).

No ciclo catalítico (Figura 3), o Fe contido no grupo heme da LiP, passa por estados de óxi-redução (MARTÍNEZ 2002).

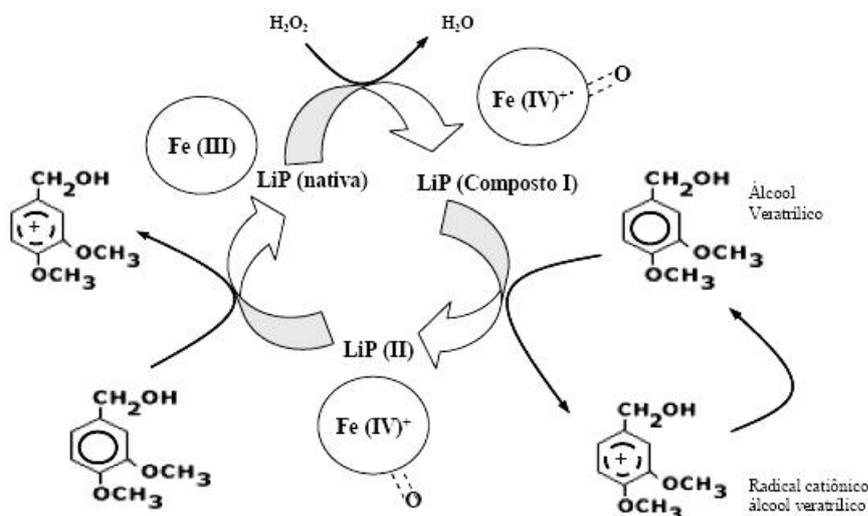


Figura 3 - Ciclo catalítico da lignina peroxidase (MARTINEZ, 2002).

O primeiro passo compreende a oxidação do Fe (III) da enzima nativa para Fe (IV), pela ação do H_2O_2 , gerando o composto I, tipo radical catiônico da LiP. Pela redução do composto I, por transferência de um elétron, é formado o composto II, que ainda contém Fe (IV). O agente redutor pode ser um substrato como o álcool veratrílico ou o H_2O_2 . Finalmente, uma etapa de redução por um elétron retorna a enzima a seu estado nativo,

completando o ciclo catalítico. Na ausência do substrato redutor o composto II é oxidado pelo H_2O_2 para o composto III, uma forma da LiP com limitada capacidade catalítica, que com excesso de H_2O_2 é rapidamente inativada (MARTÍNEZ 2002).

2.4.3 - A Manganês peroxidase

Inicialmente, a MnP (manganês peroxidase) foi descoberta do fungo *Phanerochaete chrysosporium*, mas estudos demonstraram que os fungos *Dichomitus squalens*, *Stereum hirsutum*, *Lentinus edodes*, *Rigidoporus lignosus* também produzem a MnP juntamente com a lacase e que ambos mostraram eficiência no branqueamento na lignina kraft (PAICE et al., 1992). Estudos mostraram que a lacases do *Trametes versicolor* na presença de certos fenóis, podem reduzir o Mn^{3+} a Mn^{2+} e o sistema MnP-Mn (III) pode se um oxidante mais importante que a lacase, como verificado na oxidação de vários metoxibenzenos. O sinergismo entre a lacase e o MnP apresenta melhores resultados que o uso somente da lacase e a presença de quelatos e peróxido de hidrogênio de origem fúngica gerados na presença da polpa de madeiras, tem também um papel importante na desmetilação lignínica, embora a presença da H_2O_2 pode ser um fator de inibição da atividade enzimática (PAICE et al., 1992).

A síntese de manganês peroxidase (ou peroxidase dependente do manganês) é possivelmente limitada a certos fungos basidiomicetos, e até então não se evidenciou em qualquer bactéria, levedura e nenhum basidiomiceto micorrízico. A capacidade de produção de MnP está distribuída entre grupos de basidiomicetos distintos taxonomicamente. Algumas espécies colonizadoras de madeira, pertencente às famílias Meruliaceae, Coriolaceae e Polyporaceae, assim como basidiomicetos decompositores de serapilheira, das famílias Strophariaceae (família de *Psilocybe castanella*) e Tricholomataceae expressam atividade de MnP. O peso molecular de MnP varia de 38 à 62,5 kDa, mas a maioria das enzimas purificadas têm peso molecular próximo à 45 kDa (HOFRICHTER, 2002). Isoenzimas de MnP são freqüentemente produzidas e até 11 isoformas diferentes foram descritas para *Ceriporiopsis subvermispora*. Essas isoformas diferiram principalmente nos pontos isoelétricos (pI), que estiveram na faixa ácida (pH 3-4), embora isoformas na faixa neutra e menos ácida foram encontradas em determinados fungos (LOBOS et al., 1994).

A MnP é uma glicoproteína com Fe protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de H_2O_2 para sua atividade. A oxidação de lignina e outros compostos xenobióticos por MnP é dependente da disponibilidade de íons de manganês (BROWN et al.

1991). Seu ciclo catalítico é semelhante ao de LiP; no entanto, o Mn^{2+} atua como doador de elétrons para gerar o composto II (HOFRICHTER, 2002).

A enzima manganês peroxidase é a única heme peroxidase capaz de catalisar a reação de um elétron do Mn^{2+} a Mn^{3+} , como mostra a reação:



A enzima gerada pelo Mn^{3+} é complexada como o ácido etanóico com o oxalato, que também é secretado por fungos. O complexo orgânico com o Mn^{3+} complexado com o ácido oxida o substrato fenólico, incluindo os composto lignínicos e os mediadores (SUNDARAMOORTHY et al., 1997).

O ciclo catalítico da MnP é iniciado pela ligação de H_2O_2 ou um outro peróxido orgânico ao ferro nativo da enzima, formando um complexo ferro-peróxido (Figura 4). A quebra subsequente da ligação O-O do peróxido requer a transferência de 2 elétrons do grupo heme da enzima, que resulta na formação de um radical complexo Fe^{4+} -oxo-porfirina (MnP-I). Com a quebra da ligação dos oxigênios, uma molécula de água é liberada. Uma redução seguinte acontece formando o complexo MnP-II (Fe^{4+} -oxo-porfirina não radicalar). Um íon Mn^{2+} age como doador de 1 elétron para esse complexo intermediário e é oxidado à Mn^{3+} . A redução da MnP-II acontece de maneira similar e outro Mn^{3+} é formado de um Mn^{2+} , levando assim à geração da forma original da enzima, liberando uma segunda molécula de água. Ao passo que o MnP-I se comporta como LiP e como a peroxidase de raiz forte (horsehadish) e pode, junto do íon Mn^{2+} , ser reduzido por outros doadores de elétrons, o MnP-II é pouco reduzido por outros substratos e requer exclusivamente Mn^{2+} para completar o ciclo catalítico (HOFRICHTER, 2002). Mn^{3+} formado é estabilizado por ácidos orgânicos, tais como ácido oxálico e age como um agente oxi-redutor difuso, de baixo peso molecular, que ataca moléculas orgânicas inespecificamente pela subtração de um elétron (GOLD; ALIC, 1993). Devido a inespecificidade do Mn^{3+} , o sistema MnP é eficiente para oxidação de vários poluentes orgânicos.

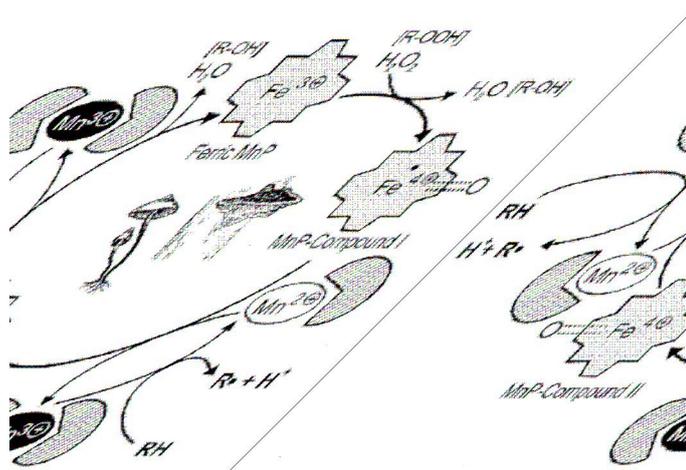


Figura 4 - Ciclo catalítico da manganês peroxidase (HOFRICHTER, 2002).

2.5 – Processo de Fotocatálise heterogênea

A fotocatalíse heterogênea tem sua origem na década de setenta quando pesquisas em células fotoeletroquímicas começaram a serem desenvolvidas com o objetivo de produção de combustíveis a partir de materiais baratos, visando à transformação da energia solar em química. Em 1972, um trabalho de Fujishima e Honda (FUJISHIMA; HONDA, 1972, citado por KUNZ, 2002) descreveu a oxidação da água em suspensão de TiO_2 irradiado em uma célula fotoeletroquímica, gerando hidrogênio e oxigênio. A partir desta época, muitas pesquisas foram dedicadas ao entendimento de processos fotocatalíticos envolvendo a oxidação da água e íons inorgânicos.

A fotocatalíse heterogênea (que também pertence ao POA-Processos Oxidativo Avançados) tem mostrado grande eficiência no tratamento águas residuárias, promovendo a descoloração de efluentes e a descontaminação ambiental (PERALTA-ZAMORA et al., 1998; PERALTA-ZAMORA et al., 1999). Apesar dos tratamentos biológicos convencionais serem ineficientes para remover a cor de efluente industriais (GARG; MODI, 1999), a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) tem examinado a possibilidade de incluir em sua regulamentação a redução da cor para garantir uma melhor qualidade dos efluentes descartados (KUNZ, 2002). O processo fotocatalítico heterogêneo é uma tecnologia que ganha força com as novas legislações. O processo é baseado na irradiação (fonte de luz ultravioleta) de semicondutores inorgânicos (mais comumente o TiO_2 por apresentar baixo custo). A energia do fóton é capaz de provocar a transição eletrônica de elétrons da banda de valência para a banda de condução do semicondutor, gerando sítios oxidantes e redutores capazes de catalisar reações químicas, oxidando compostos orgânicos a CO_2 e H_2O e reduzindo metais ou substâncias presentes nas moléculas dos poluentes. O uso de luz solar como fonte de radiação

também vem sendo amplamente estudada pelo fato do TiO_2 apresentar foto-atividade na luz visível. Outros fatores favoráveis ao emprego do TiO_2 são a baixa toxicidade e a elevada estabilidade em uma ampla faixa de pH (NOGUEIRA ; JARDIM, 1998)

Conforme representado na Figura 5, quando um semiconductor é exposto à luz ultravioleta, este é promovido a um estado eletronicamente excitado que se caracteriza pela geração de um par elétron-lacuna (e^- , h^+). As características oxidantes do radical hidroxila gerado por reação da lacuna (equação 1), e o caráter fortemente oxidante da própria lacuna, fazem com que as moléculas orgânicas adsorvidas na superfície da partícula do catalisador possam ser oxidadas até completa mineralização, por meio de um processo bastante viável (KUNZ, 2002). Veja equações elétron-lacuna:

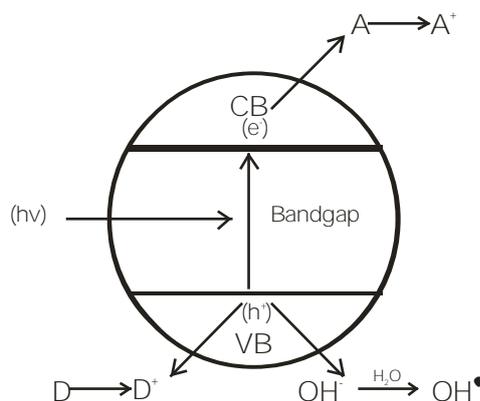
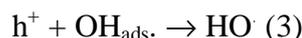
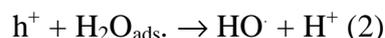
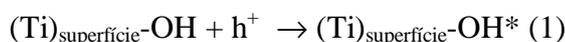


Figura 5-Representação esquemática dos princípios da fotocatalise heterogenea (A: Espécies aceptora, B: Espécies doadoras) (KUNZ, 2002).

Embora a elevada eficiência da fotocatalise heterogenea permita uma rápida mineralização de inúmeras espécies químicas de relevância ambiental, existem vários inconvenientes de ordem prática que tem dificultado bastante a sua consolidação como alternativa de tratamento em grande escala. Dentre as mais importantes limitações contam-se:

(1) Necessidade de fontes artificiais de radiação, uma vez que grande parte dos fotocatalisadores apresenta um “*band gap*” correspondente à região ultravioleta; (2) - Dificuldades na penetração da radiação no meio de reação e dificuldades na separação dos fotocatalisadores, uma vez que estes são utilizados na forma de finas suspensões e (3) -

Dificuldades na implementação de sistemas contínuos em grande escala, principalmente em função dos inconvenientes anteriores (KUNZ, 2002).

Uma grande variedade de classes de compostos orgânicos tóxicos é passível de degradação por fotocatalise heterogênea. Na maior parte, a fotodegradação leva à total mineralização dos poluentes gerando CO_2 , H_2O e íons do heteroátomo presente. Algumas classes de compostos passíveis de degradação por fotocatalise são alcanos, cloroalifáticos, álcoois, ácidos carboxílicos, fenóis, clorofenóis, herbicidas, surfactantes (neologismo para agente tensoativo, é qualquer composto que modifica a tensão superficial, quando dissolvido em água ou em soluções aquosas, e que altera, de maneira análoga, a tensão superficial de dois líquidos) e corantes. (NOGUEIRA; JARDIM, 1998).

Experimentos realizados por Assalin et al. (1999), mostraram que o processo fotocatalítico heterogêneo e a fotólise são bastante eficientes na desinfecção de águas, sendo possível desinfetarem águas com altos teores de coliformes fecais (da ordem de 107 NMP/100mL). Devido à capacidade de desinfetar águas com elevado teor de coliformes fecais, ambos os processos podem ser aplicados na desinfecção de águas residuárias, além de águas de abastecimento, desde que observadas as suas características de qualidade. A fotocatalise heterogênea é significativamente mais eficiente que a fotólise para menores tempos de detenção no processo de desinfecção. A fotocatalise heterogênea é um processo bastante promissor como nova tecnologia de desinfecção de águas de abastecimento. De acordo com Morais, Sirtori e Peralta-Zamora (2006) o processo fotocatalítico é viável como sistema de pré-tratamento de amostras de chorume, visando aumentar sua biodegradabilidade aeróbia.

Estudos com fotocatalise heterogênea com o catalisador disperso e a fonte de radiação UV proveniente de iluminação artificial, já foram realizados para tratamento de chorume, com posterior tratamento biológico (lodo ativado) em escala laboratorial, o que permitiu um aumento da biodegradabilidade do mesmo, facilitando o tratamento biológico (MORAIS, SIRTORI, PERALTA-ZAMORA, 2006). Ferreira e Daniel (2004) estudaram o uso do TiO_2 para o tratamento de esgoto biotratado, sendo que se utilizou como fonte de radiação UV a luz solar e o catalisador estava imobilizado em placa de vidro. A degradação de efluentes da indústria têxtil já foi estudada utilizando a fotocatalise com empregando TiO_2 e Nb_2O_5 sob radiação visível de fonte artificial, o que pode garantir um uso industrial dessa tecnologia (SANTANA, MACHADO, 2002). Alguns estudos sobre inativação de microrganismos mostraram que a fotoinativação pode vir a representar um importante método de desinfecção, como estudado por Cordeiro, Leite e Dezotti (2004), em que se utilizou a

Escherichia coli e *Pseudomonas sp.* Como indicadores de eficiência de inativação bacteriana. Técnicas de fotocatalise eletroquimicamente assistida para tratamento de efluentes, em que o catalisador é imobilizado sobre eletrodos e aplica-se um diferencial de tensão, tentando assim diminuir o retorno do elétron durante o *band gap* foi estudado por Tauchert e Peralta-Zamorra (2005), He et al. (2003) e Jiang et al. (2004).

2.6-Espectrometria de massas

2.6.1-Espectrometria UV-vis

A absorção molecular tipo transição eletrônica acontece quando um feixe de radiação atravessa sólido, líquido ou gás, o que promove os elétrons a estados mais excitados de energia, quer seja em temperatura ambiente ou em estado fundamental. Para que haja absorção dessa radiação, a energia do fóton de excitação deve ser igual à diferença de energia entre o excitado fundamental e o estado excitado, contudo, essa energia é característica de cada constituinte de uma amostra, sendo possível expressar a absorção dessa radiação pelo comprimento de onda da radiação emitida. O espectroscopia de absorção UV-Vis envolve a radiação de 180 a 780 nm, em que um elétron é excitado a um estado de maior energia. O espectro é obtido por meio da passagem de radiação através de uma solução e o espectro de absorção é dado pela razão da intensidade da radiação e pela referência (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Espectros de UV-Vis tem amplo emprego, como na gemologia em que se utilizou o intervalo de 300 a 700 nm para mostrar a inclusão de ferro e titânio em amostras de rubi e safiras (LICCARDO; OLIVEIRA; JORDT-EVANGELISTA, 2005). A metodologia de acompanhamento de variação de cor de efluente, com espectro no intervalo de UV-Vis já foi usado para caracterizar efluente de laticínios (MENDES; PEREIRA; CASTRO, 2006), de indústria de polpa de celulose (TONDO et al., 1998). O espectro no UV-Vis também foi usado para verificação de metais em efluente industrial de beneficiamento de coco (CRESPILHO; SANTANA; REZENDE, 2004), efluente da indústria têxtil (SANTANA; MACHADO, 2002), HASSEMER; SENS (2002), PASCHOAL; TREMISIOLHI-FILHO (2005).

2.6.2-Espectrometria de massas

Em 1912, J. J. Thompson demonstrou que era possível separar moléculas na fase gasosa por diferenças de massa e carga, que é o princípio de funcionamento dos espectrômetros de massa (COLNAGO, ALMEIDA, VALENTE, 2002).

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molar de compostos eletricamente carregados, ou íons previamente formados (COLE, 1997). Estes íons são selecionados de acordo com a razão massa-carga (m/z), sendo m a massa em unidades (massa atômica unificada), definida como 1/12 da massa de um átomo do isótopo de ^{12}C , o qual foi designado como 12 u por convenção (GROSS, 2004). Existem vários tipos de espectrômetros de massa, mas o que é comum a todos eles é que eles são formados por um ionizador, um separador (na verdade, um filtro para a relação de massa-carga) e um detector (MORAES; LAGO, 2003). Essa técnica apresenta alta sensibilidade para detecção de substâncias em baixas concentrações, como o *doping*, controle de alimentos, contaminação ambiental, entre outras (COLNAGO, ALMEIDA, VALENTE, 2002).

Um dos principais problemas encontrados para se aplicar essa metodologia para a detecção e quantificação de compostos orgânicos de alto peso molecular (como as proteínas) é que o método de ionização clássico, além de retirar um elétron, fornecia energia suficiente para a fragmentação da molécula, inviabilizando o seu uso para biomoléculas. O tipo de ionização chamado de *Eletron Ionization* (EI) foi praticamente o primeiro método de ionização, mas devidos aos problemas apresentados, ele não possibilitava o seu amplo uso (MARQUES, 2006).

Um método chamado de “*eletrospray*” veio a implementar a ionização de compostos de alto peso molecular, como descreve Conalgo; Almeida e Valente (2002):

“... que consiste em submeter a amostra a um fluxo em uma pequena agulha em um compartimento contendo nitrogênio seco. A diferença de potencial entre a agulha e as paredes do compartimento é de quilo volts; assim, entre a saída da agulha e o compartimento há um enorme campo elétrico. Conseqüentemente, a gotícula de solução de amostra que sai dessa agulha é dispersa no compartimento como um *spray* de microgotas eletricamente carregadas, que, direcionadas pelo campo, seguem em direção à parede do compartimento. Devido à geometria desse compartimento, essas microgotas se dirigem a um compartimento a vácuo, o espectrômetro de massa em si. O campo elétrico é forte o suficiente para extrair íons isolados das microgotas. O tempo que cada íon leva para atingir o detector depende das suas massa molecular (m) e carga (z), sendo proporcional à razão m/z ; portanto, é possível determinar a massa molecular do composto.”

Quando se usa o método do *eletrospray* no modo positivo, a amostra é acidificada, para formar compostos protonados e seus respectivos contra-ânions (MARQUES, 2006).

Ternes, Bornez e Schmidt (2001) fez uma revisão de todos os métodos analíticos utilizados na determinação de vários fármacos residuais, a níveis de ng. L^{-1} , em diferentes

matrizes aquosas. Para detecção de fármacos residuais em ambiente aquático na faixa de $\mu\text{g/L}$ e ng/L , os métodos descritos na literatura são baseados na extração em fase sólida, em alguns casos derivatização da substância ácida e subsequente determinação do derivado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) ou cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM). A detecção por espectrometria de massas é usada para assegurar a identificação das substâncias estudadas.

O espectrometria de massa já foi usada como ferramenta na avaliação de degradação de compostos de efluentes de indústria Cítrica (PONEZI et al., 2005) e o impacto dos compostos sobre a população microbiana do lodo ativado. O acompanhamento da existência de beta-estradiol e seus metabólitos foram acompanhados em uma estação de tratamento de esgoto no Canadá, conforme relato de Lee e Peart (1998). A Detecção de fármacos em águas superficiais também foi estudada por Hilton e Thomas (2003). Nos esportes, o uso do espectrometria de massa acoplada à cromatografia de líquida mostrou que essa metodologia é sensível e de grande utilidade na detecção de *doping*, como os andrógenos (NIELEN et al., 2006). A determinação de compostos alquil-fluoretados em esgotos domésticos também foi estudado usando O espectrometria de massa e eletrospray, acoplado à cromatografia líquida de fase reversa (SCHULTZ, BAROFSKY, FIELD, 2006). A biotransformação do triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenóxi) fenol) contido em efluente doméstico por tratamento de lodo ativado mostrou-se de menor eficiência que em estudos anteriores e mostrou também que o uso do lodo excedente usado para adubar plantações aumenta a contaminação ambiental deste agente antimicrobiano. A técnica usada para detecção deste contaminante foi espectrometria de massa com eletrospray, acoplado à cromatografia líquida (HEIDLER; HALDEN, 2006).

2.7-Ensaio de toxicidade usando *Artemia salina*

Teste de toxicidade aquática é um procedimento no qual as respostas de organismos aquáticos são usadas para detectar ou medir a presença ou efeito de uma ou mais substâncias, resíduos, ou fatores ambientais, isolados ou em combinação (CARDOSO; LUCA, 2003).

O ensaio de toxicidade com *Artemia salina* é utilizado em diferentes experimentos comparando a mortalidade dos microcústáceos de água salgada com a substância em teste e o seu controle. Funcionando como uma triagem acerca do potencial de toxicidade da substância em investigação, uma vez que se calcula a toxidade aguda (concentração letal média – CL_{50})

da mesma, por meio das médias aritméticas das repetições e a regressão linear não ponderada (MCLAUGHLIN; COLMAN-SAZARBITORIA; ANDERSON, 1995).

Artemia salina é um micro-crustáceo marinho característico de regiões lacustres de água salgada. Estes bioindicadores apresentam uma grande capacidade de adaptações como a variação de salinidade (igual ou maior que 5 g.kg⁻¹). Os náuplios da *Artemia salina* são utilizados internacionalmente em testes de toxicidade por apresentarem características significativas como: grande potencial de fertilidade na vida adulta, facilidade de aquisição e manutenção, os cistos apresentam grande capacidade de eclosão, bem como facilidade de repetibilidade experimental (FEEMA, 1993a, 1993b).

Essa metodologia já foi usada para avaliar a toxicidade de percolado de aterro sanitário (SILVA, 2002), de um efluente tratado biologicamente com o auxílio de carvão ativado em pó (COSTA et al., 2007). Efluente da indústria coureira tratado com processo de Fenton e Foto-Fenton teve a toxicidade avaliada por essa metodologia (DANTAS; JOSÉ; MOREIRA, 2003).

A avaliação de toxicidade de produtos como flavonóides (MOREIRA et al., 2003), triazina (CAVALCANTE et al., 2000). Extratos biotativos também tiveram a toxicidade estudada usando *A. salina* como indicador: *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa* (STEFANELLO et al., 2006), *Unonopsis lindmanii* (SIQUEIRA et al., 1998), *Cynara scolymus* L. (NOLDIN et al., 2003), de raiz e talos de folhas de açáí (*Euterpe precatoria* Mart., *Arecaceae*)(GALOTA; BOAVENTURA, 2005). Estudos com extratos etanólicos das plantas *Costus pisonis*, *Cymbopogon nardus*, *Eclipta alba*, *Eleutherine bulbosa*, *Erigerium foetidum*, *Euphorbia tirucalli*, *Mikania hirsutissima*, *Momordica charantia*, *Solidago microglossa* e *Plectranthus ornatus* apresentaram toxicidade para náuplios de *Artemia salina* (BRASILEIRO et al., 2006).

3-OBJETIVOS GERAIS

- Viabilizar o uso de microrganismos e estratégias para minimizar o impacto ambiental pelo resíduo gerado pela indústria farmacêutica;
- Estudar a eficiência do método de tratamento biológico com fungos e fotocatalítico para o tratamento do referido efluente, para avaliar a possibilidade de tratabilidade por essas metodologias;
- Estudar o uso combinado das duas metodologias supra citadas, observando-se quais arranjos apresentam melhor performance no processo de mineralização dos resíduos;
- Avaliar a toxicidade do efluente *in natura* e tratado, usando-se a metodologia de *Artemia Salina*, a fim de se certificar da viabilidade ambiental dos processos de tratamento.

4-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efluente original e após o tratamento, de uma indústria farmacêutica, quanto a sua toxicidade, parâmetros biológicos e químicos (DBO, DQO, pH, análise de cor, turbidez, dureza, alcalinidade, acidez) e composição química (nitrogênio, fósforo, ferro, manganês, fenóis)
- Determinar a atividade das seguintes enzimas: lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, bem como a cinética química das reações;
- Avaliar e propor o uso de ensaios de citotoxicidade para tratamentos de efluentes industriais, especificamente ao efluente da indústria farmacêutica;
- Avaliar a mineralização dos contaminantes orgânicos, diminuindo a DQO (Demanda Química de Oxigênio), a toxicidade e a DBO (Demanda Biológica de Oxigênio);

5-METODOLOGIA

5.1-Coleta de Efluente

Foram coletadas cinco amostras de 20,0 L cada em amostragem do efluente provenientes da indústria farmacêutica e mantidas a 4° C (SANTIAGO, 1999). O efluente era proveniente da área de produção de medicamentos de uma indústria farmacêutica da região de Goiânia, GO. As amostras coletadas foram referentes ao efluente da área industrial da empresa, sendo que todas as amostras foram coletadas em uma caixa de inspeção localizada antes da entrada na estação de tratamento de efluente da indústria. O sistema de tratamento que a indústria utiliza é o lodo ativado, sendo que o efluente industrial e o efluente doméstico é misturado no tanque de equalização (para correção de pH), seguindo-se o processo de tratamento convencional.

O Quadro 3 mostra as datas e horários das coletas, o volume coletado, bem como os produtos que estavam sendo fabricados no período de 2 horas antes de cada coleta, a fim de se ter uma possível composição do efluente. As amostras foram conservadas refrigeradas por no máximo 3 meses, sendo que para a análise da DBO, tal procedimento foi realizado no mesmo dia da coleta. De acordo com a gerência da fábrica, não há mistura de esgoto pluvial no sistema

Quadro 3- Detalhes sobre a coleta das amostras

Amostra	Data da coleta	Horário da coleta	Volume coletado	Produtos fabricados 2 h antes das coletas
1	22/11/2005	9:00 h	20,0 L	Injetáveis, soros, antibióticos, xaropes.
2	15/01/2006	9:00	20,0 L	Xaropes, antifúngicos, antibióticos, xaropes, injetáveis.
3	13/04/2006	15:00 h	20,0 L	Xaropes, antifúngicos, antibióticos, xaropes, injetáveis.
4	12/07/2006	14:00 h	20,0 L	Xaropes, antifúngicos, antibióticos, xaropes, injetáveis.
5	09/12/2006	10:00 h	20,0 L	Xaropes, injetáveis, antibióticos, soro fisiológico

5.2-Microrganismos

Os fungos *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Phanerochaetes chrysosporium*, *Schizophyllum commune* e *Ganoderma*

applanatum. Os cinco primeiros fungos foram cedidos pela Fundação Tropical André Tosello (Campinas, SP) e os 2 últimos pelo IBAMA (Brasília, DF). Foram mantidos em meio de extrato de malte 2% (P/V) a 4°C. Os fungos em estudo fazem parte da coleção de microrganismos utilizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

5.3.-Meio de Cultura Usados

5.3.1-Meio agar batata (BGA):

- 50 mL de caldo de batata
- 5,000 g de glicose
- 3,750 g de agar
- água destilada completada para 250 mL

5.3.2-Meio Agar batata e efluente:

- 50 ml de caldo de batata
- 5,000 g de glicose
- 3,750 g de agar
- efluente completado para 250 mL

5.3.1 -Condições de crescimento da cultura

O meio sólido foi colocado em placas de petri (10 cm de diâmetro) contendo 15,00 (\pm 1,00) mL de meio BGA. Cada placa foi inoculada com disco (5 mm de diâmetro) de fungo de idade de crescimento de 5 dias meio BGA temperatura ambiente e na ausência de luz (em torno de 28° C), exceto o *Pycnoporus sanguineus* que cresceu em temperatura constante de 37° C em estufa.

5.4-Métodos Analíticos e Biológicos de Caracterização

Para avaliação do efluente *in natura* e do efluente tratado de indústria farmacêutica foram empregados os seguintes parâmetros: pH, Turbidez, Cor, Acidez, Alcalinidade, Dureza, Ferro, Manganês, Cloro, Oxigênio Consumido, Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Fenol, Nitrogênio total e Fosfatos. Todas as análises foram efetuadas de acordo como o Standard Methods, Water and Wastewater 20th Edition, 1998. A resolução CONAMA 357 estabelece alguns parâmetros para classificação de águas naturais, sendo que alguns parâmetros foram os mesmos usados para a caracterização, conforme já citados. Os métodos de análises enzimáticas (manganês

peroxidase, lignina peroxidase e lacase) são relativos ao processo de tratamento envolvendo fungos e são necessários para a avaliação da eficiência do tratamento.

Os equipamentos utilizados foram Turbidímetro Tecnal modelo D-20 (Brasil), Espectrofotômetro marca Micronal modelo B-582 (Brasil), Potenciômetro marca Tecnal modelo Tec-3-MP com eletrodo de Ag/AgCl (Brasil), Colorímetro marca Orbeco modelo DR-850 (Brasil) e mesa agitadora refrigerada New Brunswick Scientific (Estados Unidos), modelo C24KC. O Digestor para realização de DQO foi o da marca Hach (COD Reactor – Estados Unidos). Estufa para cultura de microrganismos Marca Alfa (Brasil).

O Quadro 4 relaciona as características físico-químicas analisadas, especificando o tipo de análise efetuada, bem como as condições de análise, agentes complexantes, tipo de eletrodo, indicadores, equipamentos e métodos.

Quadro 4- Características e tipos de análises realizadas nas amostras do efluente líquido.

Característica	Tipo de análise
Turbidez	Análise instrumental em turbidímetro
Cor	Análise instrumental em colorímetro
pH	Análise potenciométrica direta (eletrodo de Ag/AgCl)
Absorbância	Análise instrumental espectrofotométrica (400nm)
Acidez	Análise titrimétrica (indicador de fenolftaleína)
Alcalinidade	Análise titrimétrica (indicador de fenolftaleína para carbonatos e de metil orange para carbonatos totais)
Cálcio e Magnésio (Dureza)	Análise titrimétrica (indicador de eriocromo T para dureza total e de murexida para magnésio)
Ferro	Análise espectrofotométrica (1,10 fenantrolina) (550 nm)
Manganês	Análise espectrofotométrica (método do persulfato) (545 nm)
Fenol	Método de Folin-Ciocalteu (700 nm)
Nitrogênio	Método Kjeldahl
OD	Análise titrimétrica (Método de Winkler)
DQO	Análise espectrofotométrica (método de digestão com dicromato)
DBO	Análise titrimétrica (método de Winkler)

As análises físico-químicas foram efetuadas no laboratório de saneamento da Faculdade de Engenharia Civil do UFG, bem como no Laboratório de Enzimologia. O teste

de toxicidade foi realizado no laboratório de toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Goiás.

Para determinação de espectro de massa (distribuição de massas), foi utilizado espectrômetro de massa marca Applied Biosystems, módulo API 3200 LC IMS (Estados Unidos). O gás do spray foi o nitrogênio, com vazão da amostra de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, sem fragmentação dos compostos. O uso do equipamento foi efetuado no Instituto de Ciências Farmacêuticas – ICF,

Foram realizados os ensaios de determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959) e de proteína (LOWRY et al., 1957), a fim de avaliar se no efluente continha fonte primária de carbono (açúcares redutores) e fonte primária de nitrogênio (proteína), o que pode ajudar a caracterizar a viabilidade de utilização do contaminante orgânico como fonte de nutrição para os fungos .

5.4.1-Determinação de Fenóis Totais

A quantidade de fenóis totais foi determinada espectrofotometricamente, conforme o procedimento padrão de Folin-Ciocalteu modificado (APHA, 1992).

O princípio do método é a reação entre o reagente Folin-Ciocalteu e fenóis, com subsequente oxidação dos fenóis e formação de um complexo azul. A mistura reacional contendo $1000 \mu\text{L}$ de efluente, $250 \mu\text{L}$ de uma solução de carbonato-tartarato de sódio ($200-12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e $25 \mu\text{L}$ do reagente Folin $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi mantida a 20°C durante 30 minutos. A quantidade de fenóis foi determinado espectrofotometricamente após leitura da absorbância da solução em 700nm . Para o branco foi utilizada água ao invés de efluente. Os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenol, usando-se uma curva de calibração na faixa de 0 a $14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenol obtida pelo mesmo procedimento mencionado e usando fenol como padrão.

5.4.2-Determinação das Atividades Enzimáticas Antes e Após O Tratamento do efluente com Fungos.

Antes e após o tratamento (meio líquido) do efluente pelos fungos foram determinadas as atividades enzimáticas relacionadas com a degradação dos compostos orgânicos existentes no efluente. As culturas não inoculadas (controles) foram utilizadas como controles enzimáticos para descartar possíveis interferências com os métodos de determinação das atividades. As atividades enzimáticas foram determinadas espectrofotometricamente e os resultados expressos em μmoles de substrato oxidado durante um minuto, por mL de caldo filtrado ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$). As enzimas a serem pesquisadas são:

a) Lacase (SZKLARZ *et al.*, 1989- modificado):

A atividade de lacase foi determinada utilizando seringaldazina como substrato enzimático. A oxidação da seringaldazina ($\epsilon_{525\text{nm}} = 65.000 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) foi conduzida numa mistura de reação que continha 0,6 mL do caldo filtrado, 0,2 mL do tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} (pH 5,0) e 0,1 mL de seringaldazina $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ preparada em etanol. A reação iniciou-se pela adição da seringaldazina e a velocidade de oxidação desta foi acompanhada durante 10 minutos a 525 nm.

b) Lignina-Peroxidase (TIEN E KIRK, 1984, modificado):

A atividade de lignina peroxidase (LiP) foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9.300 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A mistura de reação deverá conter 0,6 mL de caldo filtrado, 0,2 mL de H_2O_2 $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e 0,2 mL de uma solução de álcool veratrílico $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em tampão citrato fosfato $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 3,0). A reação foi iniciada pela adição do H_2O_2 e o aparecimento do aldeído veratrílico determinado medindo-se a absorbância a 310 nm. A atividade de LiP foi expressa em U.mL^{-1} .

c) Manganês-peroxidase (KUMAHARA *et al.*, 1984):

A atividade de peroxidase dependente de Mn (II) (MnP) foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol. A mistura de reação (1,0 mL) deverá conter 0,5 mL de caldo filtrado, 0,1 mL de lactato de sódio $0,25 \text{ mmol}^{-1}$, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO_4 $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, 0,05 mL de uma solução de H_2O_2 $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ preparada em tampão succinato de sódio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada a 30°C durante 5 minutos e a reação interrompida pela adição de $40 \mu\text{L}$ de NaOH $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. A absorbância foi lida a 610 nm e a atividade de MnP expressa como $\Delta\text{Abs mL}^{-1}\text{min}^{-1}$.

5.4.3-Determinação de Proteína (LOWRY *et al.*, 1957)

O método que atualmente é coloquiamente chamado de Lowry (LOWRY *et al.*, 1957), foi usado para a determinação de proteínas totais. O princípio do método baseou-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II) em meio fortemente alcalino e produz um composto com absorção máxima em 700 nm. Foi usada albumina bovina para a confecção da curva padrão. Foram usados $200 \mu\text{L}$ de caldo filtrado, $100 \mu\text{L}$ de reagente de Folin Ciocalteu 1:2 e $1000 \mu\text{L}$ de reagente de Lowry.

5.4.4-Determinação de Açúcares Redutores (MILLER, 1957)

Para obtenção do teor de açúcares redutores, foi usada a metodologia de Miller (1959), utilizando-se 500µL do sobrenadantes, adicionou-se 1,0 mL de água destilada e 1,0 mL de solução de DNS (150,000 g de tartarato de sódio e potássio, 5,000 g de 3,5-ácido dinitro salicílico, 100 mL de solução de NaOH 2 M em um litro de água destilada). As amostras foram fervidas em banho-maria durante cinco minutos e as leituras realizadas em 540 nm. Para a construção dos padrões, utilizou-se glicose.

5.5-Ensaio de Toxicidade com *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade foi realizado segundo a metodologia descrita por (MCLAUGHLIN; COLMAN-SAIZARBITORIA; ANDERSON, 1995). Utilizou-se uma saboneteira tampada sem a metade da parte superior e esta ficou aproximadamente 15 cm abaixo de uma lâmpada incandescente de 40 W, para isso, utilizou-se o suporte, o agarrador e o fio elétrico. Preparou-se a solução de salina contendo 38,000 g de sal marinho em um litro de água destilada. Filtrou-se a solução em um frasco de vidro (mantido na geladeira). Colocou-se então uma colher de ovos de *A. salina* na saboneteira devidamente preparada com um pouco da solução salina a 28°C. deixou-se as larvas eclodirem por 24 horas. Dividiram-se os tubos de ensaio em grupos, sendo um grupo controle e os outros, grupos teste – esses contiveram diferentes concentrações da substância analisada.

Para cada amostra fez-se em duplicatas, como se faz necessário, para margem de segurança dos resultados. Os tubos foram identificados e em cada tubo, colocou-se em média 1,5 mL de água salina a 28°C e em seguida 10 larvas de *A. salina*. Acrescentou-se então, a solução teste para cada grupo, e no controle, acrescentou-se somente solução salina. Finalmente completou-se todos os tubos até 5 mL com a solução salina. Conservou-se os tubos em banho-maria a 28°C. Depois de 24 horas contou-se e anotou-se os valores de náuplius mortas das repetições para cada dose teste para obtenção de uma média aritmética. O cálculo da mortalidade do efluente usou-se a fórmula de Carballo et al. (2002):

$$\% \text{ Mortalidade} = \% \text{ de sobreviventes no controle} - \% \text{ de mortalidade do composto em estudo.}$$

5.6-Avaliação do Crescimento Micelial Radial do Fungos

O crescimento radial micelial dos fungos foi medido usando-se uma régua de precisão de acrílico de trinta centímetros de comprimento, da marca Trident. Após cinco dias

de crescimento em ambiente específico (ausência de luz e temperatura ambiente, exceto para o *P. sanguineus*, que foi mantido em estufa a 37° C). O crescimento foi de 100% quando o micélio tomou a área da placa de petri de dez centímetro de diâmetro (10 cm). Todas as placas de petri foram medidas e a média dos valores foi dada como a área média, conforme Santiago (1999) .

5.7-Realização dos tratamentos

Para o tratamento do efluente da indústria farmacêutica, que foi mantido sob refrigeração, foram colocados 100,00 mL de efluente em um erlenmeyer de 250 mL, onde em capela de fluxo laminar foram colocados os conteúdos das placas (meio de cultura + fungo) nos erlenmeyers, que totalizaram 10 , sendo que todo o experimento foi feito em duplicata e que foram para controle, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. Posteriormente, foram colocados na mesa agitadora refrigerada e mantidos a 28° C e 180 rpm . O processo biológico foi efetuado em uma mesa agitadora refrigerada (New Brunswick Scientific), do Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. Para controle, foram adicionadas as culturas dos fungos, sob as mesmas condições citadas, autoclavado a uma temperatura de 121°C por 15 minutos e depois colocado sob agitação em uma mesa agitadora refrigerada em uma temperatura de 28°C e 180 rpm (rotações por minuto) (teste de adsorção).

Como garantia de que os compostos fúngicos foram responsáveis pelo tratamento do efluente e não a biota de origem bacteriana, o efluente foi autoclavado durante 15 minutos, a 121° C e os resultados foram quantificados. O processo físico de esterilização foi escolhido devido à menor alteração dos compostos orgânicos presentes no efluente, pois o processo químico, como a adição de hipoclorito de sódio, alteraria consideravelmente as características químicas do efluente, sendo que muitas análises físico-químicas são prejudicadas na precisão da metodologia, com a adição desse composto. Um outro processo que pode ser utilizado é a fotólise, mas este procedimento não apresenta boa eficiência no processo de desinfecção, além de diminuir a DQO (Demanda Química de Oxigênio), o que altera consideravelmente as propriedades do efluente. O processo fotocatalítico apresenta grande potencial na desinfecção e redução de cor dos efluentes, o que pode ser utilizado para melhorar o processo de tratamento biológico.

Uma tentativa de aumentar a produção enzimática, principalmente fenoloxidasas (lacase especificamente), foi efetuada a troca da água usada para a preparação do meio de cultura sólido pelo efluente puro. Como o efluente *in natura* continha fenol, que é um

substrato dessas enzimas, viabilizou-se tal troca, pois compostos fenólicos são considerados agentes indutores sintéticos (BOLLAG; LEONOWICZ,1984) .

O tratamento pelo processo fotocatalítico foi efetuado no reator de capacidade total de 500,00 mL pertencente ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Goiás (Figura 6). No reator fotocatalítico foi borbulhado ar a uma vazão de 180 mL min^{-1} , sendo este provido de sistema de refrigeração, agitador magnético, TiO_2 em suspensão (Degussa P-25) e lâmpada de alta pressão de mercúrio (Philips HPL-N 125 W, fluência de $31,1 \text{ J m}^2 \text{ s}^{-1}$, $\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$).

O processo de otimização para massa ideal de catalisador foi feito de acordo com a diminuição da absorbância em 400 nm do efluente fotocataliticamente tratado e a massa ideal foi escolhida de acordo com a relação menor absorbância e massa do TiO_2 .

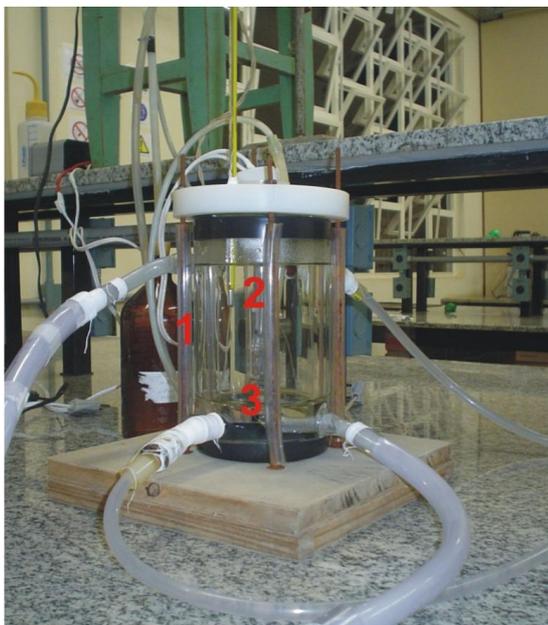


Figura 6 - Esquema do reator fotocatalítico: (1) jaqueta de água para controle de temperatura; (2) tubo de quartzo para lâmpada; e (3) barra de agitador magnético.

5.8-Armazenamento e manutenção das Amostras

Após os respectivos períodos de tratamento, o efluente foi filtrado inicialmente em papel de filtro Whatmann 1,3 mm e o caldo filtrado foi guardado sob refrigeração. Todas as amostras foram filtradas posteriormente em membrana Milipore® $0,45 \mu\text{m}$ e imediatamente resfriadas a 4°C (SANTIAGO, 1999). Para as medições das atividades enzimáticas, as amostras foram centrifugadas durante 20 min a 8000 rpm (GARCIA, 2006).

5.9-Espectros no UV-vis

Os espectros no UV-vis foram realizados usando-se cubetas de quartzo marca Micronal com volume total de 4 mL, sendo que foi usado como referência água destilada. O intervalo dos comprimentos de onda foi de quinze nm. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente e centrifugadas a 8000 rpm, durante trinta minutos, antes da realização dos espectros. Para evitar a contaminação por adsorção de compostos nas cubetas, antes da realização de cada espectro, elas foram fervidas em água destilada durante vinte minutos e enxaguadas com água destilada. A secagem das mesmas foi feita em temperatura ambiente. As cubetas de quartzo foram testadas quanto à sua similaridade, tanto nos comprimento de onda visível, quanto no ultravioleta, usando-se água destilada como líquido de teste.

5.10 – Ensaio de Espectrometria de massa

A realização dos ensaios de espectrometria de massa foi efetuada no Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF), localizado na cidade de Goiânia. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e novamente filtradas em membrana Milipore® 0,45 µm. O injetor de amostra (seringa) era de vidro temperado com capacidade de 1,0 mL. A seringa foi lavada com água destilada três vezes, antes da colocação da amostra no seu interior. Para garantir o fluxo constante de vazão da amostra de 20 µL.min⁻¹, foi usada uma bomba de compressão mecânica que acompanha o equipamento. Foi escolhida no programa a razão massa carga de 50 a 1000, a fim de se detectar a presença de compostos de baixo peso molecular (abaixo de 1000 Da) (AQUINO, 2003).

6-RESULTADOS E DISCUSSÕES

A tabela 1 relaciona as características físico-química e bioquímicas das amostras em estudo. As amostras 2, 3 e 4 foram coletadas e caracterizadas e feitas o tratamento biológico, mas por não ter apresentado viabilidade de tratamento biológico com fungos, possivelmente devido à alta toxicidade aos fungos devido à presença de antifúngicos, essas amostras não terão os dados a cerca se sua tratabilidade mostrados. A fim de comparar com os valores estabelecidos pela resolução CONAMA 357, foram colocados os valores para comparação da qualidade das amostras.

Tabela 1– Características físico-químicas e bioquímicas das amostras provenientes da indústria farmacêutica.

Característica	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Padrão Lançam.
Turbidez - NTU	59,0	17,0	30,0	45,0	25,0	-
pH	2,7	6,40	6,5	6,9	6,80	5,0 a 9,0
Absorbância em 400 nm	0,077	0,020	0,066	0,089	0,030	-
Cor - mg.L ⁻¹ de Pt/Co	403,0	179,0	150,0	310,00	120,0	-
Acidez - mg de acidez	188,00	10,00	19,00	12,00	25,00	-
Alcalinidade - mg de CaCO ₃ L ⁻¹	N.D.	403,00	350,00	267,00	500,00	-
Dureza Total - mg. L ⁻¹	N.D.	25,02	30,00	36,00	30,0	-
Ferro - mg.L ⁻¹	1,15	1,90	1,35	1,20	1,95	15,00
Manganês - mg.L ⁻¹	1,10	1,80	1,20	1,11	1,80	1,00
Oxigênio dissolvido mg.L ⁻¹	3,10	0,00	1,50	1,25	0,00	-
Fosfatos - mg.L ⁻¹	10,00	25,00	20,00	13,00	15,00	-
Nitrogênio total - mg.L ⁻¹	1,00	0,50	0,70	0,50	0,50	-
DQO - mg de O ₂ .L ⁻¹	263,00	3863,00	2548,00	2134,00	2500,00	-
DBO - mg de O ₂ .L ⁻¹	1,50	1.500,00	200,00	100,00	555,00	-
Fenóis Totais - mg.L ⁻¹	0,90	1,00	0,80	0,78	1,50	0,50

N. D. - Não detectável por este método.

Padrão de lançamento de efluente, de acordo com Resolução CONAMA nº 357/2005.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 1, pode-se observar a heterogeneidade do efluente, mostrando grande variação de pH e de DQO e , relacionando o processo produtivo está diretamente ligado às característica físico-químicas e bioquímicas do mesmo. De acordo com dados da própria indústria, o efluente gerado é basicamente proveniente do processo de lavagem dos misturadores, sendo que os sanitizantes fazem parte do efluente, bem como os resíduos da produção, que em sua maioria é de antibióticos, injetáveis, soros, antifúngicos, xaropes e analgésicos.

Um dos pontos importantes a serem observados na caracterização das amostras foi

o pH ácido da amostra 1, indicando que em alguma parte do sistema produtivo ou na limpeza, usou-se ácidos inorgânicos, o que pode vir a ser um complicador para o tratamento biológico convencional (lodo ativado) caso esse a correção do pH não seja corrigido no tanque de equalização.

Outro parâmetro observado foi a demanda biológica das amostras, que indicou que a amostra 1 apresentou baixa degradabilidade e a amostra 5 apresentou mediana degradabilidade, indicando que a relação DBO/DQO pôde demonstrar que os métodos convencionais de tratamento biológico podem apresentar dificuldade no processo de degradação dos contaminantes.

6.1-O Método de Tratamento Biológico

Os meios de cultura sólidos foram inoculados com os sete fungos em estudo, sendo que as placas permaneceram em ambiente sem luz, durante cinco dias, a fim de que houvesse o crescimento dos mesmos (SANTIAGO, 1999). Foram usados códigos para identificar cada fungo, conforme o *Quadro 5*.

Quadro 5 – Relação de códigos para identificação de cada espécie de fungo.

Código	Espécie
GA	<i>Ganoderma applanatum</i>
LE	<i>Lentinus edodes</i>
PC	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
PS	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
SC	<i>Schizophyllum commune</i>
TVe	<i>Trametes versicolor</i>
TVi	<i>Trametes villosa</i>

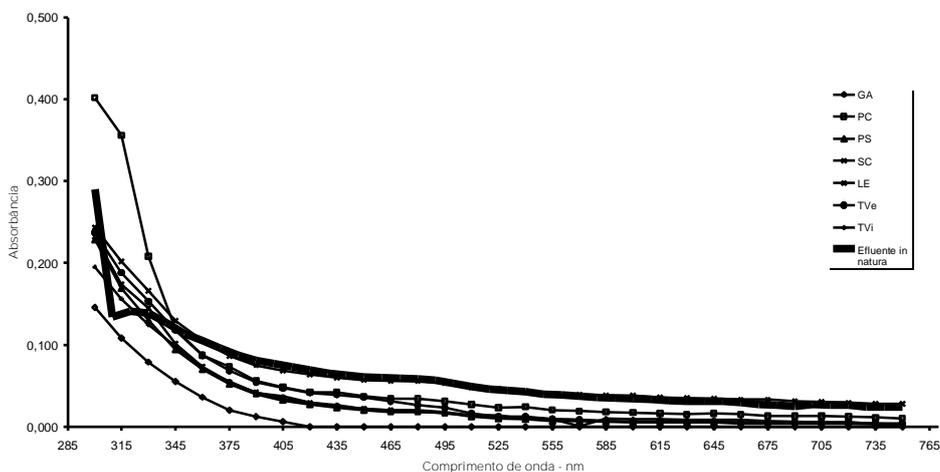
6.1.1-Amostra 1

6.1.1.1- Tratamento do Efluente *in natura*

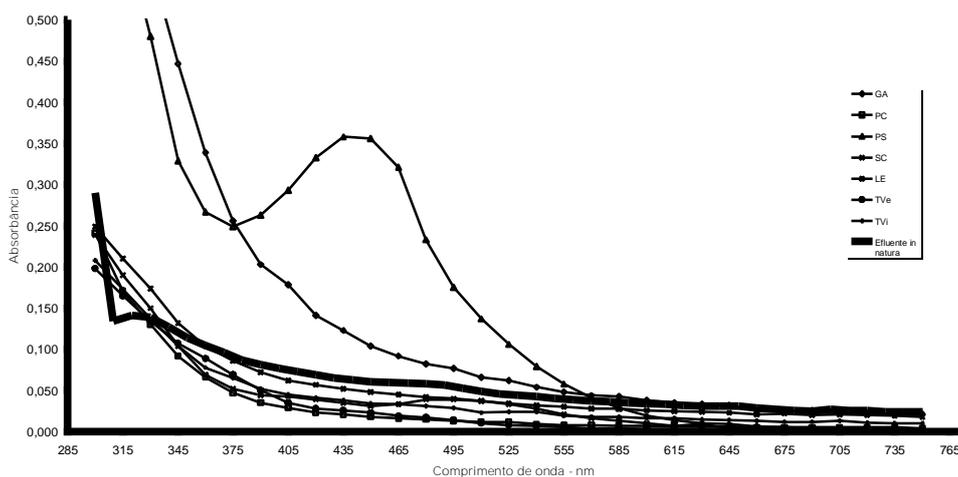
Foram efetuadas espectros de 300 a 750 nm para acompanhar a evolução do tratamento do efluente. Os resultados foram dados de acordo com o período de tratamento, conforme a Figura 7 . Foi usado o efluente *in natura*, para o tratamento.

Nas primeiras 24 h de tratamento mostrou-se uma diminuição da absorvância nos caldos filtrados de todos os fungos, mas a partir de 48 h e 72 h houve a produção de compostos, principalmente pelo *G. applanatum* e a partir de 72 h, pôde-se notar um aumento

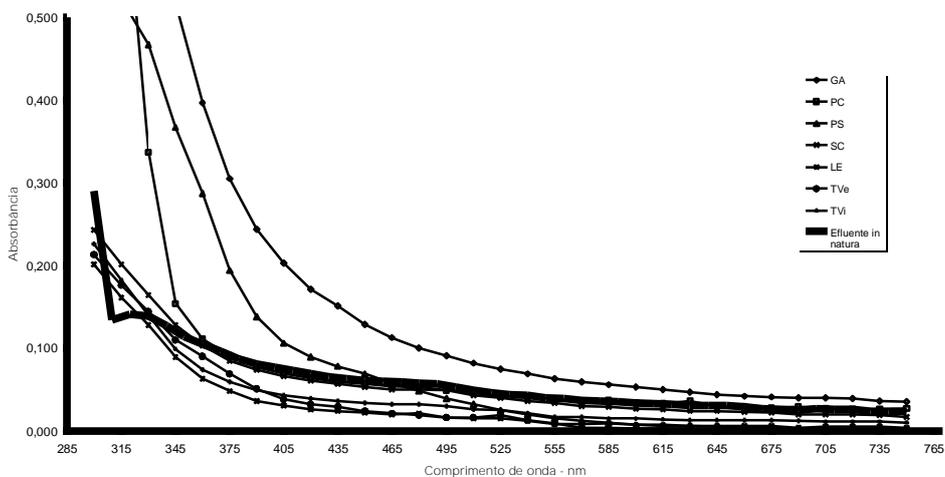
da absorvância e modificação da curva, se comparados aos períodos anteriores, do caldo filtrado do *P. sanguineus*, embora para os outros fungos, tal comportamento não foi observado.



(7a)



(7b)



(7c)

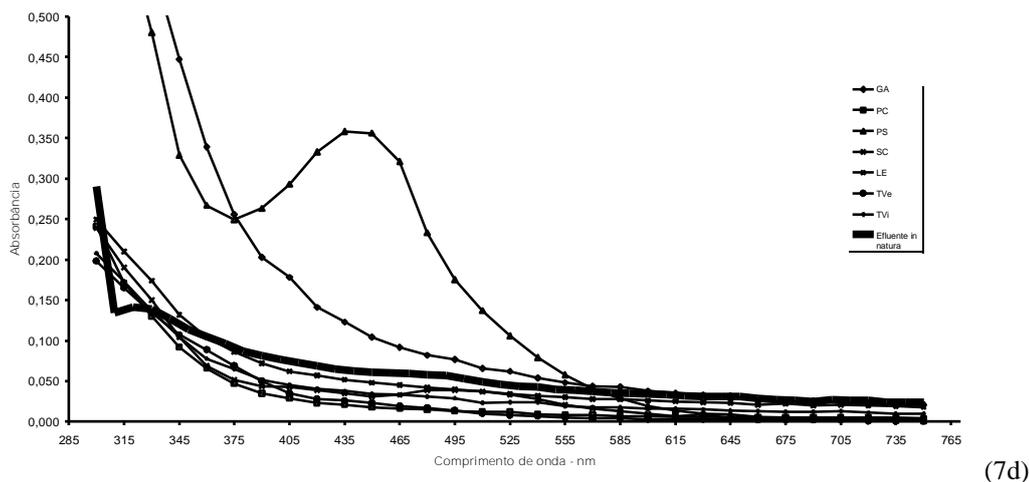


Figura 7– Espectro de 300 a 750 nm da amostra 1. (a) 24 horas de tratamento, (b) 48 horas de tratamento, (c) 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente *in natura* serve como comparação da modificação do efluente.

A melhor performance da remoção cor foi durante as primeiras 24 horas, podendo ser explicado pela possível produção enzimática e não enzimática (sideróforos) ainda na placa de meio de cultura sólido (SANTIAGO, 1999), ou ainda pela manutenção do meio ideal de crescimento com o aproveitamento das fontes de carbono e nitrogênio do meio de cultura, sendo que ao se exaurir tais fontes, principalmente a fonte de carbono (glicose), o metabolismo seria prejudicado, diminuindo a produção de compostos fúngicos (KAMIDA et al., 2005).

O fungo *Pycnoporus sanguineus* apresentou coloração amarronzada a partir de 72 h de tratamento, possivelmente devido ao pigmento chamado de cinabarina que é um antibiótico natural sintetizado por tal fungo (SMANIA; SMANIA-JUNIOR; LOGUERCIO-LEITE, 1998) que apresentou alta solubilidade. O aumento da coloração foi monitorado a partir de 96 h de tratamento.

De acordo com Garcia (2006), tal fungo apresenta correlação da produção desse pigmento e a produção de lacase, embora a produção desse composto fosse detectado após 15 dias de crescimento em meio de cultura sólido, diferentemente do que foi determinado no tratamento do efluente da indústria farmacêutica. Em outro estudo (SMANIA; SMANIA-JUNIOR; LOGUERCIO-LEITE, 1998), a síntese de tal composto só foi detectada depois de 18 dias de incubação.

Um outro fator notado é que a diminuição da absorvância poderia ser um processo de adsorção da matéria orgânica no fungo. O controle foi efetuado para se verificar essa ocorrência, como é mostrado na Figura 8. Os dados apresentados na Figura 8 podem apresentar variação devido à presença de enzimas e outros compostos fúngicos, que podem ter

inicializado a degradação dos compostos orgânicos ou absorvem a radiação luminosa nos comprimentos de onda estudados. Ele foi realizado da mesma maneira que os outros erlenmeyers, mas todo o sistema foi autoclavado e foi mantido na mesa agitadora refrigerada por 96 horas.

Os fungos *Trametes villosa*, *Lentinus edodes* e *Phanerochaete chrysosporium* apresentaram diminuição na absorbância medida em 400 nm, isso mostra possivelmente adsorção da matéria orgânica no micélio. O aumento da absorbância na faixa do UV, pode estar relacionado a compostos solúveis de origem fúngica, bem como ao meio de cultura que se liquefez no processo de desinfecção.

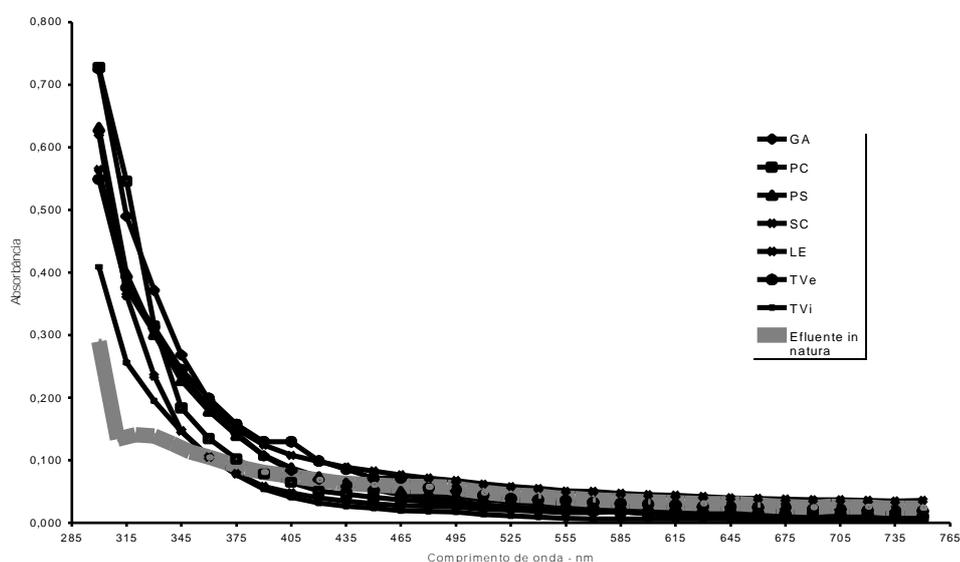


Figura 8 – Espectro de 300 a 750 nm dos controles da amostra 1, dos respectivos fungos,.

A produção da enzima manganês peroxidase foi determinada em 610 nm de acordo com os tempos de tratamento, como é mostrado na Figura 9. Os valores da absorbância são referentes a 5 minutos de ação da enzima sobre o substrato (vermelho de fenol). Comparando com os espectros, a produção desta enzima não corresponde à diminuição da absorbância nos espectros já citados.

O fungo que apresentou maior produção desta enzima foi o *Trametes villosa* em 96 horas de tratamento do efluente e o que apresentou menor produção foi o *Pycnoporus sanguineus*, o que pode concluir é que a produção desta enzima depende completamente das características físico-químicas e bioquímicas em que o fungo se encontra (efluente), ou mesmo a disponibilidade de nutrientes para a biotividade, como a concentração de fonte de carbono e nitrogênio, bem como da capacidade do fungo sintetizar tal enzima.

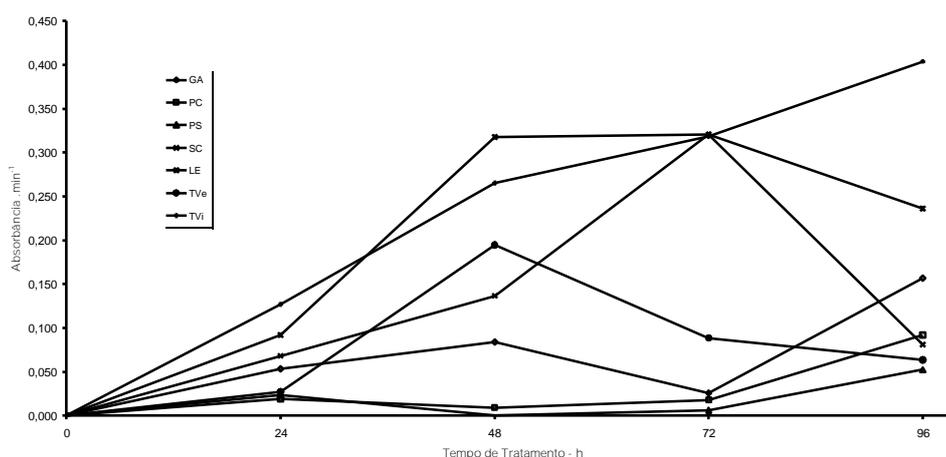


Figura 9 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da amostra 1, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato, em 610 nm.

A variação do pH foi monitorada como é mostrado na Figura 10, sendo que o pH do efluente *in natura* foi igual a 2,7, mas todos caldos filtrados dos fungos tenderam com o tempo a um pH médio em torno de 3,1, estabilizando-se a partir de 72 h de tratamento. Essa faixa de pH que os caldos filtrados apresentaram está dentro do intervalo de pH ótimo para a atividade da lacase, MnP e LiP (WESENBERG ; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003). Já foi relatado que os fungos preferem pH (4,0-6,0) mais ácido, pois nesta faixa de pH, as fenoloxidasas apresentam maior estabilidade (PALMIERI et al., 1993).

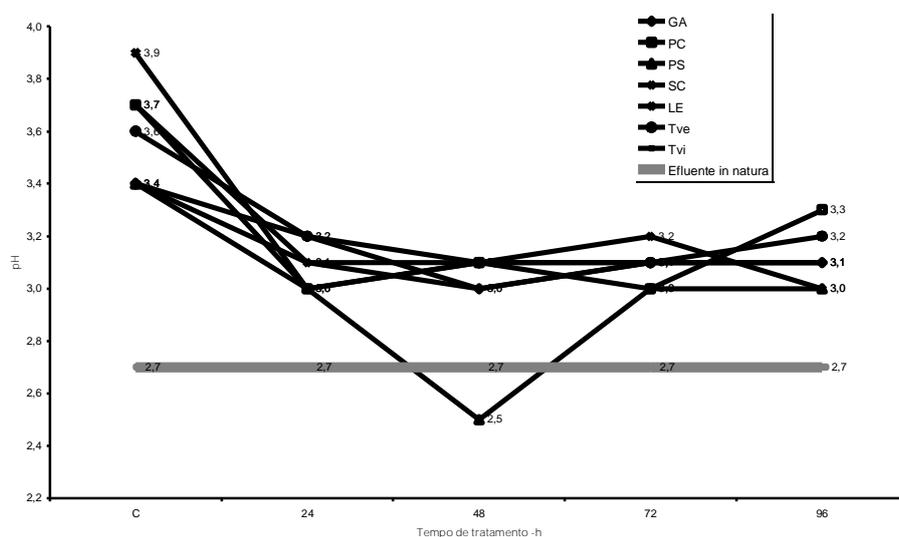


Figura 10 – Variação do pH durante o tratamento da amostra 1 com os fungos. O pH do efluente *in natura* foi de 2,7.

A variação e estabilização do pH foi feita com a produção de compostos de origem fúngica, verificada com o aumento do pH no tratamento do efluente com os fungos,

sendo que a adição do meio de cultura não foi responsável direta pela variação de pH (2,7 a 3,1), indicando que a bioatividade fúngica está relacionada à manutenção de um pH ideal para crescimento e síntese de biocompostos (GADD, 1999).

A degradação do fenol foi acompanhada de acordo como a Figura 11, sendo que no efluente *in natura*, a concentração foi de 1,20 mg.L⁻¹. A metodologia usada foi a do Folin Ciocalteau, mas os resultados mostraram um aumento da concentração deste contaminante, sugerindo que essa metodologia pode não ser adequada para medir fenol nas condições em estudo.

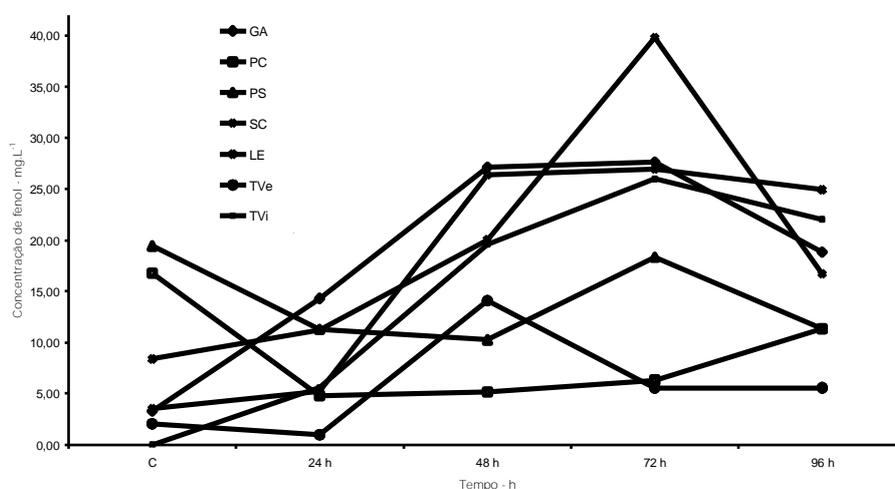


Figura 11 – Variação da concentração de fenol total medido espectrofotometricamente em 700 nm, durante o tratamento biológico da amostra 1.

De acordo com APHA (1992), o principal interferente para essa análise são proteínas, o que pode ser notado na Figura 11, em que proteína foi quantificada, podendo a mesma se de origem do metabolismo dos fungos ou provenientes do meio de cultura. Testou-se também o ácido acetohidroxâmico, que é um sideróforo do tipo hidroxamato, sendo que o mesmo apresentou reação característica ao reagente de Folin-Ciocalteau (cor azulada), o que mostrou que hidroxamatos também podem ser interferentes nesta análise, caso também registrado por Herrera (1995), em que se usou outro hidroxamato, comercialmente conhecido como Desferral®, que apresentou reação característica com o reagente cromóforo. Portanto, pode-se concluir que a interação do ácido hidroxâmico e o reagente de Folin resulta na formação de um complexo azul, sob condições alcalinas.

Embora não haja correlação entre a quantidade de proteínas e o aumento da concentração de fenol, um estudo mais preciso pode ser necessário a fim de se conseguir maior precisão nas medidas, pois o caldo filtrado apresentou maior concentração de fenóis

totais que o efluente *in natura*. Outra vertente possível é a síntese de compostos fúngicos não-protéicos que interferem na quantificação da concentração de fenóis totais presente no efluente. Portanto, detecção e quantificação de fenóis totais por essa metodologia, apresentou-se de baixa especificidade para trabalhos relativos à biorremediação (AQUINO, 2002). Testou-se uma solução albumina bovina, mas não houve resultado positivo relativo à formação do complexo azul, o que pode se afirmar que os aminoácidos presentes na proteína (albumina) não são do tipo tirosina e triptofano (CHOU; GOLDSTEIN, 1960). A metodologia de quantificação de proteína foi a de Lowry, em que o reagente Folin Ciocalteau foi usado em proporção de 1:2 com água destilada, sendo que os valores encontrados não oferecem confiabilidade, pois ocorreu a interferência notada na análise de fenóis totais. Embora o método de Lowry seja baseado na desnaturação da proteína em meio fortemente alcalino, o reagente de Folin é reduzido por aminoácidos presentes (tirosina e triptofano), por isso a albumina não apresentou reação característica ao reagente colorificante. A Figura 12 mostra a concentração de proteínas durante o tratamento biológico.

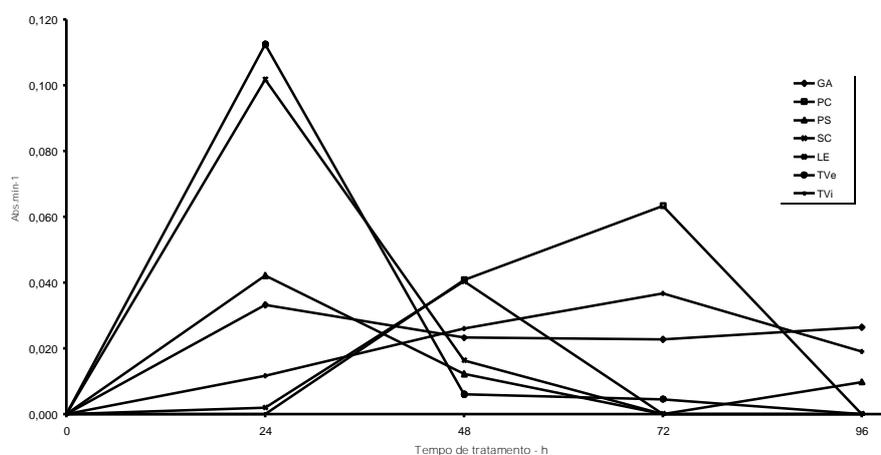
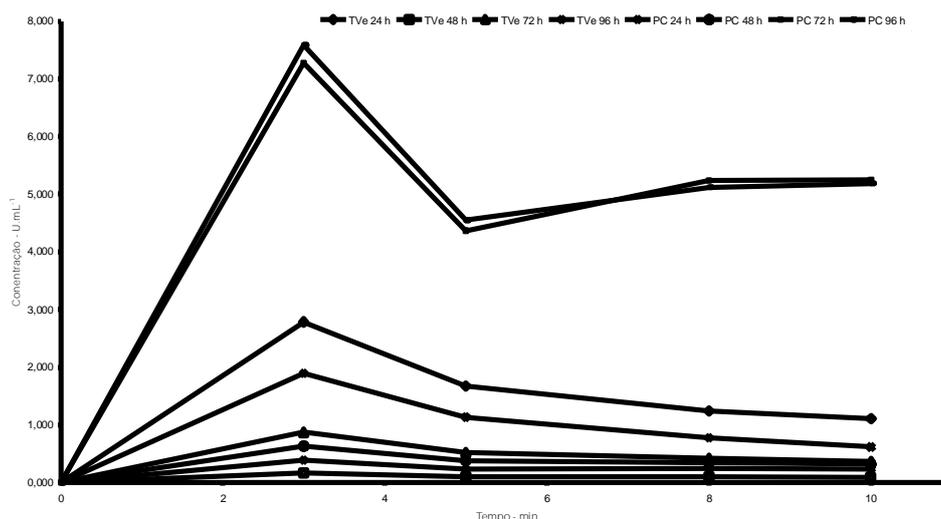


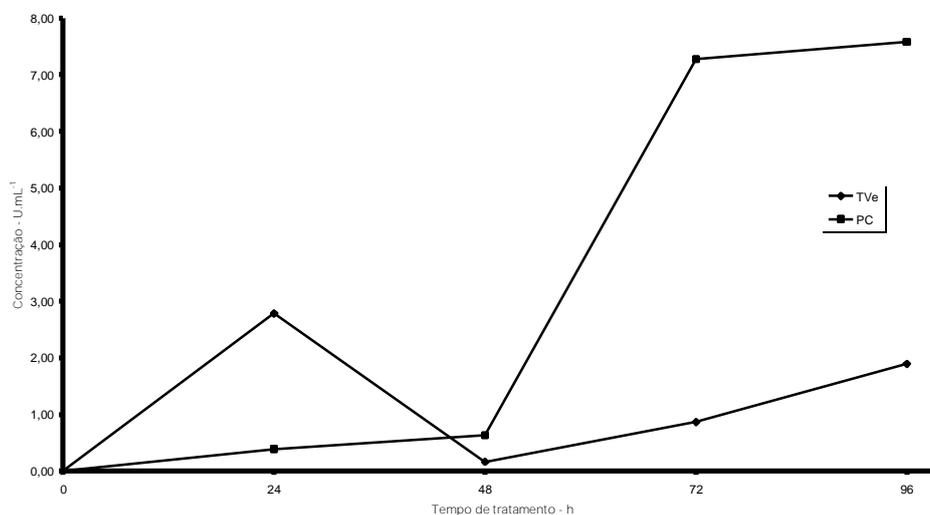
Figura 12 – Variação da concentração de proteínas nos caldos filtrados da amostra 1, em relação ao tempo de tratamento.

A atividade enzimática da lacase foi acompanhada espectrofotometricamente durante 10 minutos, conforme a Figura 13a. A oxidação da seringaldazina foi usada como indicador da ação da lacase. O fungo que apresentou maior atividade enzimática foi o *Phanerochaete chrysosporium* em 72 horas de tratamento. Apenas o *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* (DITTMER et al., 1997) apresentaram atividade de lacase, o que pode ser explicado pela inibição da produção dessa enzima, quer pela presença de microrganismos, quer por compostos tóxicos aos fungos presentes no efluente. Observou-se

que em caldos filtrados de alguns fungos (*L. edodes*, *G. applanatum*, *T. villosa* e *S. commune*) havia alteração na composição da solução quando se adicionou o substrato, mas não se pode afirmar que a lacase foi responsável pela oxidação da seringaldazina, pois a forma oxidada (quinona) apresenta cor púrpura característica. A figura 13 mostra concentração da lacase, durante o tratamento. O *T. versicolor* apresentou atividade de lacase com 24 h de tratamento, correspondendo à melhor performance na remoção da cor, mostrado pelo espectro (Figura 7)



(13 a)



(13 b)

Figura 13 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da amostra 1, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH da reação foi igual a 5,0 e seringaldazina foi usada como substrato.

O pH das amostras que apresentaram maior atividade enzimática da lacase foi 3,0 e 3,3, respectivamente o *P. chrysosporium* em 72 e 96 h de tratamento. Estudos mostram que em pH ácidos, muitas fenoloxidasas se mostram muito ativas, mas altamente instáveis (PALMIERI et al., 1993). Tal observação pode ser comprovada pela grande variação da

cinética química em que o tempo ideal para a observação da reação é, conforme sugerido por Szklarz et al.(1989) de dez minutos.

As curvas da Figura 13 indicam diminuição da concentração da lacase após 5 minutos de reação, isto mostra uma enzima bastante instável nas condições estudadas, principalmente em pH ácido (PALMIERI et al., 1993).

Para se avaliar o decaimento da matéria orgânica presente no efluente *in natura*, foi avaliado a DQO (solúvel, pois os caldos eram filtrados em membrana 0,45 µm), conforme a figura 14 .Por se tratar de um sistema heterogêneo, em que se diferencia a fase sólida (micélio, agar e particulados) da fase líquida (solúvel), a bioatividade fúngica (variação de pH, síntese enzimática, etc.) pôde ir modificando a proporção entre as duas fases, levando a resultados em que a relação de DQO seja superior a 1,00. Entretanto, valores abaixo de 1,00 (degradação), não podem ser interpretados como redução da matéria orgânica presente no efluente *in natura*, pois tal metodologia avalia toda matéria orgânica contida na amostra, sendo que os Produtos Microbianos Solúveis (PMS) estão presentes no meio, impossibilitando a interpretação dos resultados. Para melhor avaliação do potencial de degradação do método biológico proposto, o estudo de contaminantes específicos da indústria farmacêutica deve ser usado, como a cromatografia líquida, acoplada a espectrômetro de massa (AQUINO, 2002).

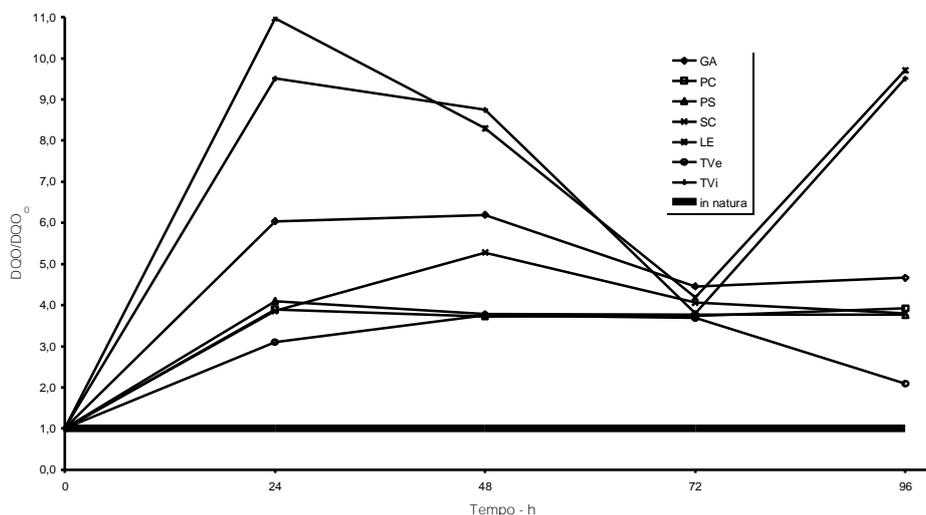
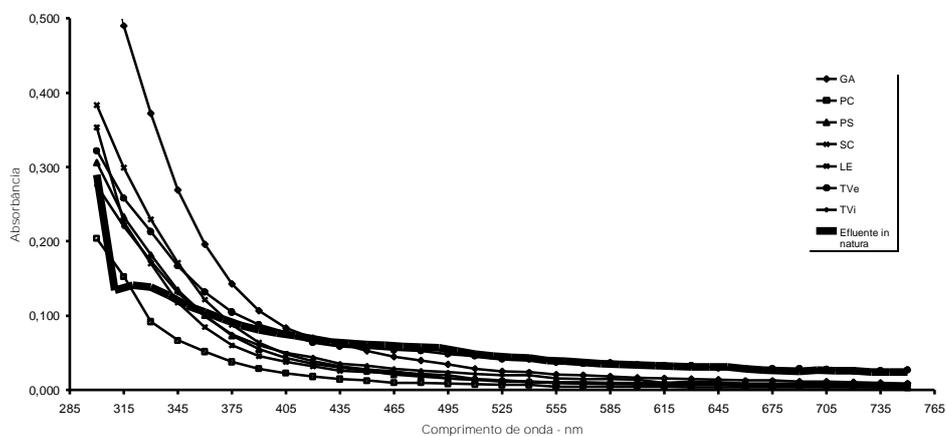


Figura 14 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da amostra 1. A linha mais escura indica que abaixo dela, observa-se a degradação da matéria orgânica do efluente *in natura*.

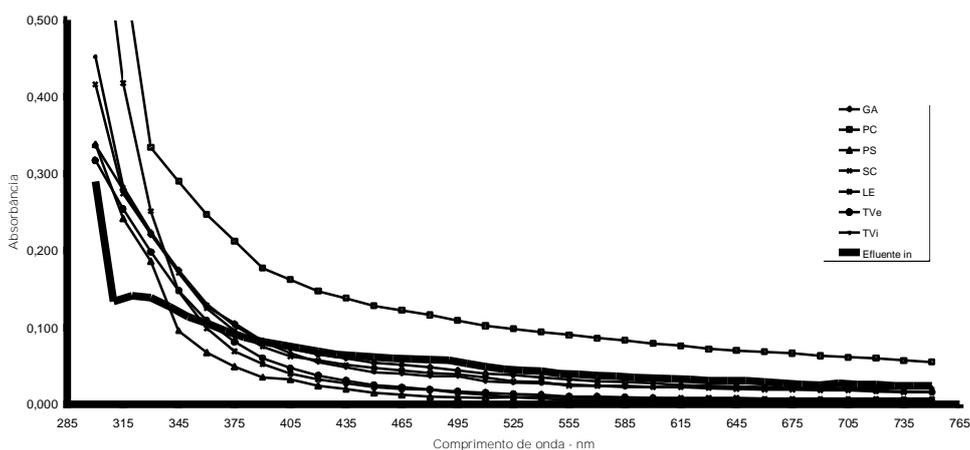
6.1.1.2- Tratamento do Efluente autoclavado

A Figura 15 representa o espectro do efluente autoclavado em estudo. Como pôde ser notado pelos espectros, o fungo *Pycnoporus sanguineus* não apresentou coloração característica nas 48 h iniciais de tratamento, como ,já registrado, quando se usa o efluente *in*

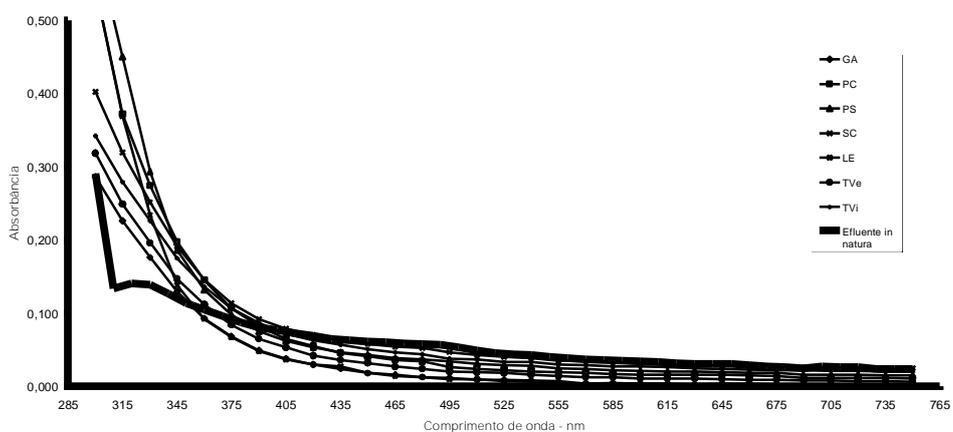
natura. Só foi observada após 72 horas de tratamento do mesmo. Pode-se sugerir que a produção de tal composto pode estar associada à presença de substâncias que podem agredir quimicamente as hifas (BOLLAG et al., 1988).



(15a)



(15b)



(15c)

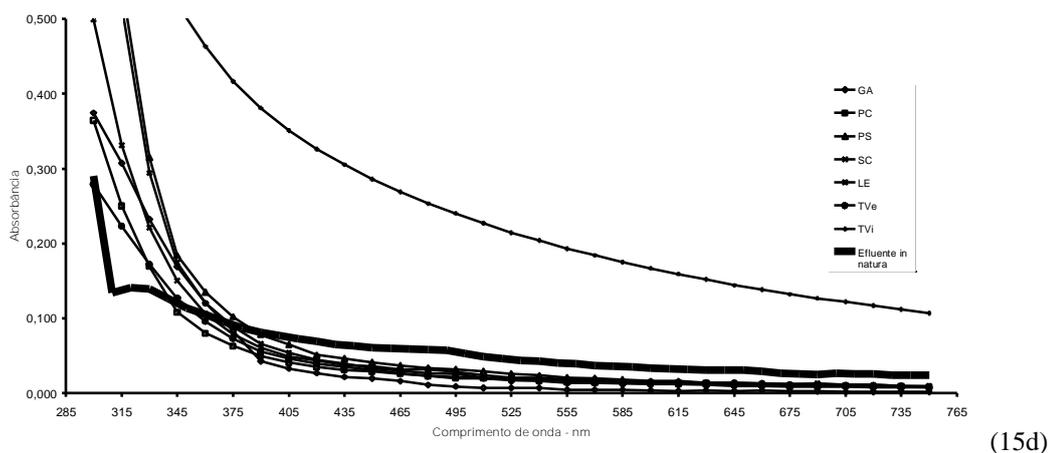


Figura 15 – Espectro de 300 a 750 nm do efluente autoclavado e posteriormente filtrado da amostra 1. (a) – 24 horas de tratamento, (b) – 48 horas de tratamento, (c) – 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente *in natura* serve como comparação da modificação do efluente.

Observou-se que o metabolismo do fungo sofre alteração considerável na geração de compostos que absorvem na faixa do UV (ultravioleta), quando se utilizou o efluente autoclavado. Observou-se também que na faixa de 300 a 400 nm, o caldo filtrado apresentou absorvância maior que o efluente *in natura*, que foi centrifugado nas mesmas condições do efluente tratado biologicamente.

Em 24 horas de tratamento, houve uma acentuada diminuição da coloração, medida em 400 nm, sendo que após esse período, houve um aumento da coloração do efluente tratado, o que mostra que o tempo de retenção aumenta a coloração do efluente, como já sugerido por Aquino (2002). Não se pode descartar a alteração do efluente no processo de desinfecção, embora estudos com o efluente não mostraram alteração de cor significativa no efluente.

A produção de manganês peroxidase foi acompanhada espectrofotometricamente, conforme a Figura 16, sendo que se usando o efluente autoclavado, a produção em geral foi menor. López e colaboradores (2004) mostraram que existe uma relação entre a atividade de manganês peroxidase e o peróxido de hidrogênio, sendo essa relação um fator limitante do processo enzimático. O oxigênio dissolvido também tem demonstrado que a reação do Mn^{3+} e H_2O_2 , gera oxigênio que se acumula no caldo filtrado, atingindo valores de até $12,0 \text{ mg de } O_2.L^{-1}$. Também já foi constatado que em baixos níveis de oxigênio dissolvido, a enzima apresentou maior atividade, possivelmente devido à relação ideal entre o peróxido e a enzima López e colaboradores (2004).

Os fungos *Trametes versicolor* e *Lentinus edodes* apresentaram maior atividade enzimática nas amostras colhidas em 24 horas, valores que decaíram ao longo do tratamento

biológico. O fungo *Phanerochaete chrysosporium* apresentou maior atividade enzimática com 72 horas de tratamento, mas que decaiu em 96 horas. Tal comportamento sugere que as enzimas podem ter sido produzidas ainda em meio sólido e apenas o *P. chrysosporium* produziu tal enzima durante o tratamento do efluente.

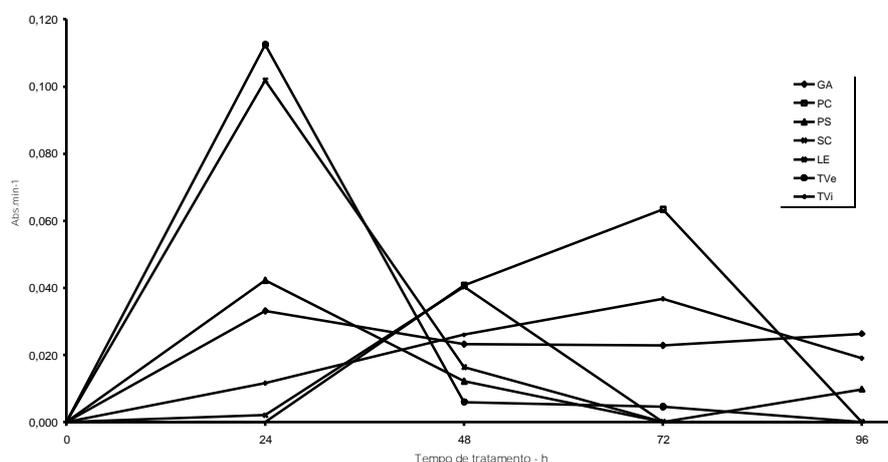


Figura 16 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da amostra 1 autoclavada, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato.

O monitoramento do pH dos caldos filtrados foi efetuado e se apresentam conforme Figura 17.

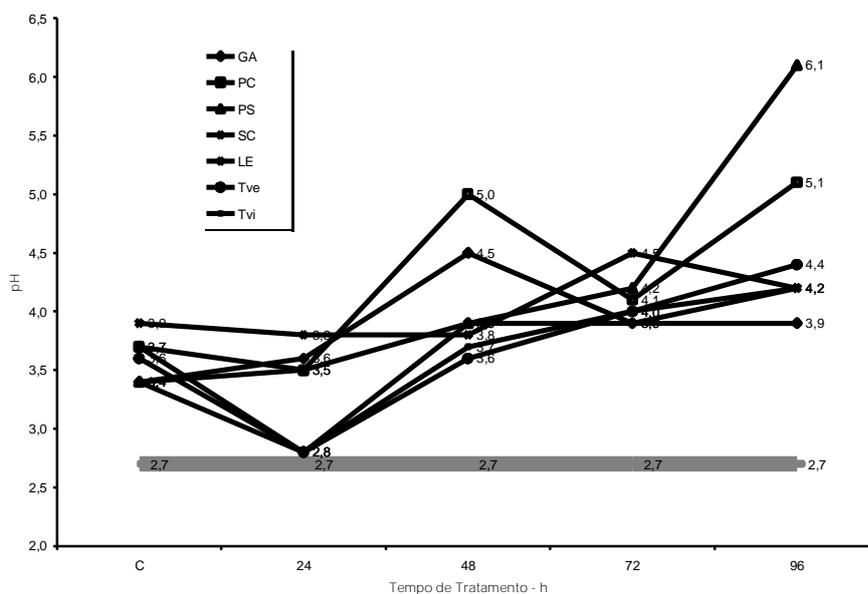
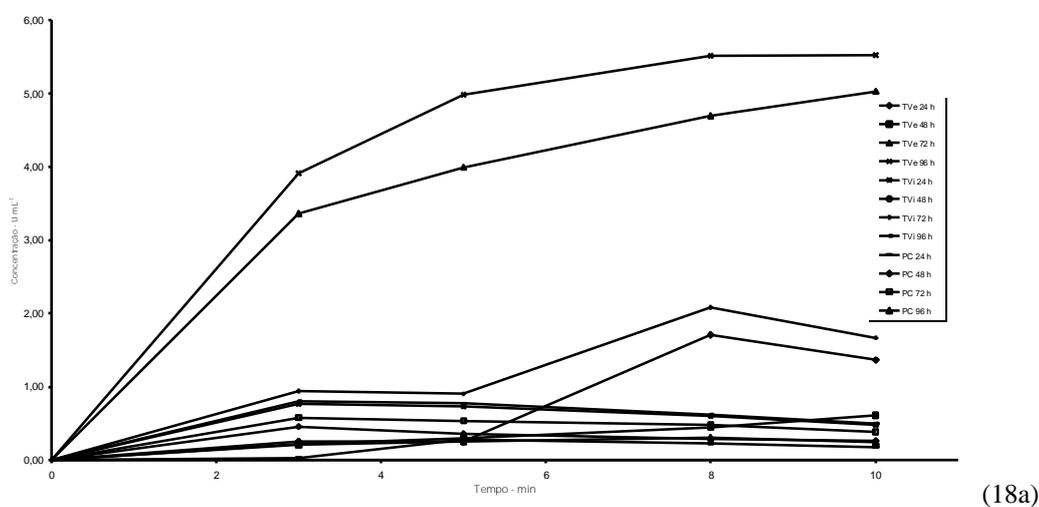


Figura 17 – Variação do pH durante o tratamento com os fungos, usando-se a amostra 1 autoclavada. O pH do efluente *in natura* é 2,7.

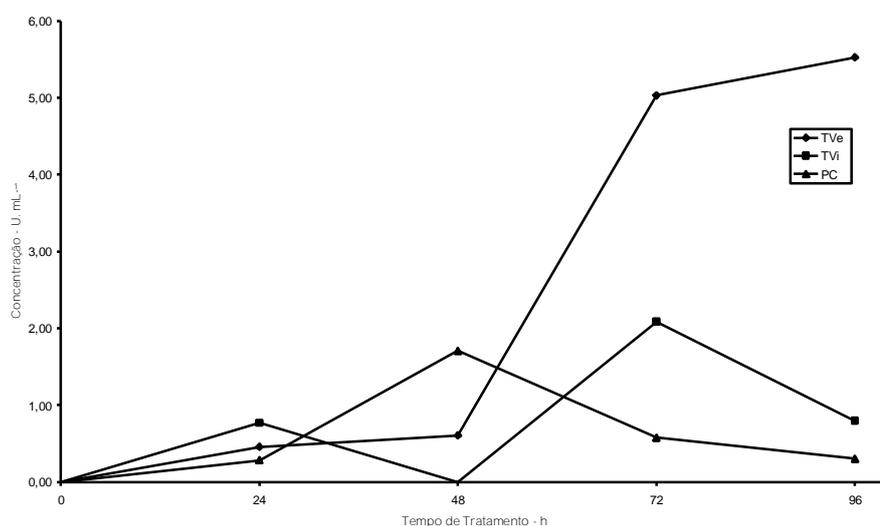
Notar que a variação do pH é muito diferente de quando se utiliza o efluente *in natura*, sendo que o fungo *Pycnoporus sanguineus* apresentou maior pH após 96 horas de

tratamento e o *Ganoderma applanatum* apresentou menor pH após 96 horas de tratamento. Nessa forma de tratamento do efluente, a variação de pH's foi grande, indicando que o fungo produz compostos orgânicos modificadores de pH, conforme as condições do meio e as disponibilidade de metais (GADD, 1999).

A atividade enzimática da lacase foi monitorada da mesma maneira supra citado. O processo de desinfecção favoreceu a produção de lacase para o *Trametes villosa*, *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium*, aumentando a quantidade de enzima produzida pelo *Trametes versicolor* e *Trametes villosa* e favorecendo a produção do *Phanerochaete chrysosporium*, conforme se observa na Figura 18.



(18a)



(18b)

Figura 18 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da amostra 1, previamente autoclavados, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico, usando o efluente autoclavado. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.

Nestas condições, o *Trametes versicolor* apresentou a maior atividade enzimática (Figura 16a) em 5 minutos de reação ou seja, o tempo indicado na metodologia (10 minutos) é

o ideal para se avaliar a atividade enzimática nestas condições. A figura 16b mostra a variação da concentração de lacase, durante o tratamento. Como não se trata de enzimas purificadas, os comportamentos das curvas pode apresentar irregularidades, como o *T. villosa* em 72 h de tratamento e o *P. cryosporium* em 48 h de tratamento.

Segundo Szklarz e colaboradores (1989), pode-se medir a concentração da peroxidases da mesma maneira que se quantifica a lacase, adicionando-se peróxido de hidrogênio à mistura de reação. Conforme Kelley e Reddy (1986) enzimas são capazes de gerar peróxido intracelularmente e extracelularmente, o que pode servir como fonte de H_2O_2 do meio.

A Figura 19 mostra o decaimento da DQO, quando se usou o efluente previamente autoclavado durante 15 min a $121^\circ C$.

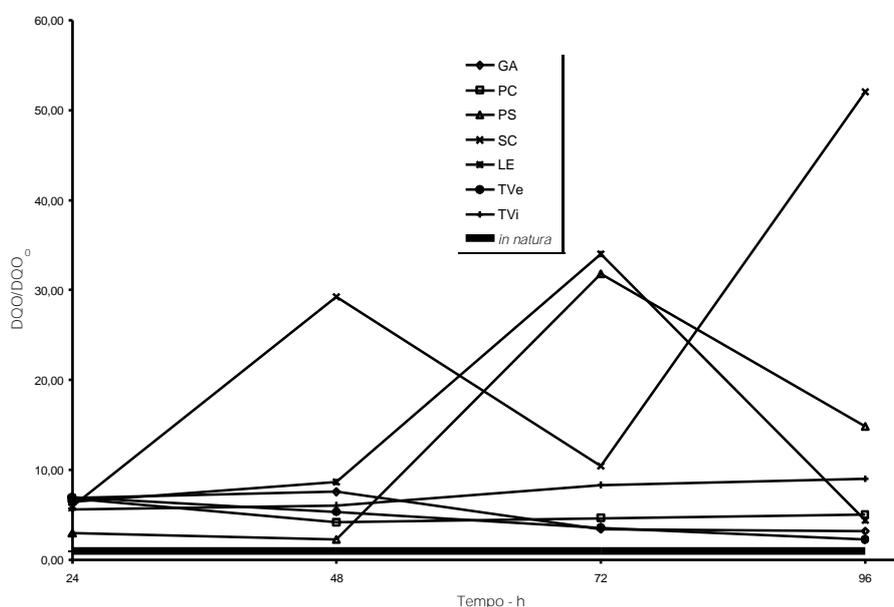


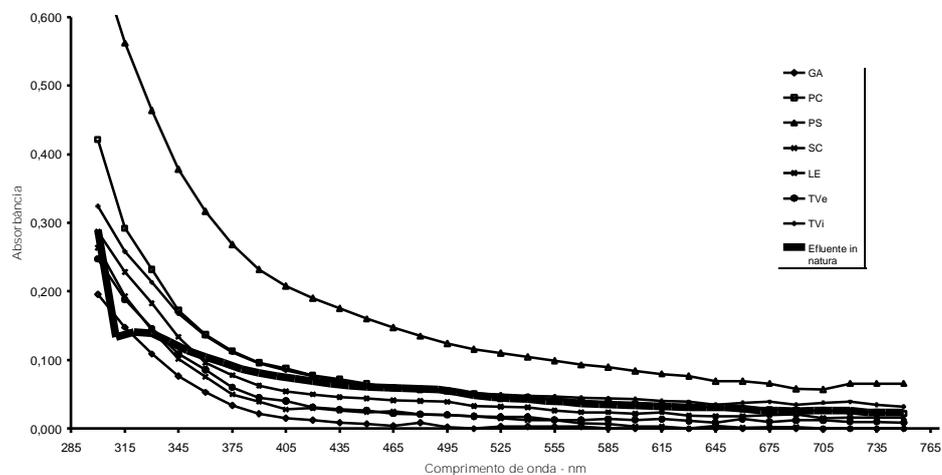
Figura 19 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da amostra 1. A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente autoclavado.

Novamente, os dados de DQO não possibilitam avaliar se o contaminante orgânico foi degradado pelo método biológico. A ausência de microrganismos pode ter inibido a produção enzimática, pois os resultados comparados com os do efluente *in natura*, mostram que não houve diminuição do contaminante primário. Baldrian (2004), demonstrou que é possível aumentar a produção de lacase, usando *Trichoderma harzianum* como indutor, o que pode vir a significar que a síntese enzimática pode ser induzida por microrganismos.

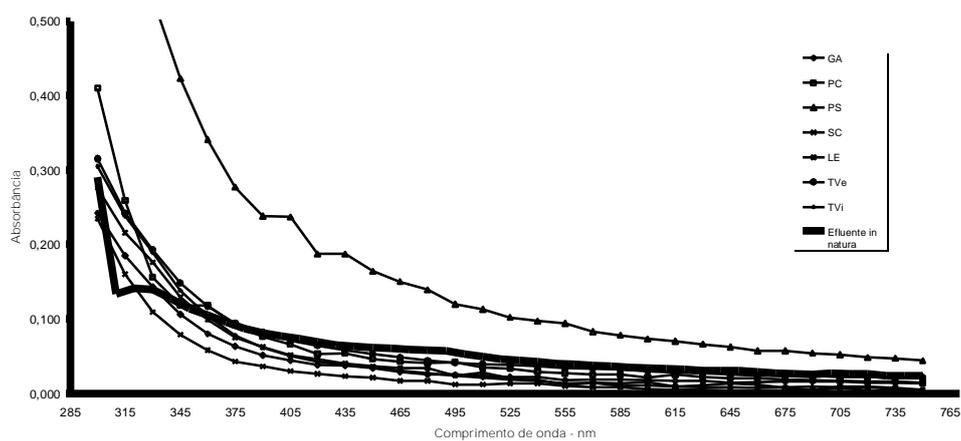
6.1.1.3- Tratamento com Indução no Meio Sólido

Quando se usou o efluente no lugar da água no meio de cultura sólido, nas placas que continham *Pycnoporus sanguineus*, apareceu coloração amarronzada característica,

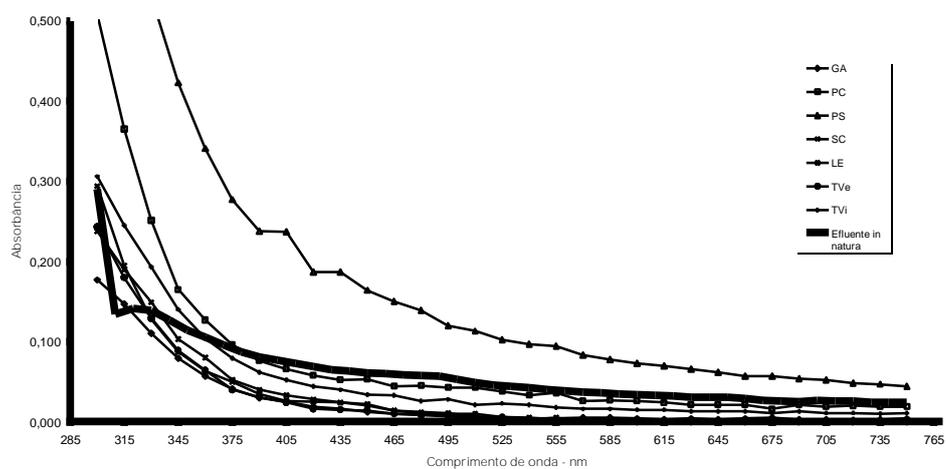
indicando que a produção do corante está ligada à presença de compostos fenólicos, pois em condições anteriores, o aparecimento do mesmo só foi percebido após o contato do fungo com tal contaminante, em diferentes tempos de tratamento.



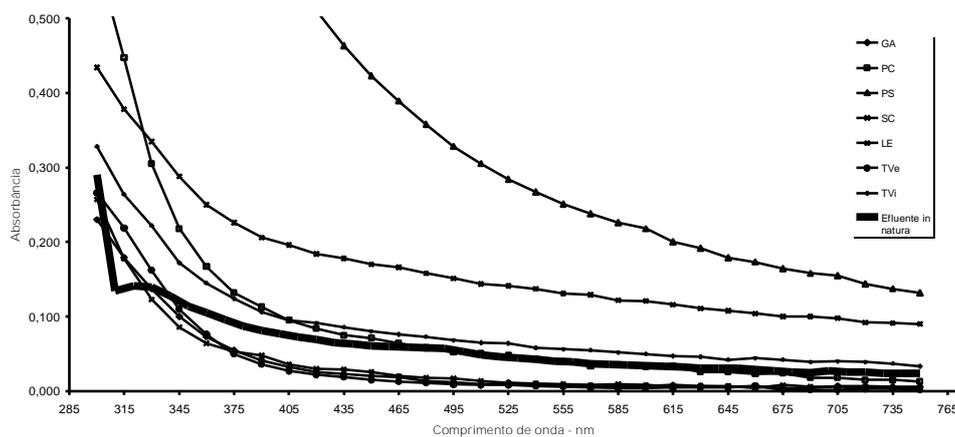
(20a)



(20b)



(20c)



(20d)

Figura 20 – Espectro de 300 a 750 nm do efluente tratado com indutor em meio sólido. (a) – 24 horas de tratamento, (b) – 48 horas de tratamento, (c) – 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. Notar que o espectro do efluente *in natura* serve como comparação da modificação do efluente.

Novamente, os espectros acompanharam espectrofotometricamente a evolução do tratamento biorremediativo, conforme a Figura 20. O aparecimento da coloração amarronzada nos caldos com *Pycnoporus sanguineus* foi detectado logo nas primeiras vinte e quatro horas de tratamento, embora houve produção de cinabarina começou em meio sólido, confirmado pela mudança de coloração do meio. Diferentemente de Garcia (2006) e Smania, Smania-Junior e Loguercio-Leite (1998), a produção de cinabarina foi iniciada logo que o *P. sanguineus* começou a ter seu desenvolvimento micelial registrado.

O comportamento dos espectros, comparando-se o efluente com os fungos crescidos em meio ágar-batata é similar, exceto o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, que apresentou absorvâncias menores na faixa do UV. Notou-se também o aumento da massa micelial dos sete fungos em estudo, quando se alterou o meio de cultura sólido.

Em 48 horas de tratamento, foi observado uma melhor descoloração (em 400 nm) do efluente (exceto pelo *P. sanguineus*), sendo que aumentando o tempo de tratamento, houve aumento de coloração, conforme já descrito por Aquino (2002), indicando maior produção de PMS a partir desse período

A produção de Manganês peroxidase foi grandemente influenciada pela mudança do meio de cultura, sendo que apenas um fungo (*Trametes villosa*) apresentou atividade desta enzima, conforme a Figura 21.

Estudos mostram que a regulação da produção das peroxidases é dependente da concentração do substrato nitrogenado, sendo que a relação de produção de MnP e a concentração de compostos nitrogenados e carbonáceos é inversamente proporcional

(LINKO, 1992). Portanto, a adição do efluente pode vir a ser um inibidor da produção de peroxidases.

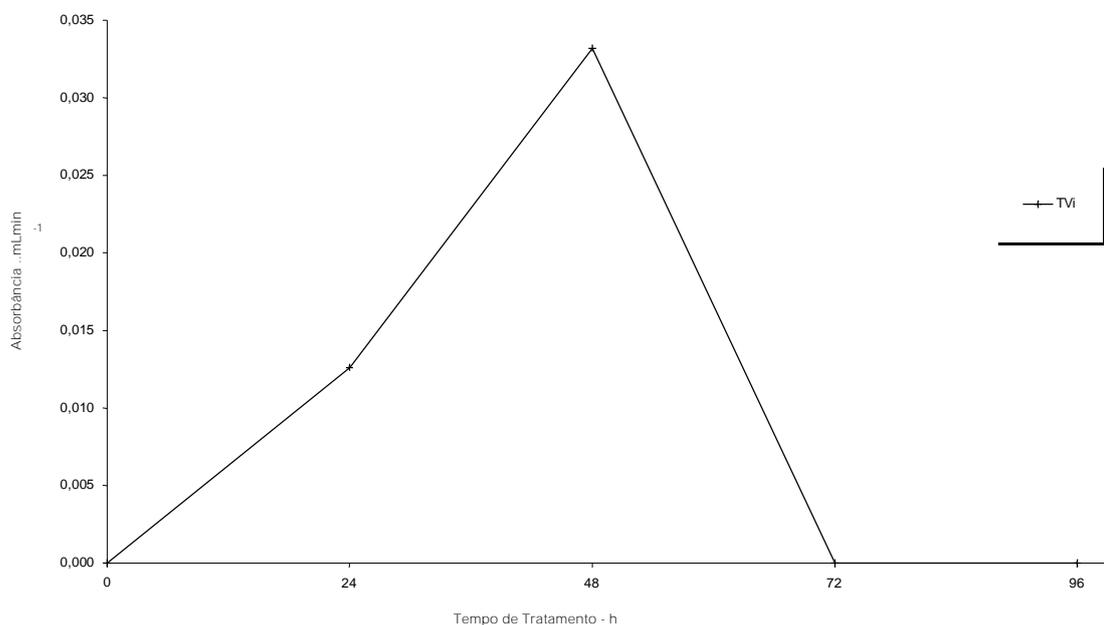


Figura 21 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da amostra 1, efluente tratado com indutor em meio sólido, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato.

O acompanhamento da variação do pH do caldo filtrado é mostrado na Figura 22, e notou-se que o intervalo de pH foi maior que quando se usou o efluente *in natura* tratado sem o indutor (2,7 a 6,9), sendo que essa característica da biotransformação é de grande valia na correção do pH do efluente, não sendo necessária a correção química do mesmo, quando se usa os biorremediadores em condições específicas.

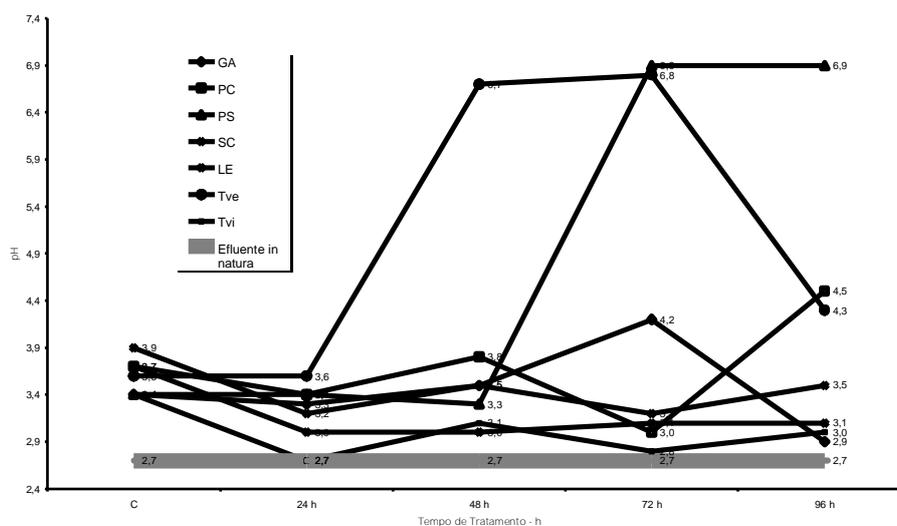
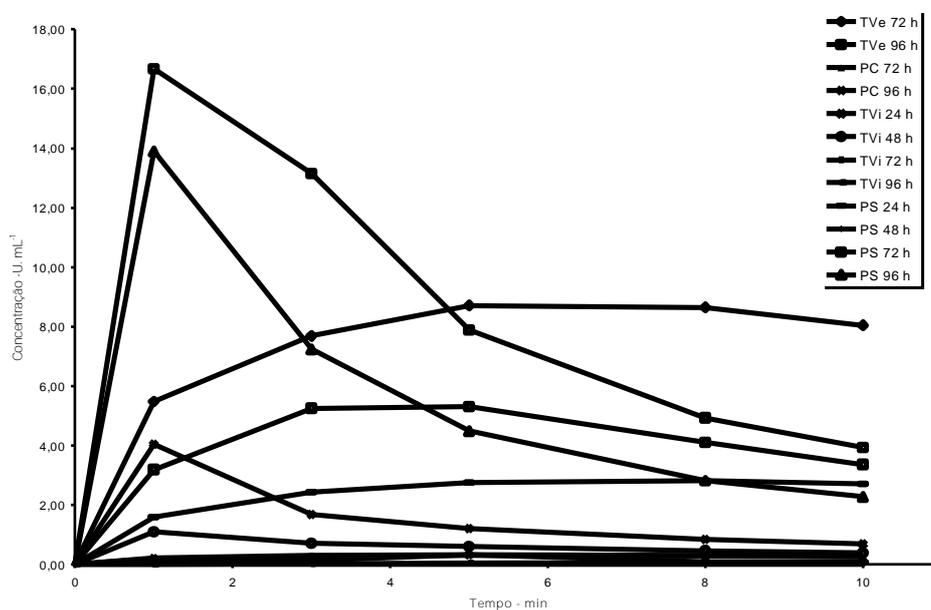
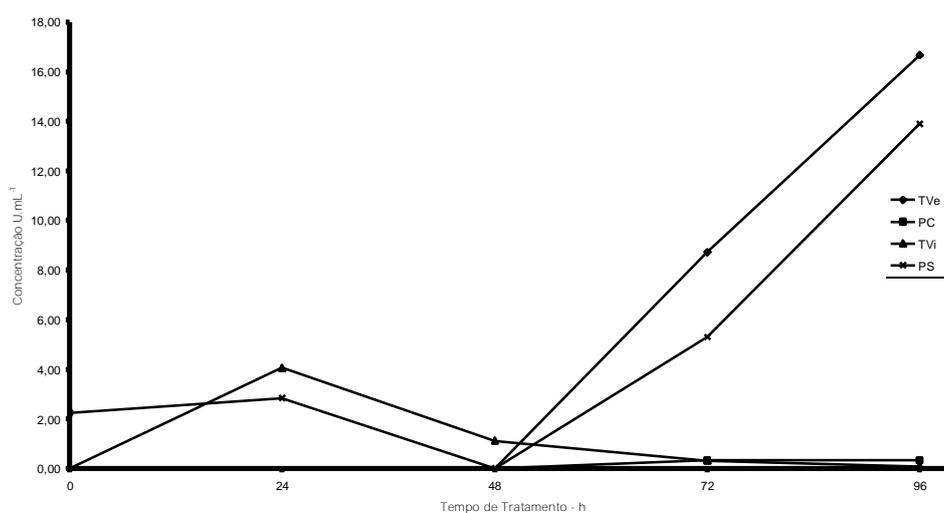


Figura 22 – Variação do pH durante o tratamento com os fungos, usando indutor em meio sólido na amostra 1. O pH do efluente *in natura* foi 2,7.

O ensaio de atividade enzimática da lacase indicou que o tempo de cinco minutos de monitoração da reação de oxidação da seringaldazina foi excessivo para o *Trametes versicolor*, *Trametes villosa* e para o *Phanerochaete cryosporium* quando esses apresentaram a maior produção da enzima, mas para os outros fungos, o tempo de dez minutos foi o ideal para a monitoração da oxidação do substrato. Um dos fatores que também podem ter interferido na cinética química é a concentração do substrato, mas estudos mais criteriosos necessitam ser efetuados, a fim de se averiguar tal influência. A Figura 23a mostra a reação de oxidação da seringaldazina e a Figura 23b mostra a concentração da lacase durante o tratamento biorremediativo.



(23a)



(23b)

Figura 23 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da amostra 1, usando-se indutor em meio sólido, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico, usando o efluente tratado com usando indutor em meio sólido. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.

O decaimento da DQO não demonstra que há como mostrar se houve degradação do contaminante original do efluente *in natura*, conforme a Figura 24. Também nesta forma de tratamento, não houve diminuição da DQO inicial, indicando não ser possível discorrer sobre a degradação do contaminante orgânico.

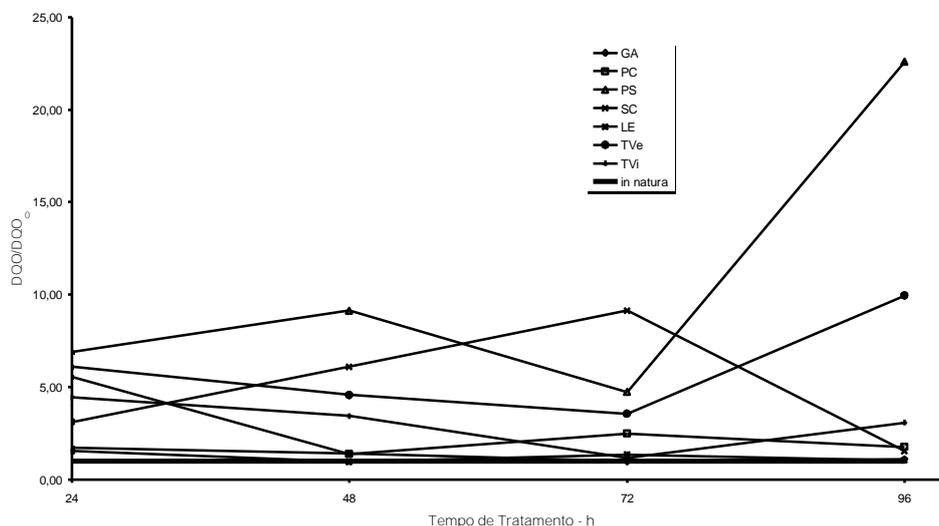


Figura 24 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da amostra 1. A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente, usando indutor em meio sólido.

Uma das proposições apresentadas foi que os fungos podem usar os contaminantes presentes na mistura efluente e meio de cultura como forma de manutenção do metabolismo primário, o que pode levá-los a buscar as fontes de carbono e nitrogênio no ágar não dissolvido, explicando a grande variação da faixa pH, somente detectado quando se utilizou o indutor em meio sólidos. Se avaliarmos a produção enzimática e de outros biocompostos como uma biotransformação de contaminantes, a redução da DQO não seria percebida, pois por um balanço de massa, o contaminante apenas foi biotransformado e não eliminado. Tal proposição pode ser evidenciada pela alta produção de cinabarina pelo *P. sanguineus* e pela produção de lacase pelo *T. versicolor*.

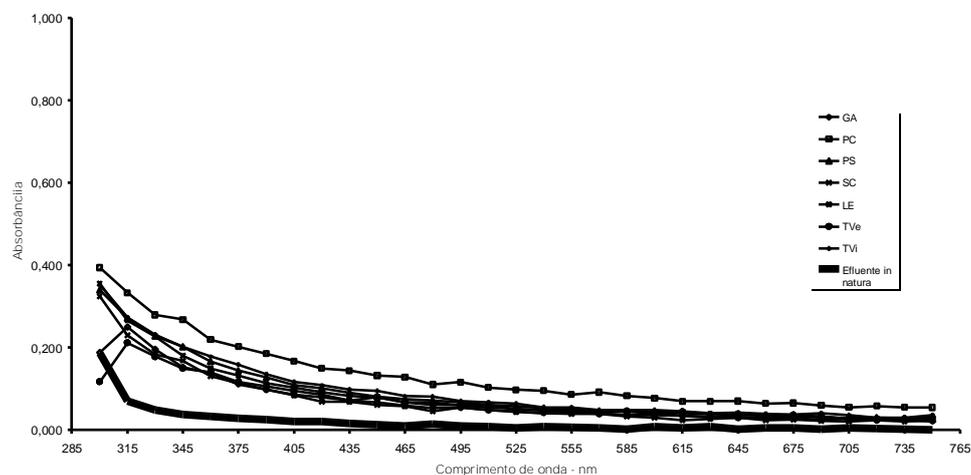
Durante todo o tratamento, não foi detectada a enzima lignina peroxidase, o que pode ser explicado pelo baixo nível de OD no efluente (BELINKY et al., 2003), bem como a ausência de um substrato específico.

6.1.2-Amostra 5

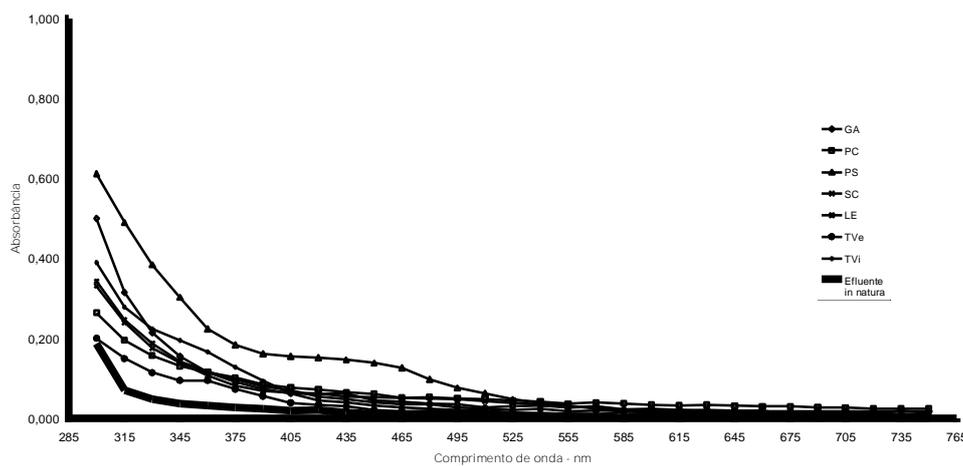
6.1.2.1-Tratamento do efluente *in natura*

Espectros foram feitos para acompanhar a atividade biológica dos fungos e a possível relação com a degradação ou modificação do efluente original. A Figura 25 mostra a

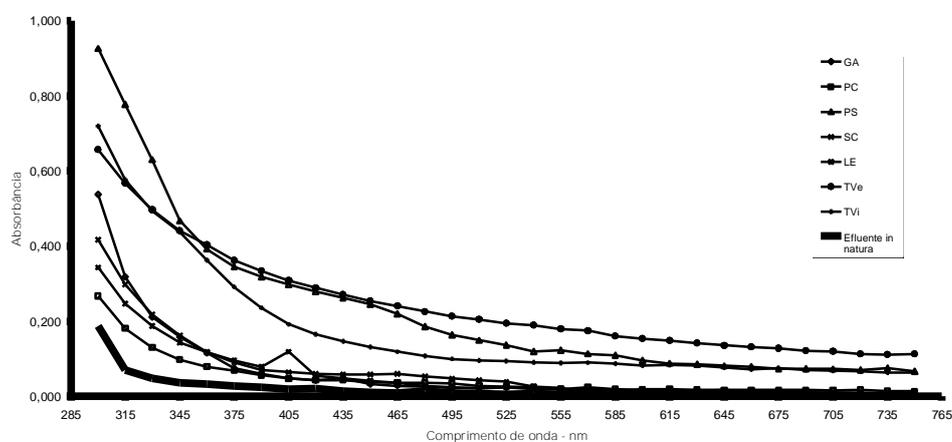
evolução do processo de tratamento do efluente, por meio do aumento de compostos fúngicos com maior absorbância na região do UV. Observando-se as espectros, a produção de cinabarina pelo *P. sanguineus* foi detectada sua síntese a partir de 48 h de tratamento, semelhantemente ao primeiro efluente coletado.



(25a)



(25b)



(25c)

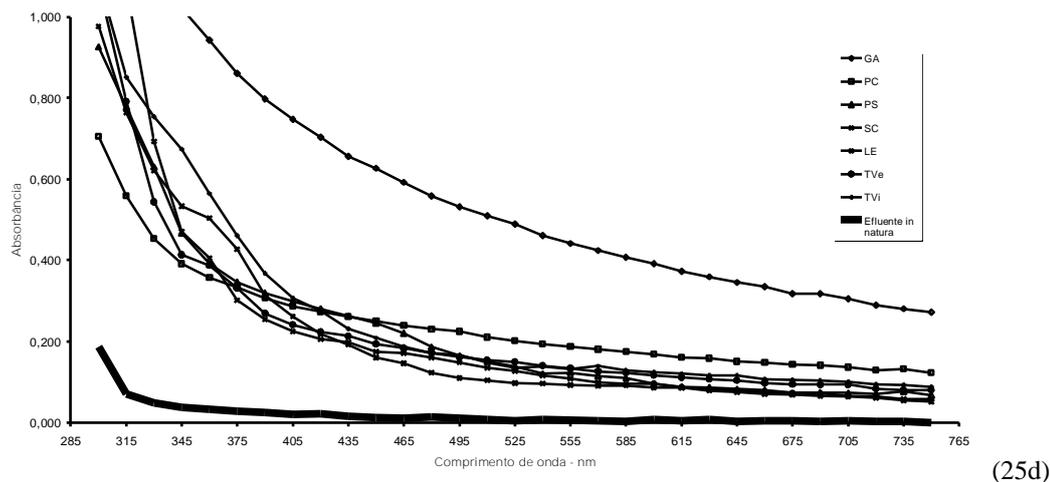


Figura 25– Espectro de 300 a 750 nm da Amostra 5 filtrado. (a) 24 horas de tratamento, (b) 48 horas de tratamento, (c) 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente *in natura* serve como comparação da modificação do efluente.

Após 96 h de tratamento, o fungo *G. applanatum* apresentou alta coloração, relativo a 437 % (medidos em 400 nm) de aumento em relação ao efluente *in natura*. O fungo *T. versicolor* também apresentou alta taxa de coloração em 96 h de tratamento, como também o *P. sanguineus*. Isso indica que o tratamento biológico aumenta consideravelmente a coloração do efluente tratado.

Em geral, a coloração do efluente aumentou significativamente mesmo em 24 h de tratamento, o que indicou que no processo biológico e a descoloração não se relacionaram, neste caso em estudo. Em geral, houve aumento da coloração do efluente tratado biologicamente, conforme também já registrado por Garg e Modi (1999), em que é sugerido que os processos biológicos podem aumentar a coloração do efluente tratado. Comparando-se com amostra 1, a Amostra 5 tem maior concentração de matéria orgânica, o que está intrinsicamente ligada à concentração de carbono e nitrogênio. Fontes de carbono tem grande importância para os fungos, pois a oxidação deles gera energia para a manutenção do seu metabolismo e a seletividade das fontes primárias de carbono diferencia-se em cada espécie fúngica. Além disso, uma fonte de nitrogênio prontamente assimilável é indispensável para o desenvolvimento fúngico (GARRAWAY; EVANS, 1984) e um equilíbrio ideal entre estes dois nutrientes no meio de cultura é um fator essencial para o crescimento e esporulação de fungos (LILLY; BARNETT, 1951).

A MnP sintetizada durante o tratamento foi quantificada, de acordo com a Figura 26. A produção de MnP foi menor, considerando-se o efluente 1 como referência, o que pode estar relacionado à maior quantidade de matéria orgânica nitrogenada presente no efluente, referindo-se à maior DQO apresentada pelo efluente 2. O fungo que apresentou maior

produção foi o T. versicolor em 24 h de tratamento. A figura 26 mostra a produção de MnP durante o tratamento do efluente.

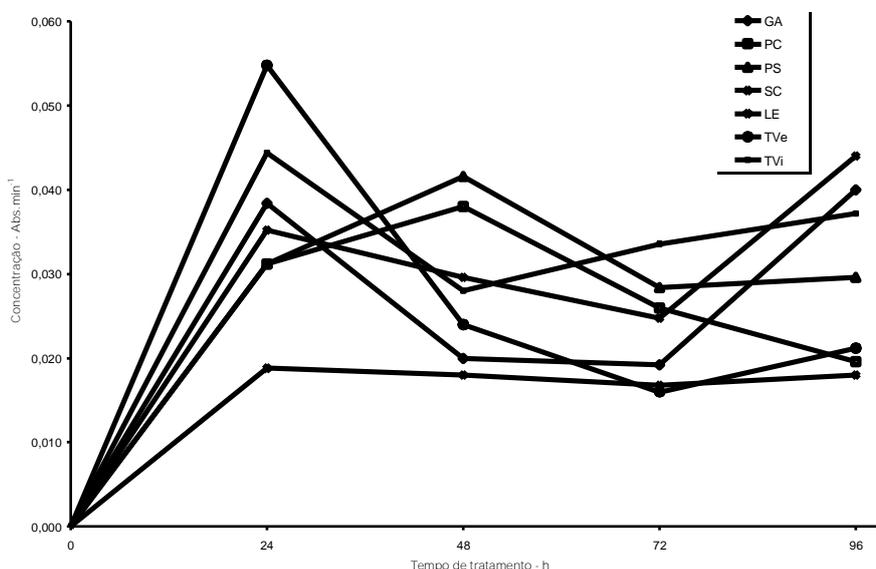


Figura 26 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da Amostra 5, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato.

A variação do pH durante o tratamento apresentou uma estreita faixa de variação em pH ácido, conforme mostra a figura 27. Essa variação de pH indica que o fungo produz biomoléculas que mantém essa condição química estável, ou que compostos da bioatividade fúngica apresentam acidez característica. A disponibilidade de nutrientes inorgânicos aumenta em pH's ácidos, como o ferro e outros metais de importância no metabolismo (GADD, 1999).

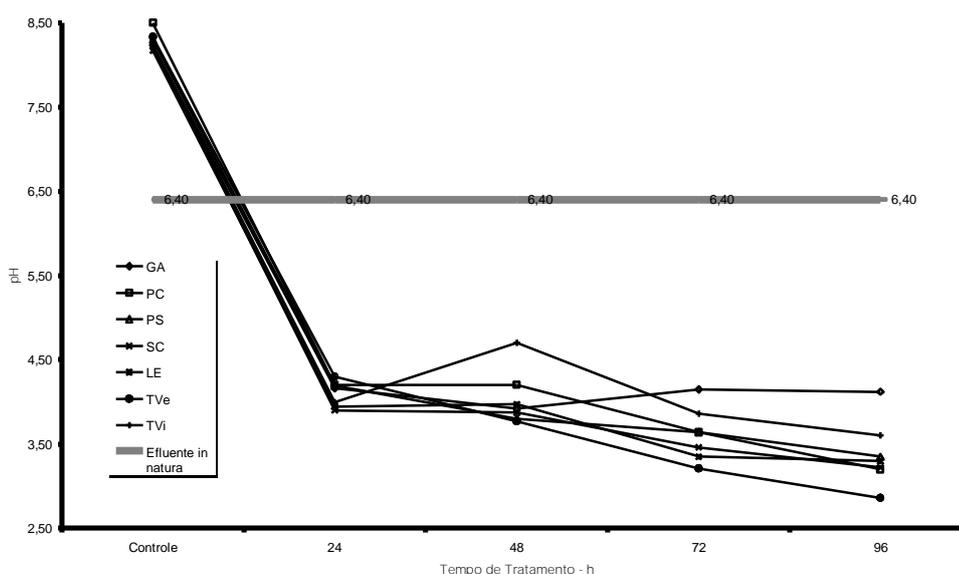
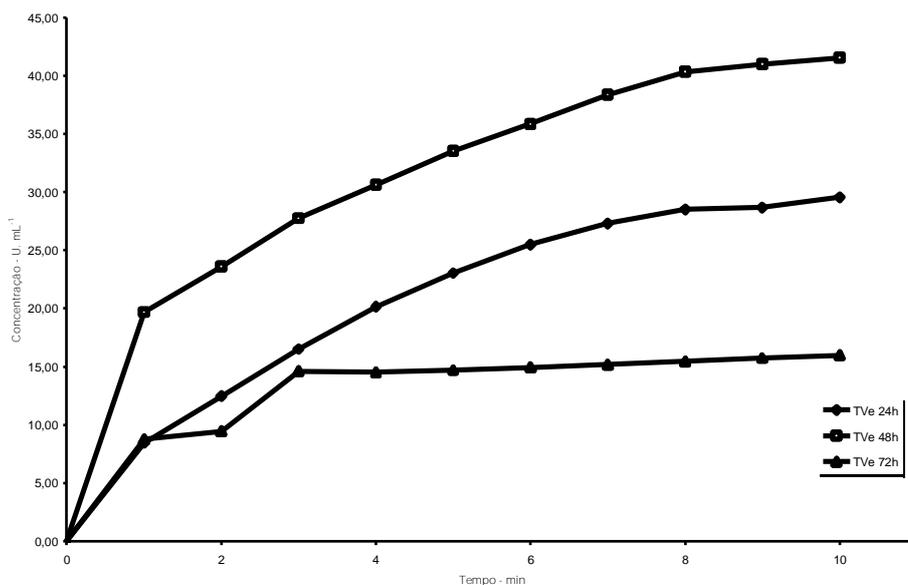
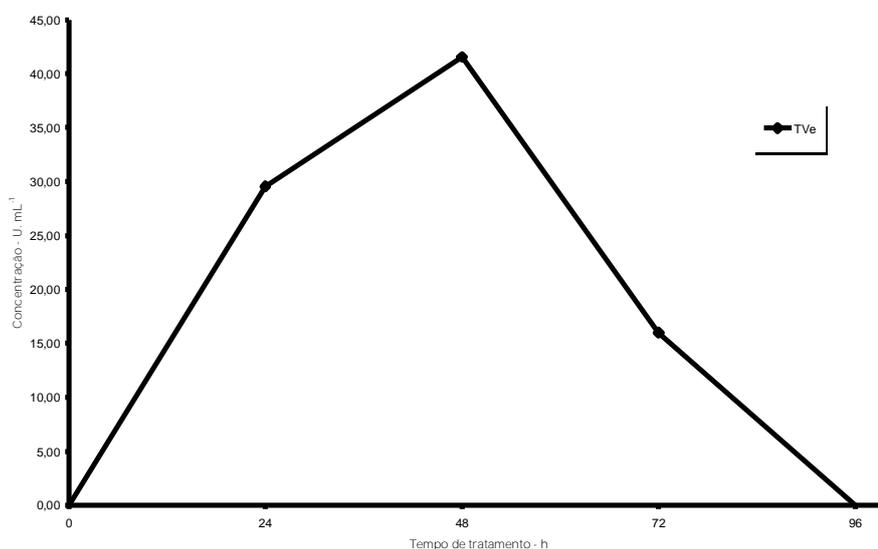


Figura 27 – Variação do pH da Amostra 5, durante o tratamento com os fungos. O pH do efluente *in natura* foi de 6,40.

A síntese da lacase também foi monitorada, de acordo com o gráfico 28, em que se mostra a cinética enzimática acompanhada durante 10 min e a produção da mesma durante o tempo de tratamento. Apenas o *T. versicolor* apresentou síntese de lacase, o que indica que em condições do efluente *in natura*, tanto os microrganismos presentes, quanto a inibidores não foram capazes de inibir a síntese enzimática da lacase. A cinética enzimática apresentou certa uniformidade, mesmo se tratando de uma enzima não purificada.



(28a)



(28b)

Figura 28 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da Amostra 5, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.

Não foi determinada a atividade de LiP durante o tratamento e nem mesmo houve produção desta enzima no meio de cultura sólido. Em nenhuma forma de tratamento foi

detectada essa enzima, o que pode ser explicado pela falta de um indutor (lignina) ou mesmo a baixa concentração de oxigênio presente no efluente original. Belinky et al. (2003) associa a concentração de oxigênio à síntese de LiP. Como na amostra 2, o oxigênio dissolvido na amostra foi igual a zero, o que pode ter sido um indutor à síntese dessa enzima.

O decaimento da DQO (Figura 29), demonstrou que o *S. commune* foi capaz de degradar em 96 h de tratamento cerca de 97%, mas parte da PMS pode ser responsável pela DQO refratária, demonstrando que tal referência não representa dados concretos sobre a verdadeira degradação do contaminante. Como o sistema é heterogêneo (duas fases), o meio de cultura pôde ter sido liquefeito, alterando a DQO do sistema (curvas acima do valor 1,00) ou mesmo mostrando acréscimo da DQO. Comparando-se com o efluente 1, a relação entre as DQO's apresentada pelo efluente 2 demonstra que o fungo usou nutrientes contidos no próprio efluente para seu metabolismo primário e tratado, o que pode indicar que efluente com altas DQO's e DBO pode ser melhor para tratamentos biológicos, pois embora não se pôde quantificar DBO, principalmente pela provável presença de antibióticos, o efluente apresentou maior viabilidade de tratamento com os fungos. Embora o fungo *S. commune* e *G. applanatum* não apresentaram produção de lacase, houve significativa diminuição da DQO, o que pode levar a crer que sistemas enzimáticos não quantificados neste trabalho, como a tirosinase, ou mesmo sideróforos, têm uma importante atuação na degradação de poluentes. O tempo de tratamento também pode ter sido excessivo para o *P. chrysosporium* e *S. Comunne*, o que indica que o meio foi modificado (aumento de DQO e variação de pH), levando a crer que a busca de mais nutrientes pôde estar relacionado ao aumento de DQO (liquefação do meio de cultura).

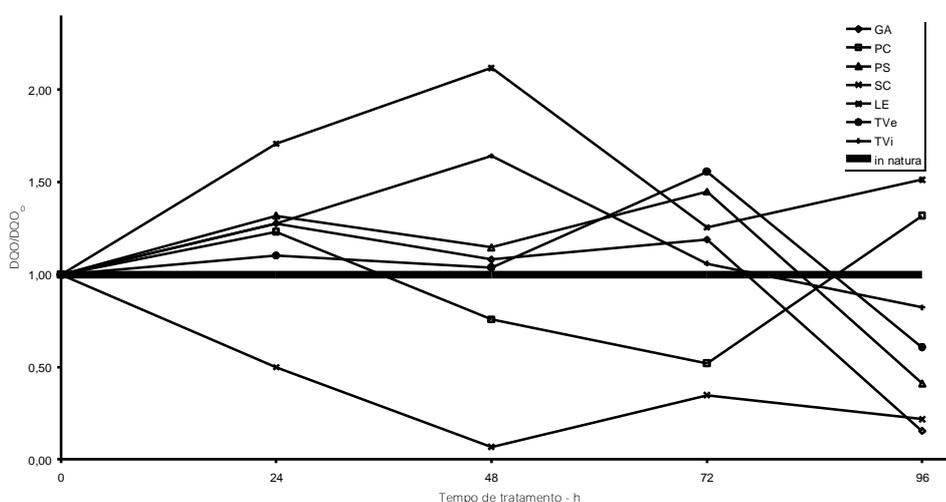


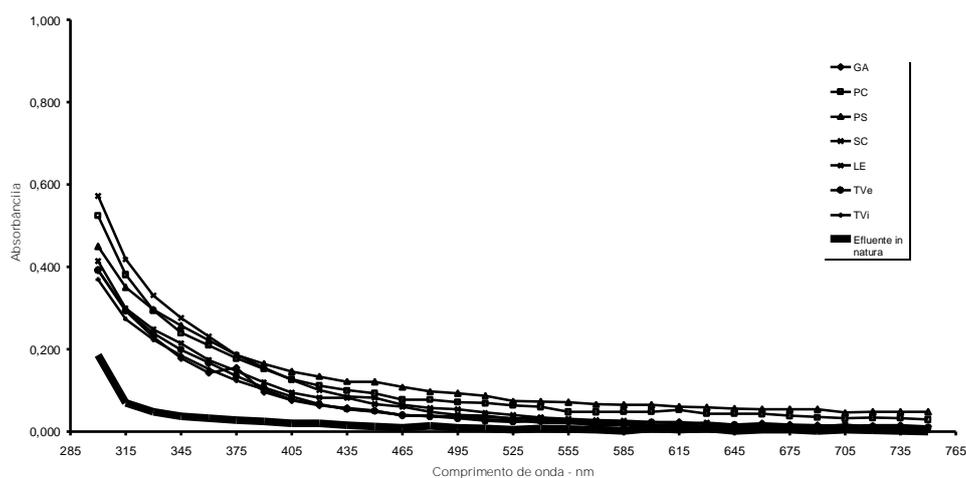
Figura 29 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da Amostra 5. A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente *in natura*.

6.1.2.2-Tratamento do Efluente Autoclavado

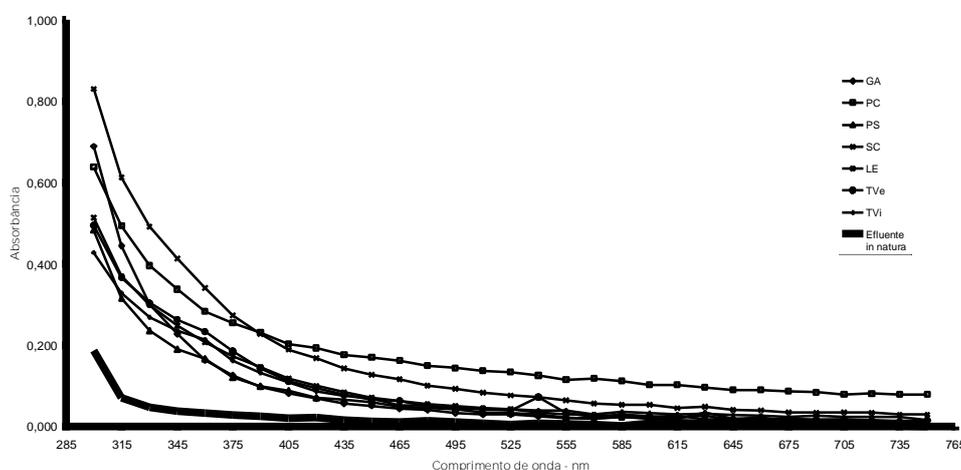
A fim de avaliar a interferência de microrganismos presentes no efluente *in natura*, o efluente foi autoclavado, nas mesmas condições de preparo dos meios de cultura. A figura 30 mostra o espectro dos caldos filtrados, sendo que o espectro do efluente *in natura* foi mostrada, para efeito de comparação.

Novamente, houve um aumento da coloração (400 nm) do efluente tratado biologicamente, independentemente do tempo de tratamento. Tal comportamento sugere que a ausência de microrganismos (além do fungo), aumenta a síntese de compostos fúngicos, diminuindo a concorrência por substratos facilmente assimiláveis. Comparando-se com a variação de pH (Figura 32) , a produção de ácidos orgânicos também está relacionado ao aumento da absorbância na região do UV (GADD, 1999).

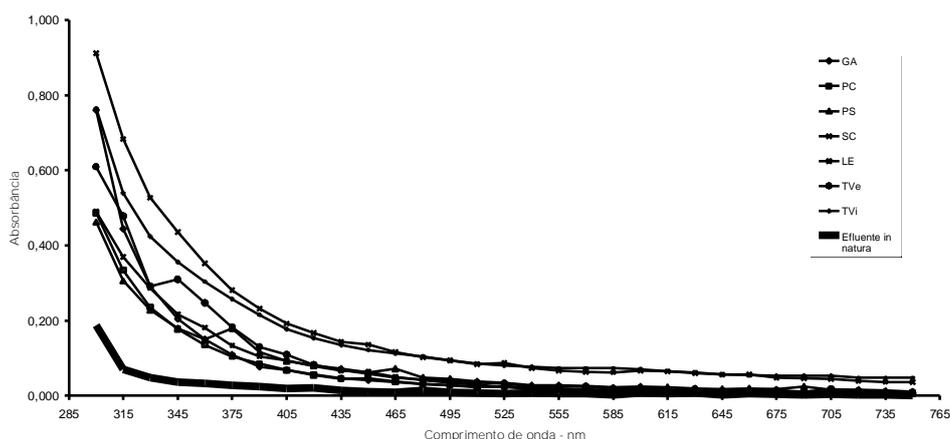
A síntese de cinabarina por *P. sanguineus* foi menor que no efluente *in natura* , , indicando pelo aumento da absorbância em 435 nm, comprimento característico no visível desse composto, que indica que a presença de microrganismos está diretamente ligada à produção desse antibiótico.



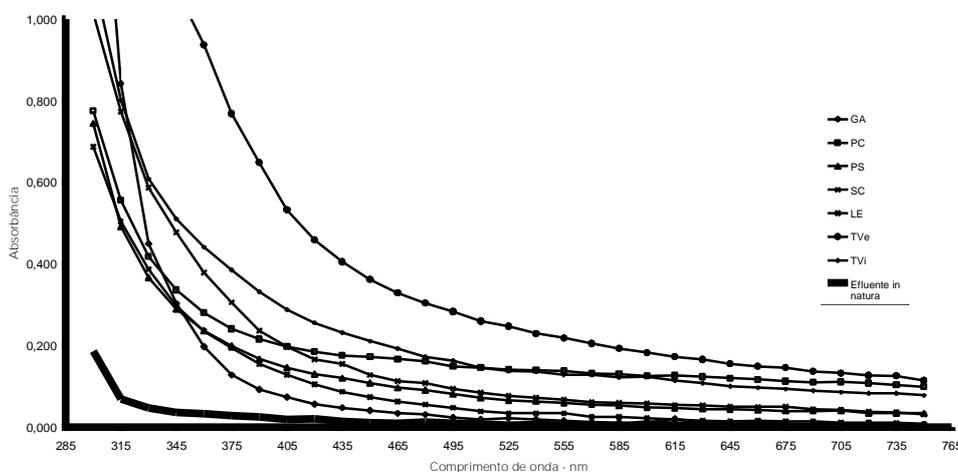
(30a)



(30b)



(30c)



(30d)

Figura 30– Espectro de 300 a 750 nm da Amostra 5 previamente autoclavada e posteriormente filtrada. (a) 24 horas de tratamento, (b) 48 horas de tratamento, (c) 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente *in natura* serve como comparação da modificação do efluente.

O aumento da coloração do caldo filtrado, indicou que o *T. versicolor* aumentou a coloração do em 2565 % (medidos em 400 nm) comparado com o efluente original, indicando que o processo biológico aumenta a coloração do efluente tratado, mesmo sem a presença de microrganismos, ou seja, nessas condições, microrganismos presentes no efluente é mais importante na inibição ou indução de síntese enzimática, o que pode ser comprovado com a detecção e quantização das enzimas em estudo, conforme as condições.

A MnP produzida durante o processo de tratamento biológico é mostrada na Figura 31. O fungo que apresentou maior produção foi o *L. edodes* em 72 h de tratamento, diferentemente do que foi notado no tratamento do efluente *in natura*.

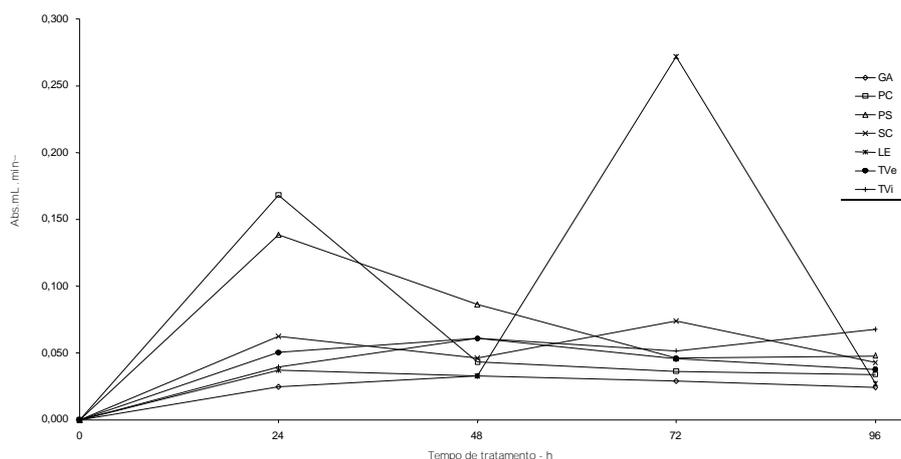


Figura 31 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da Amostra 5 autoclavada, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato.

A presença de microrganismos e a modificação do efluente devido ao processo de desinfecção podem ter efeito sobre a síntese de tal enzima, ou também a disponibilidade maior de contaminantes orgânicos pode estar relacionada à maior produção enzimática. Nestas condições, apresentou-se maior produção de MnP que o efluente *in natura*.

A variação do pH foi monitorada, de acordo com a Figura 32. Nestas condições, a faixa de pH final está mais ácida que no efluente *in natura* (6,4), o que pode indicar que a mudança de pH para faixas mais ácidas está relacionada a processos de desinfecção usando antibióticos naturais ou outras biomoléculas. A faixa de pH final do tratamento se encontra na faixa ideal de atividade enzimática de lacase, MnP e LiP, conforme já apresentado.

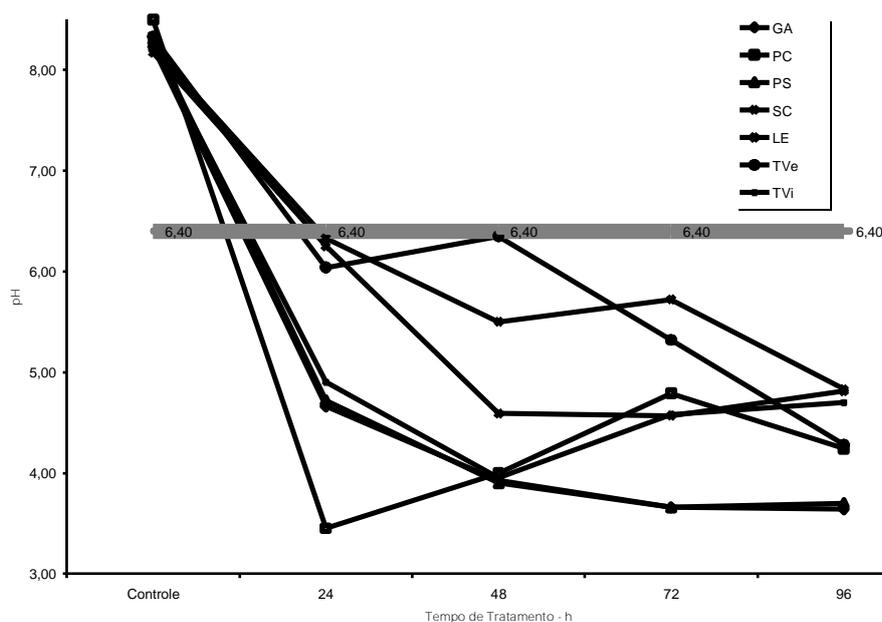
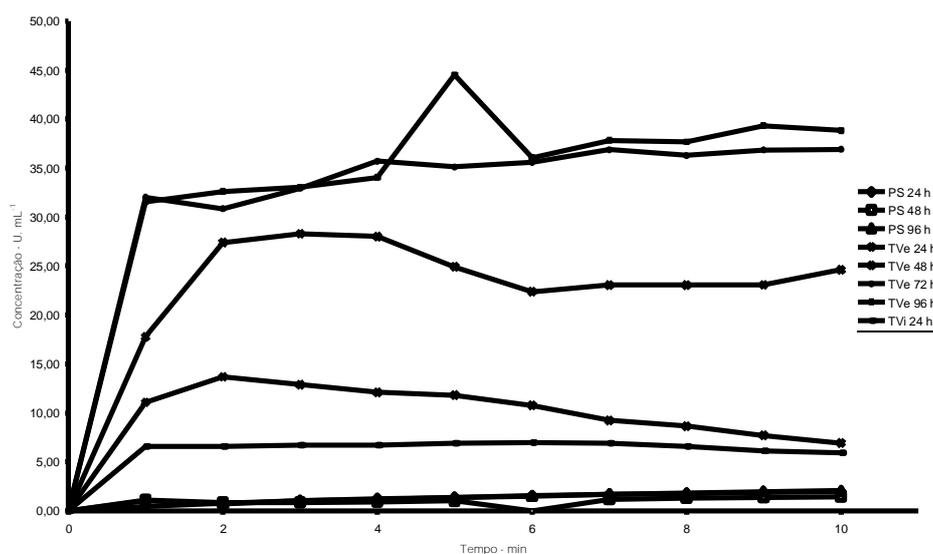
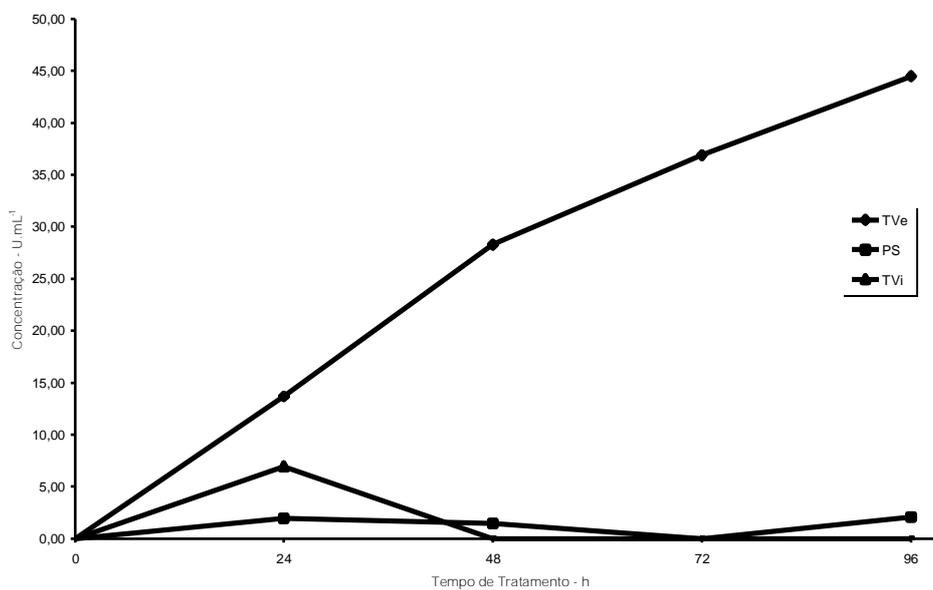


Figura 32 – Variação do pH da Amostra 5, durante o tratamento com os fungos, com efluente autoclavado. O pH do efluente *in natura* foi de 6,40.

A produção de lacase é apresentada na figura 33. Nas condições apresentadas, a produção de lacase foi determinada em três fungos, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus*, sendo que o *T. versicolor* apresentou maior produção que no efluente *in natura*, mas ao se notar que outros fungos sintetizam lacase, conclui-se que a presença de microrganismos pode inibir a síntese enzimática, de *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus*.



(33a)



(33b)

Figura 33 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da Amostra 5 autoclavada, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.

O decaimento da DQO (Figura 34), demonstrou que o *P. chrysosporium* foi capaz de degradar em 96 h de tratamento, cerca de 61 %, mas parte da PMS pode ser responsável

pela DQO refratária, demonstrando que tal referência não representa dados concretos sobre a verdadeira degradação do contaminante.

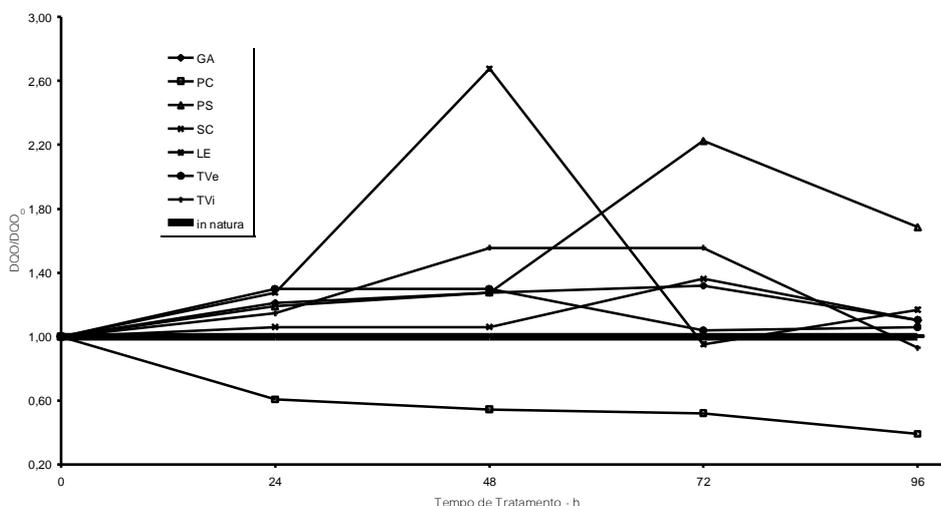


Figura 34 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da Amostra 5 . A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente , usando efluente autoclavado.

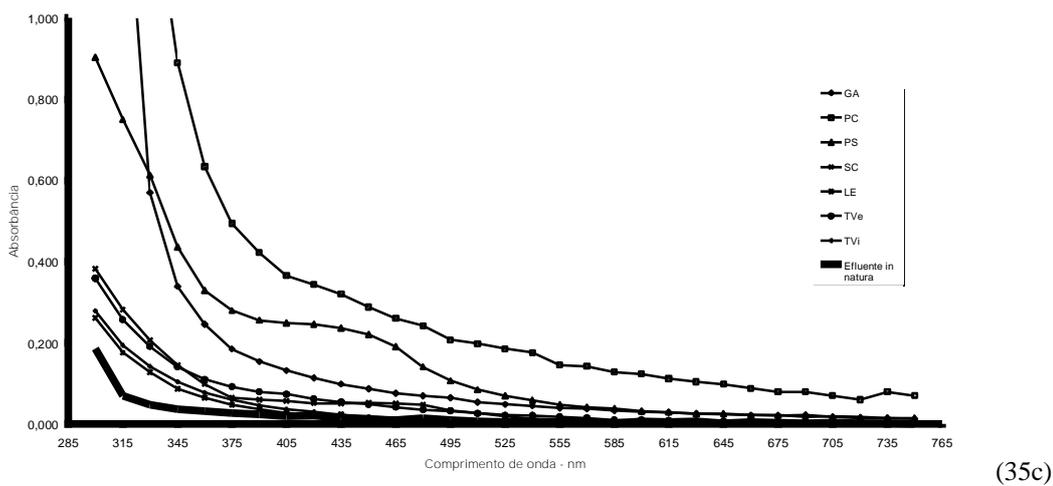
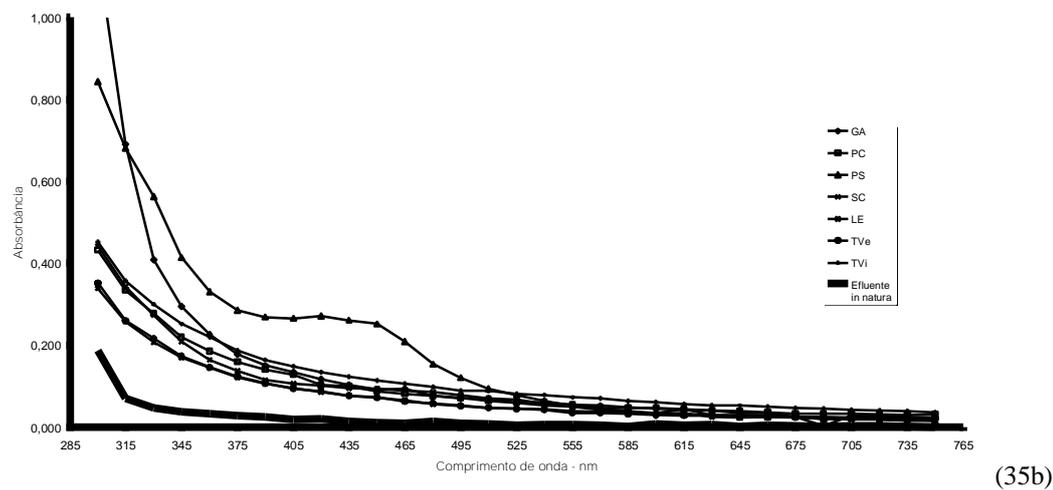
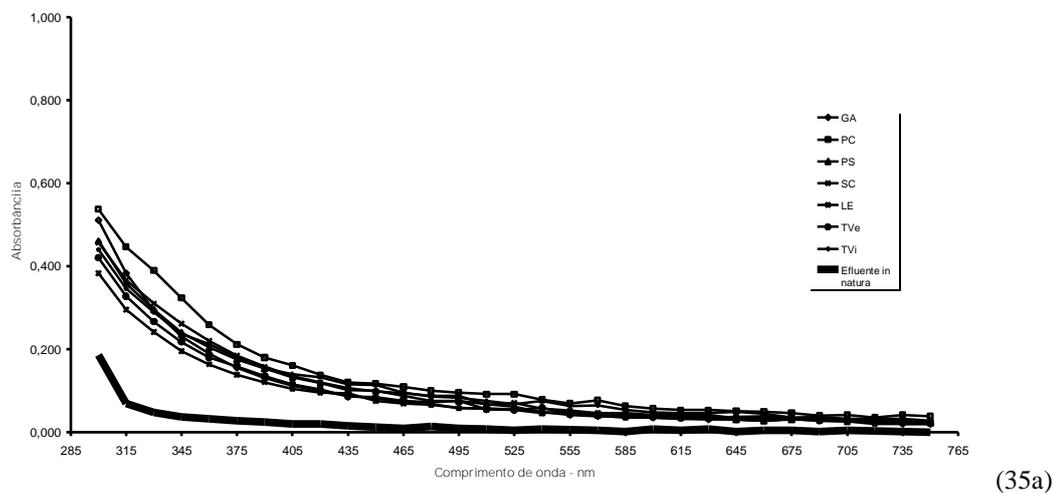
Como o sistema é heterogêneo (duas fases), o meio de cultura pôde ter sido liquefeito, alterando a DQO do sistema (curvas acima do valor 1,00). Comparando-se com o efluente *in natura*, a relação entre as DQO's apresentada não apresenta correlação entre o fungo que apresenta melhor performance na degradação e a síntese de lacase, o que indica que outros sistemas (enzimáticos e não enzimáticos) estão relacionados ao processo de degradação do contaminante orgânica solúvel. Embora a síntese da lacase não pudesse ser relacionada com a degradação do poluente, devido à PMS, os dados apresentados indicam que o que o *P. chrysosporium* utilizou preferencialmente os contaminantes do efluente como fonte de carbono e nitrogênio para a manutenção de seu metabolismo.

6.1.2.3-Tratamento do Efluente com indução em meio sólido

O espectro dos caldos filtrados revelou que a cinabarina começou a ser produzida a partir de 48 h de tratamento (Figura 35).

A maior coloração do efluente tratado foi notada quando se usou o *P. chrysosporium* e teve um aumento de cerca de 2900% em 96 h de tratamento, sendo que o fungo que apresentou menor coloração foi o *Lentinus edodes* em 72 h de tratamento (medido em 400 nm). Como já constatado em outras partes de nosso estudo, a coloração do efluente tornou-se maior com o passar do tempo de tratamento, novamente demonstrando que o tempo de retenção e a disponibilidade de nutrientes pode aumentar os PMS.

Conforme mostrado na amostra 1, a indução do meio sólido faz com que o *P. sanguineus* começasse a sintetizar cinabarina em meio sólido, sendo que em meio líquido, sua produção só foi detectada em 48 h de tratamento.



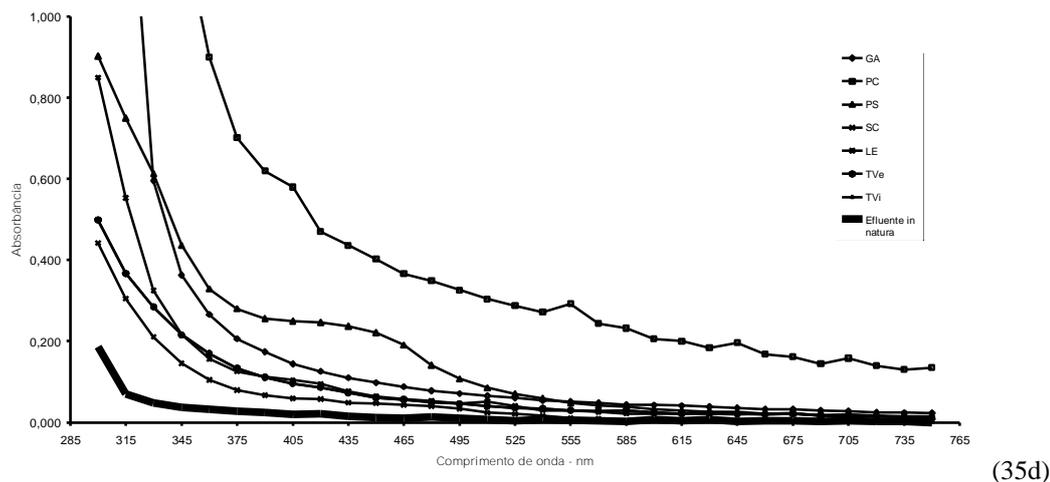


Figura 35– Espectro de 300 a 750 nm da Amostra 5 filtrada, com indutor em meio sólido. (a) 24 horas de tratamento, (b) 48 horas de tratamento, (c) 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente *in natura* serve como comparação da modificação do efluente.

A produção de MnP e de LiP foi praticamente nula, o que pode indicar que contaminantes nitrogenados, bem como a falta de oxigênio dissolvido no efluente (BELINKY et al., 2003) o que pode ter inibido a síntese dessas enzimas, bem como presença da H_2O_2 pode ser um fator de inibição da atividade enzimática, principalmente para a MnP (PAICE et al., 1992).

A Variação de pH dos caldos filtrados foi acompanhada, conforme mostra a Figura 36.

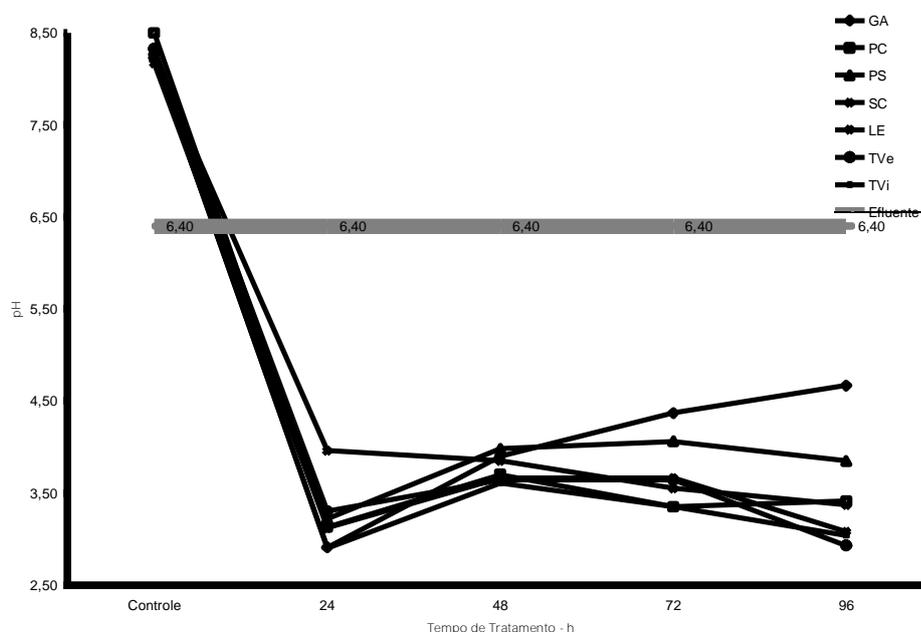
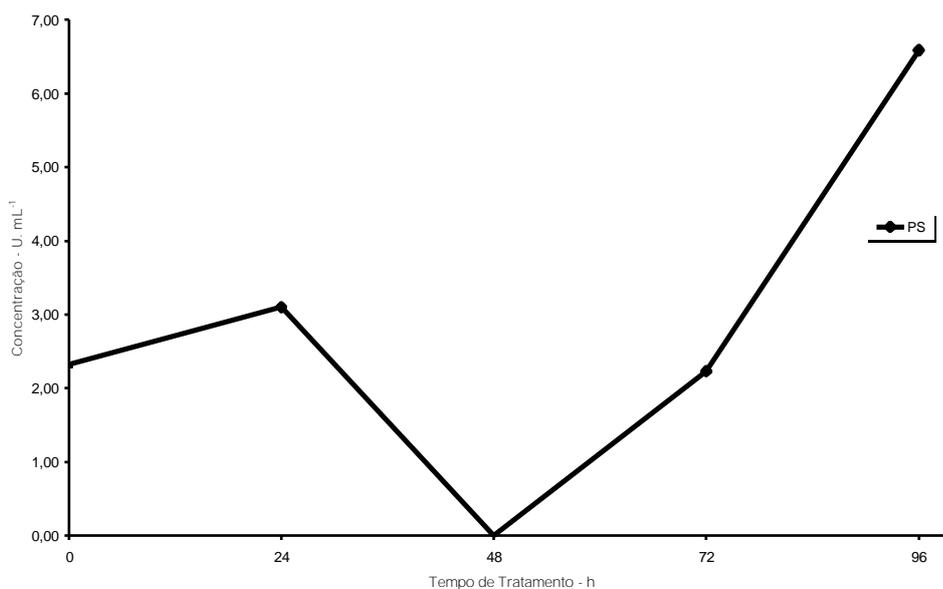


Figura 36 – Variação do pH durante o tratamento com os fungos, com indutor em meio sólido. O pH do efluente *in natura* é 6,40.

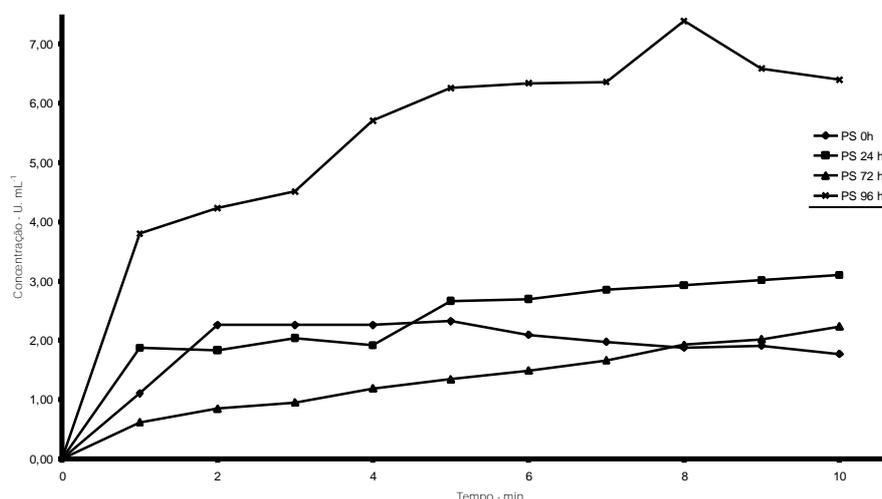
Os caldos apresentaram uma faixa estreita de pH entre 2,90 a 4,00; o que indica que o pH ideal para o crescimento de seu micélio e ideal para as enzimas LiP, MnP e lacase

(WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003), pois o pH ácido também se manteve até em 96 h de tratamento. Como já foi registrado em outras formas de tratamento, o pH ácido pode estar relacionados a muitos fatores para garantir o metabolismo estável dos fungos.

A produção de lacase foi iniciada ainda na placa contendo meio sólido e indutor, como demonstra a Figura 37. Excepcionalmente, o único fungo que apresentou produção foi o *P. sanguineus*.



(37a)



(37b)

Figura 37 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da Amostra 5, com indutor em meio sólido, em relação ao tempo de reação. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.

O decaimento da DQO mostrou os fungos *P. sanguineus* e *L. edodes* apresentaram a degradação de 61 %, demonstrando que o *L. edodes* possui um sistema de degradação que não envolve lacase, MnP e LiP, entretanto mesmo o *P. sanguineus* também apresenta

diferenciado sistema de degradação pois, comparando-se com o tratamento do efluente autoclavado, houve produção de lacase, mas a performance degradativa de quando se usou o indutor em meio sólido foi melhor. A Figura 38 mostra a relação de DQO, quando se usou o efluente contendo fenol como meio de indução enzimática. Embora as concentrações de fenol em ambos efluentes sejam relativamente próximas, outros compostos interferiram no metabolismo fúngico.

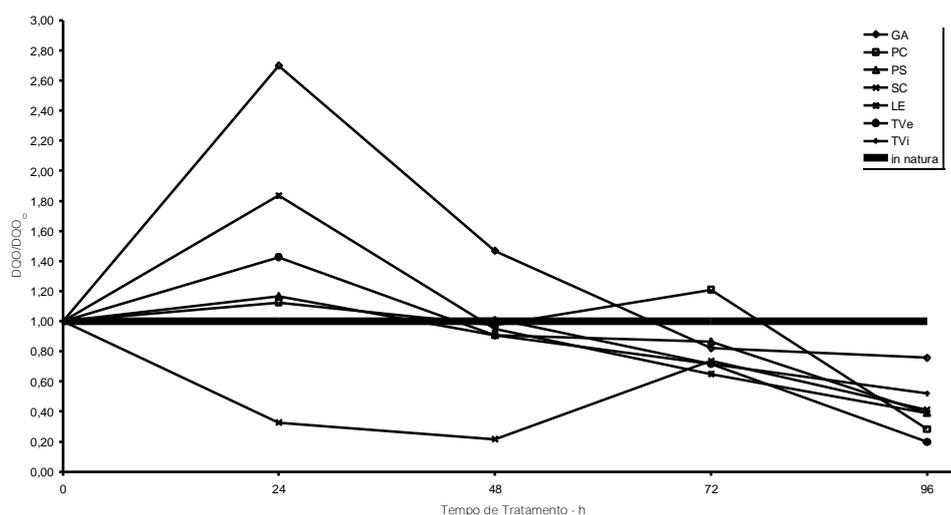
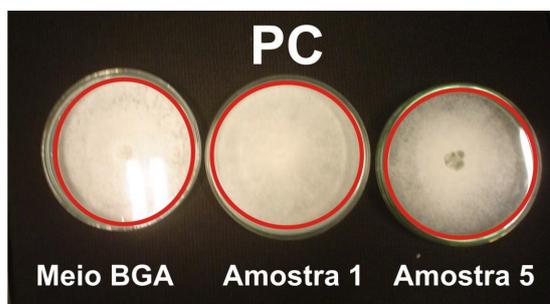


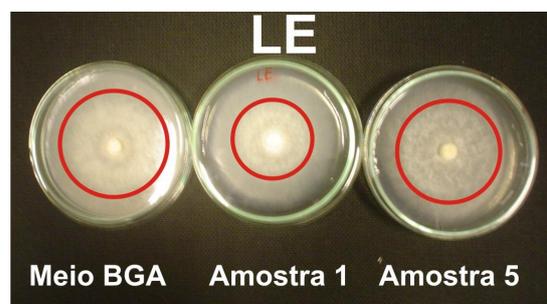
Figura 38 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da Amostra 5. A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente, usando efluente tratado com indutor em meio sólido.

6.2-Efeito da Indução no Meio Sólido no Crescimento Micelial

A troca da água destilada pelo efluente contendo fenol para a preparação do meio de cultura em meio sólido teve grande impacto no crescimento micelial, exceto para os fungos *Ganoderma applanatum* e *Schizophyllum commune*, pois em cinco dias de crescimento, os dois fungos tiveram o crescimento micelial em 100% da placa de petri de valor médio diametral de 10,0 cm. A Figura 40 demonstra a relação do crescimento micelial dos fungos que foram afetados pela substituição do meio de cultura sólido.



(39a)



(39b)

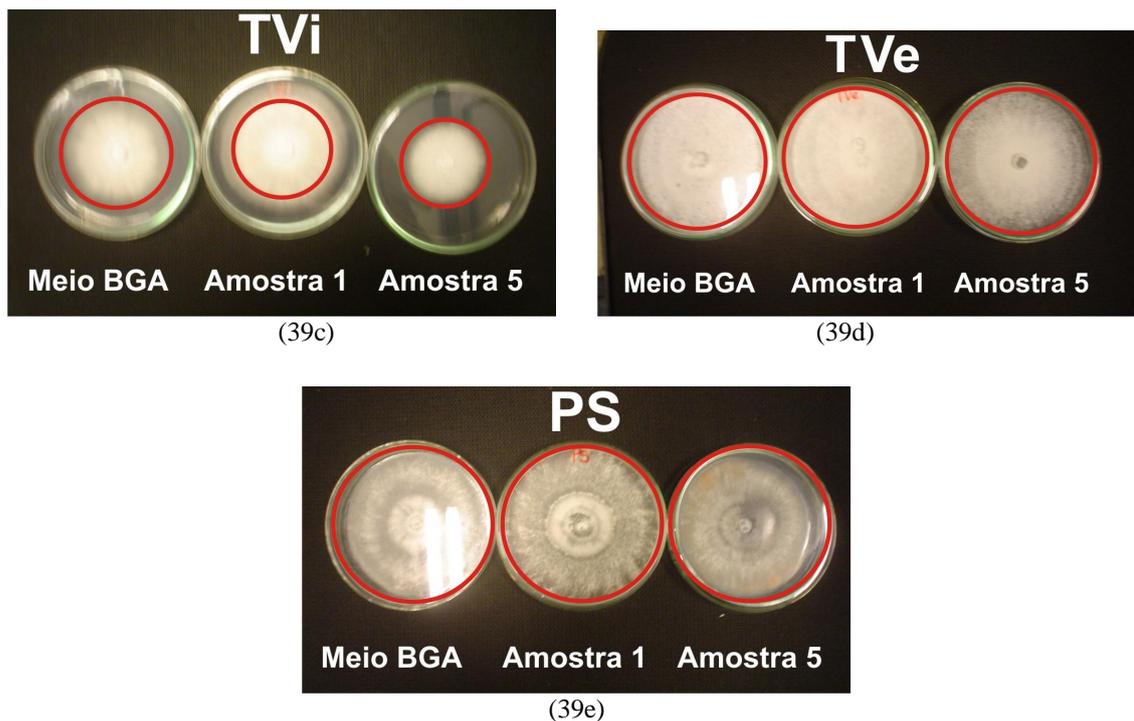


Figura 39 – Fotos comparativas dos meios sólidos, utilizando-se o meio BGA e meios com indução das amostras 1 e 2. (a) *P. chrysosporium* (b) *L. edodes* (c) *T. villosa* (d) *T. versicolor* e (e) *P. sanguineus*

Os fungos *P. chrysosporium*, *T. versicolor* e *L. edodes* apresentaram crescimento radial semelhante ao do meio BGA, mas com redução de massa micelial, comprovando que o uso do efluente dois com o indutor em meio sólido não teve o resultado indutor esperado. O fungo *P. sanguineus* apresentou a produção de cinabarina usando-se o efluente dois (manchas amarronzadas) e produção de lacase na própria placa ($2,32 \text{ U. mL}^{-1}$), diferentemente do efluente um, que não apresentou produção de cinabarina e nem de lacase.

A Tabela 2 mostra a porcentagem de crescimento micelial entre as formas usando o BGA, amostra 1 e 5 como indutores em meio sólido.

Tabela 2 – Relação do crescimento micelial, nos meios de cultura sólidos BGA, com indutor em meio sólido com amostra 1 e 5.

Fungo	BGA (%)	Amostra 1 (%)	Amostra 5 (%)
GA	100	100	100
LE	100	80	90
PC	100	100	100
PS	100	100	100
SC	100	100	100
TVe	100	100	100
TVi	80	45	60

6.3-O Método Fotocatalítico

6.3.1-Tratamento da Amostra 1

O método degradativo fotocatalítico foi otimizado, tendo com base a diminuição da absorbância medida em 400 nm e 300 nm, após 5 min de tratamento. Os melhores resultados de diminuição de absorbância em 400 nm e 300 nm foram obtidos usando-se 450,00 mL de efluente *in natura*, 0,1 g de TiO₂, 180,00 mL.min⁻¹ de ar, agitação e temperatura constante a 28° C. Também foi efetuada a fotólise, para se comprovar que a degradação pela fotocatalise heterogênea é o método degradativo mais importante, conforme a Figura 40.

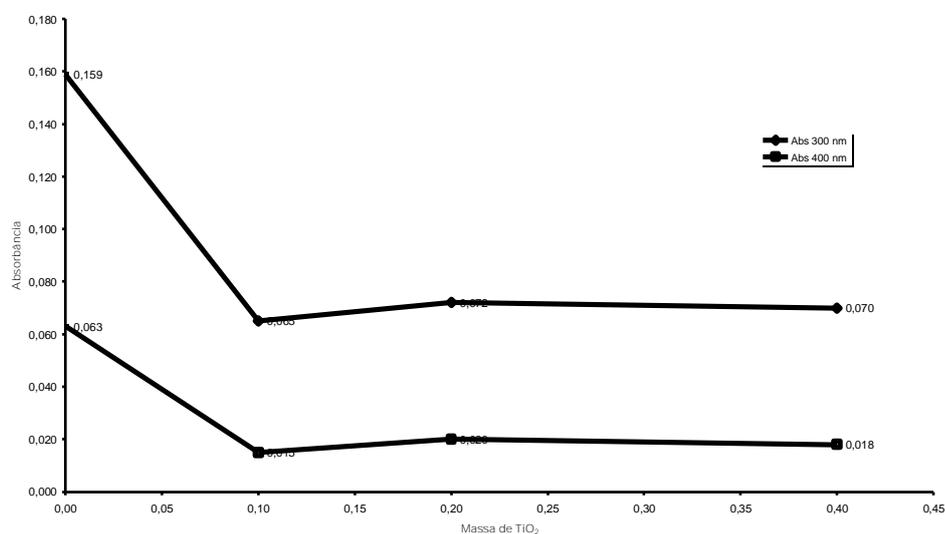


Figura 40- Variação da absorbância da amostra 1 tratada fotocataliticamente após 5 min e temperatura mantida a 28°C, de acordo com a variação da massa do catalisador usado em 450,00 mL de efluente.

O reúso do catalisador foi estudado, sendo que após cinco vezes de uso, o mesmo apresentou perda de 25 % da capacidade catalítica, que pode ser explicado pela oxidação do mesmo, devido ao pH ácido do meio, bem como a própria oxidação do óxido (PERALTA-ZAMORRA et al., 1998 e ZIOLLI; JARDIM, 1998).

A oxidação do efluente foi acompanhada espectrofotometricamente, nos mesmos comprimentos de onda dos estudos biorremediativos, conforme Figura 41. Notou-se uma diminuição gradativa tanto nos comprimento de onda do visível, quanto no UV, indicando que a matéria orgânica era também oxidada, sem importantes gerações de intermediários até catorze minutos de tratamento, após 16 minutos de tratamento, começou-se a mudar o comportamento da curva de absorbância, o que pode ser explicado pela polimerização e oxidação de compostos nitrogenados (PELEGRINI,1999).

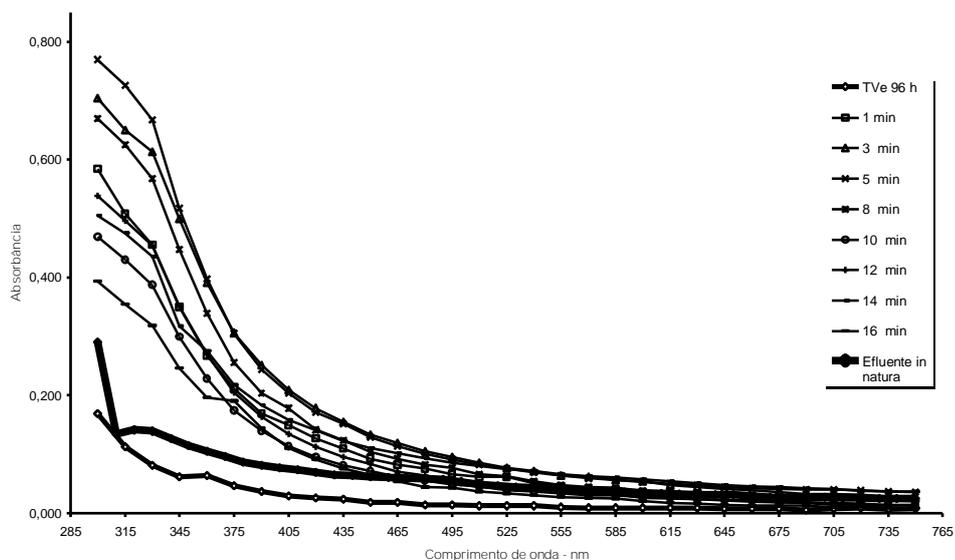


Figura 41 – Espectro de 300 a 750 nm da amostra 1 tratada fotocataliticamente. O espectro do efluente *in natura* serve como comparação da modificação do efluente.

A variação do pH durante o tratamento fotocatalítico foi monitorada, de acordo com a Figura 42, que o tratamento o pH tendeu a acidificar-se, fato já relatado por Pelegrini (1999), devido à formação de ácidos e liberação de CO₂ da mineralização do contaminante orgânico.

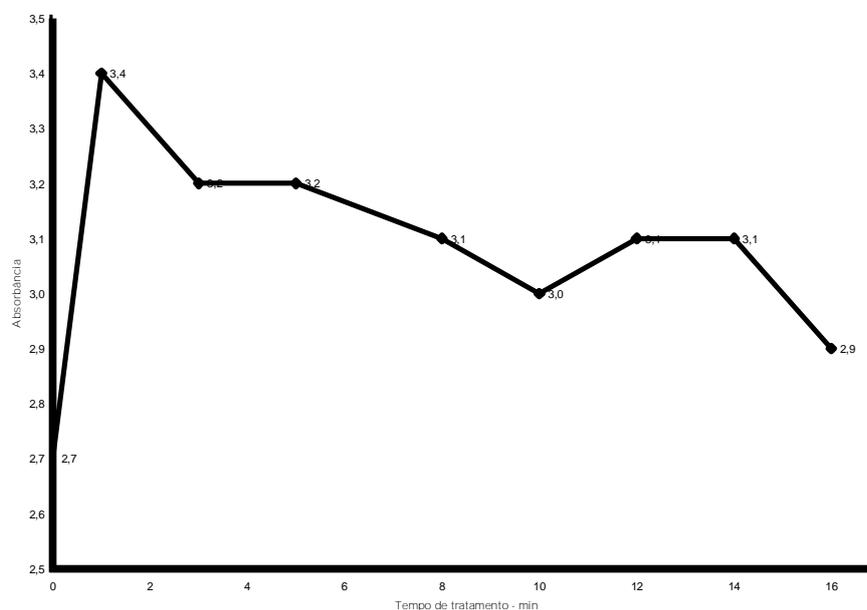


Figura 42 – Variação do pH da amostra 1, durante o tratamento fotocatalítico, usando-se 0,1 g de TiO₂.

A degradação do fenol foi acompanhada, conforme mostra a Figura 43, usando-se o método espectrofotométrico. A partir de oito minutos de tratamento, o fenol contido no efluente foi degradado em 50%, em relação à concentração inicial. Tal rapidez de

mineralização está relacionada ao pH do efluente, que viabiliza a degradação deste composto. A concentração do fenol se reduziu a 50 % em 8 min de tratamento, sendo que em 30 min, a concentração de fenóis totais foi de apenas 11% da concentração inicial, representando uma eficiência de remoção de fenol do efluente de 89 %. Tal degradação mostrou ser bastante eficiente, comparado a um estudo que Ziolli e Jardim (1998), em que demorou-se 2 h para degradar o fenol contido numa solução de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, mostrando sinergismo entre contaminantes, favorecendo a degradação (BERVOETS et al., 1996; VANEGAS et al., 1997).

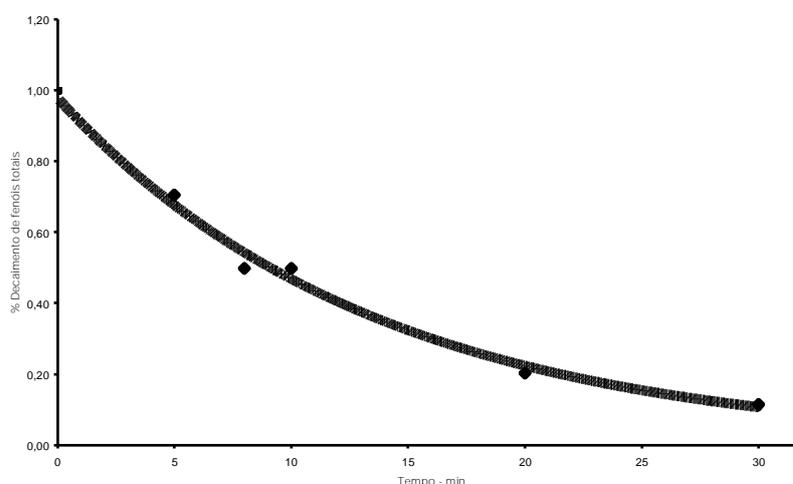


Figura 43 – Curva de decaimento de fenóis totais da amostra 1, acompanhado durante 30 min

O decaimento da DQO foi acompanhado, conforme a figura 44, o que indicou que no tempo de 8 min de tratamento, decaimento de 21%, diferentemente da taxa de decaimento de fenóis totais, mostrando que a fotocatalise é um método que apresenta alto potencial de degradação de fenóis em efluentes.

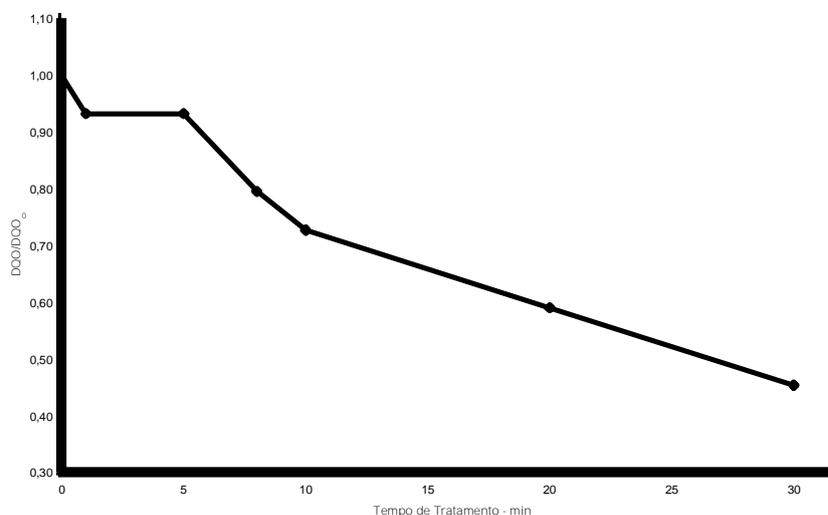


Figura 44 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial, durante o tratamento fotocatalítico da amostra 1.

6.3.2-Tratamento da Amostra 5

O processo de otimização do processo catalítico deu-se avaliando a diminuição da absorbância medida em 400 nm (valor máximo na região do visível, para o efluente). Optou-se por 0,200 g de TiO_2 , pois em 20 min de tratamento, a descoloração do efluente foi de 50%, embora nesse tempo de tratamento, a concentração de fenol foi apenas 16% da porção inicial do efluente *in natura* (Figura 45).

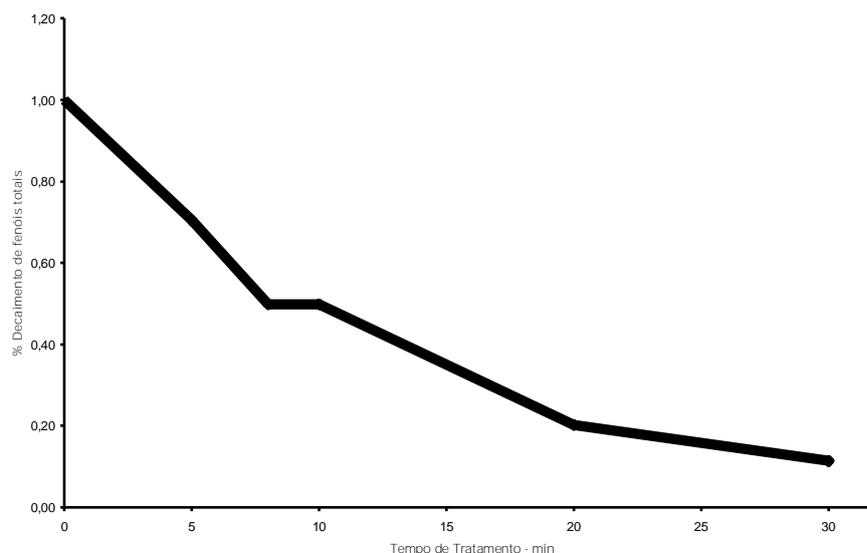


Figura 45 – Curva de decaimento de fenóis totais da Amostra 5 durante o tratamento fotocatalítico, acompanhado durante 80 min.

O decaimento da DQO, mostrou que a cinética de degradação de fenóis totais é diferente da cinética de diminuição de DQO, revelando que ambos não apresentam as mesmas taxas de diminuição, pois em 20 min de tratamento, a queda de DQO foi de 40% (Figura 46).

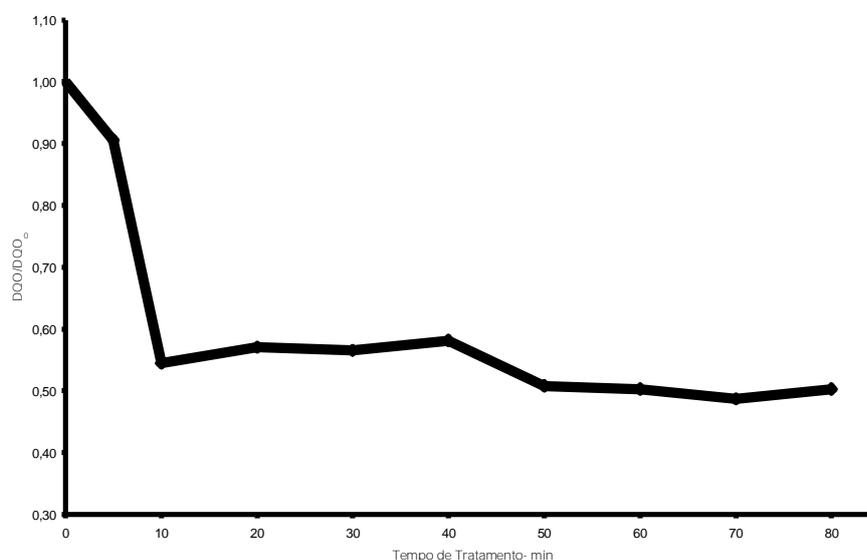


Figura 46 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial, durante o tratamento fotocatalítico da Amostra 5.

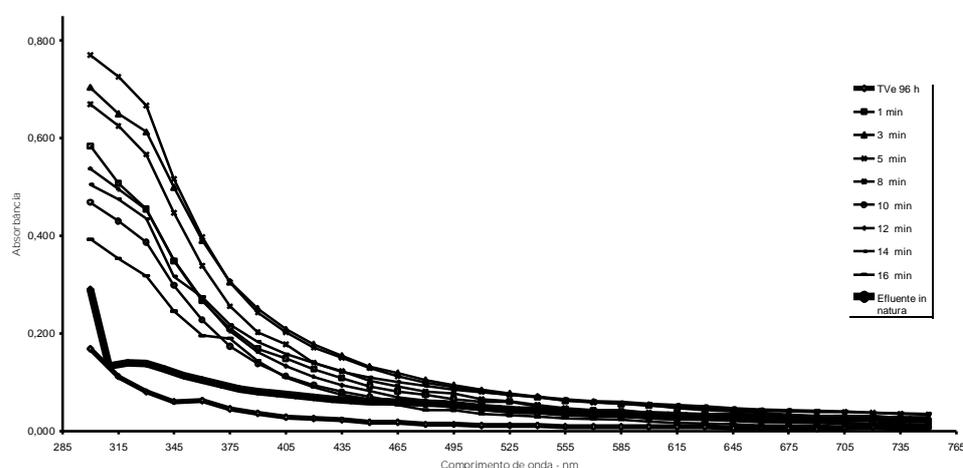
O comportamento da degradação dos contaminantes apresenta menores taxas a partir de 10 min de tratamento, indicando que os compostos de maior facilidade de degradação são oxidados primeiramente.

6.4- O Processo Combinado: Biológico e Fotocatálise

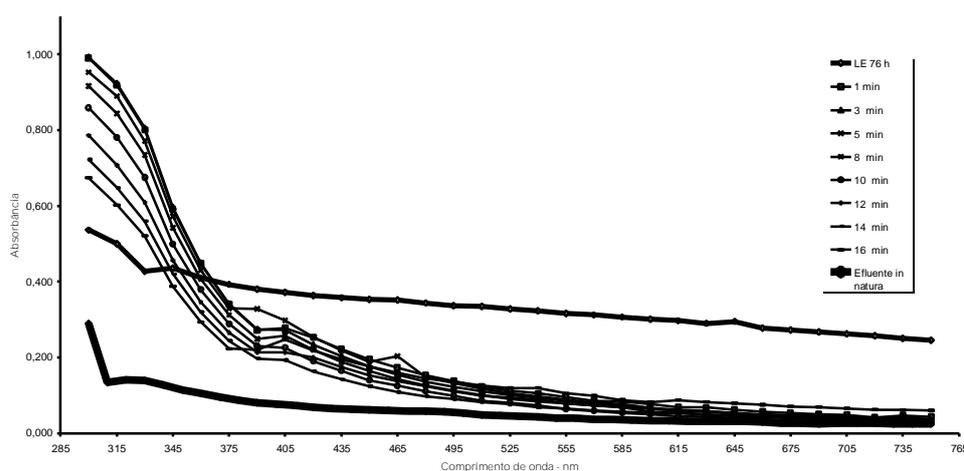
6.4.1- Tratamento da Amostra 1

Inicialmente, testou-se o do processo de tratamento biológico antes do tratamento fotocatalítico, usando-se o efluente *in natura* tratado com o fungo *Trametes versicolor*, tendo no meio de cultura a água substituída pelo efluente (indutor sintético), pois este apresentou a maior concentração de lacase em 96 h de tratamento ($16,67 \text{ U.mL}^{-1}$) e o outro fungo usado foi o *Lentinus edodes* (crescido em meio ágar-batata) com o efluente *in natura*, tratado em 72 h, pois este apresentou a maior redução de cor, avaliando a absorbância a 400 nm. A Figura 47 mostra o acompanhamento do processo fotocatalítico, do efluente previamente tratado com os dois fungos em estudo. Para a fotocatalise, o tempo de tratamento (0 a 16 min), a massa do catalisador (0,1 g), o volume do efluente (450,00 mL) foram os mesmos usados quando se tratou o efluente *in natura*, o que serve de comparação para a avaliação da eficiência do tratamento. A opção de se escolher 8 min de tratamento fotocatalítico foi devido à redução de 50 % de fenóis totais, pois além de ser uma possível fonte primária de carbono (PASSOS, 2006), ele pode servir de indutor para polifenoloxidasas (BOLLAG; LEONOWICZ, 1984)

Em ambos os tratamentos com os fungos foi registrado o aumento da absorbância, tanto no visível, quanto na UV-A, quando se compara com o efluente *in natura*, quando se compara com o efluente previamente tratado, o houve um aumento da absorbância na região do visível, quando se tratou o efluente com o *Trametes versicolor* e uma diminuição quando se tratou com o *Lentinus edodes*.



(47a)



(47b)

Figura 47 – Espectro de 300 a 750 nm da amostra 1 tratada com *Trametes versicolor* em 96 h de tratamento (22a) e com o *Lentinus edodes* 72 h(22b), com posterior tratamento fotocatalítico. Notar que O espectro do efluente *in natura* e do tratamento de biorremediativo serve como comparação da modificação do efluente.

Outro ponto analisado foi a variação do pH durante o tratamento, sendo que o tratamento biológico por fungos alterou sensivelmente o pH do sistema, indicando a bioatividade fúngica alterou a composição do efluente, conforme se mostra na Figura 48. O tratamento fotocatalítico alterou o pH para, em geral, para valores abaixo do pH inicial, mostrando assim que o tratamento fotocatalítico de um efluente biologicamente pré-tratado, também tende a gerar um efluente com pH mais ácido. Pelegrini (1999) também notou a diminuição do pH durante o tratamento oxidativo, explicando que a geração de ácidos inorgânicos fracos contribuem para tornar o pH mais ácido.

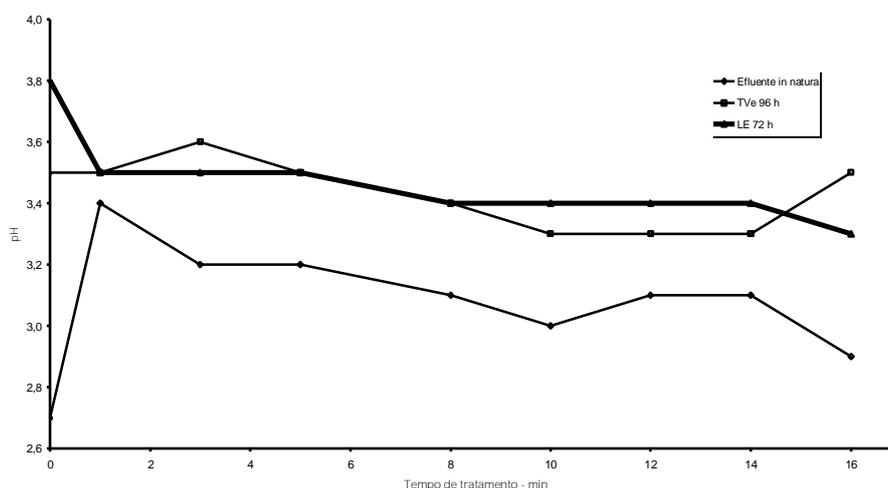
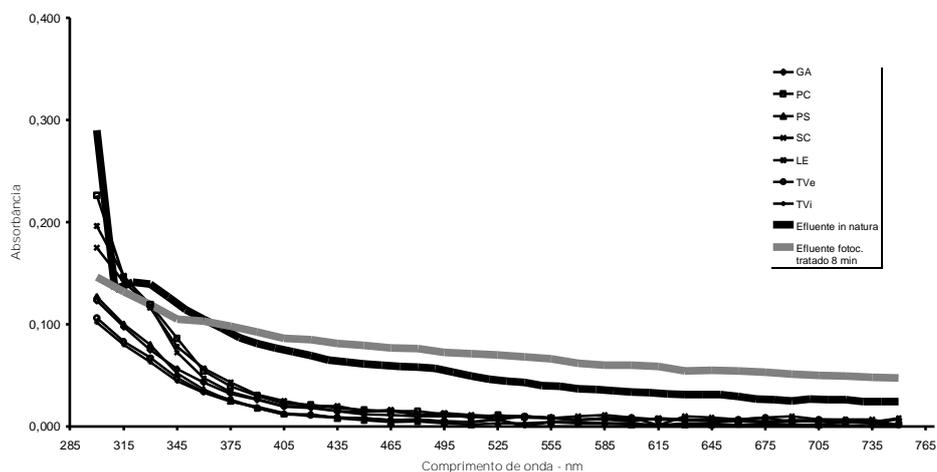


Figura 48 – Variação do pH durante o tratamento combinado da amostra 1, usando-se 450,00 mL de efluente e 0,1 g de TiO_2 , usando o efluente previamente tratado por *Lentinus edodes* em 72 h (LE 76 h) e *Trametes versicolor* (TVe 96 h).

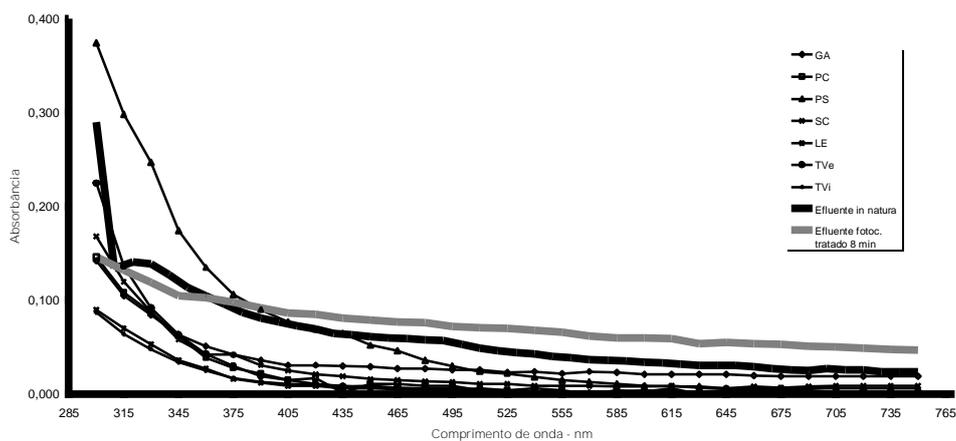
6.4.1.2 – Tratamento da Amostra 1: Fotocatálise Seguido de Tratamento Biológico

A segunda parte do tratamento combinado foi realizada utilizando-se o efluente tratado fotocataliticamente em sete minutos, conforme já citado. Escolheu-se esse tempo de

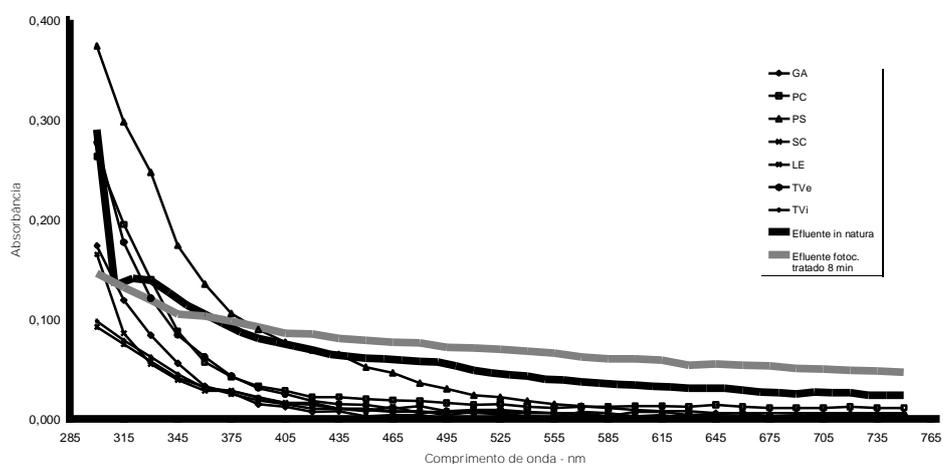
tratamento, pois a degradação do fenol foi de 50% neste tempo. O tratamento com os fungos foi monitorado espectrofotometricamente, de acordo com a Figura 49. Para efeito de comparação, inseriu a curva do efluente *in natura* e do efluente tratado fotocataliticamente em sete minutos.



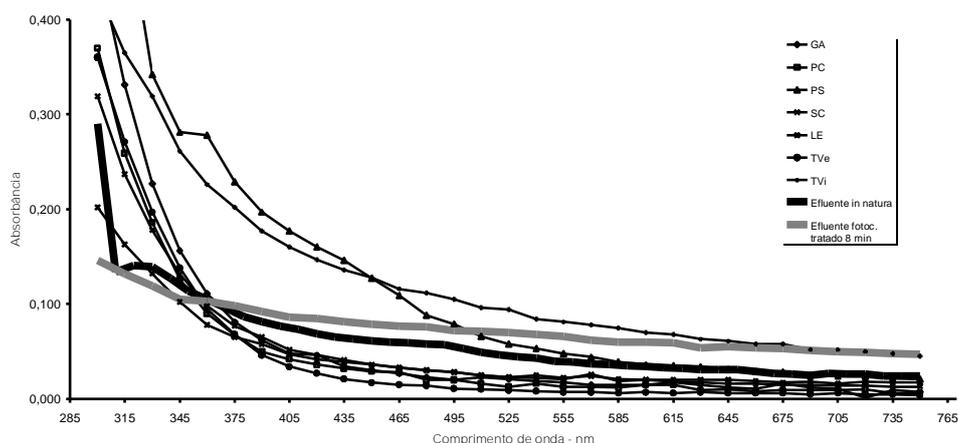
(49a)



(49b)



(49c)



(49d)

Figura 49 – Espectro de 300 a 750 nm da amostra 1 previamente tratada por processo fotocatalítico, durante oito minutos. (a) – 24 horas de tratamento, (b) – 48 horas de tratamento, (c) – 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. O espectro do efluente *in natura* e do tratado fotocataliticamente serve como comparação da modificação do efluente.

Nas primeiras 24 h de tratamento, o caldo filtrado apresentou redução de absorvância, verificado em todos o fungos. A partir de 72 h de tratamento, houve um aumento da absorvância, caso já citado por Aquino (2002), em que o tempo de tratamento se relaciona com o aumento da coloração do efluente tratado e aumento de PMS. O *P. sanguineus* apresentou maior coloração relacionada à cinabarina, a partir de 48 h de tratamento, caso similar às outras formas de tratamento não combinada.

A variação do pH dos caldos filtrados foi monitorado como mostra a Figura 50, sendo que o intervalo diminuiu, desde o início do tratamento, significando que compostos fúngicos foram produzidos em menor quantidade, o que também pôde ser comprovado pelo espectro. Nessa forma de tratamento combinado, o pH continuou ácido, sendo o valor mais alto monitorado de 4,1; do efluente tratado pelo fungo *Lentinus edodes* em 96 horas de tratamento.

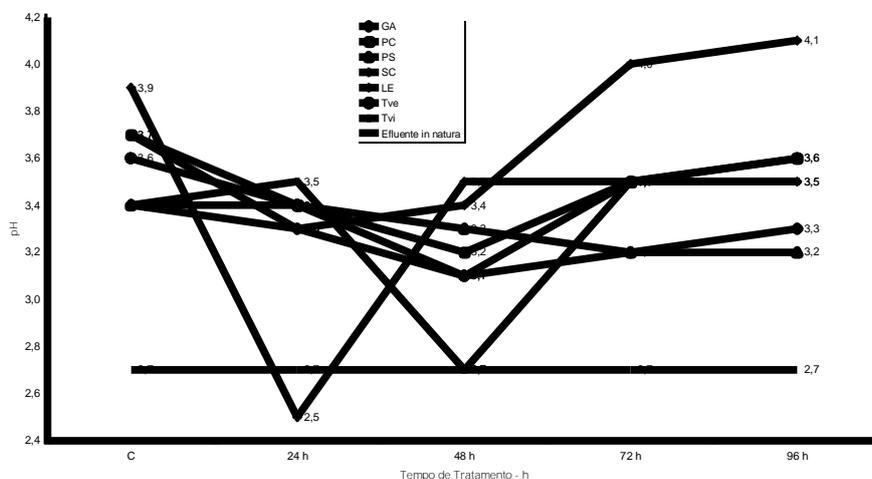


Figura 50 – Variação do pH da amostra 1 durante o tratamento biológico, usando-se o efluente fotocataliticamente tratado durante 8 minutos com 0,1 g de TiO_2 .

A determinação da atividade enzimática de manganês peroxidase também foi avaliada e comparando-se com a atividade quando se tratou com o efluente *in natura*, ela foi menor, sendo que somente três fungos produziram essa enzima. A Figura 51 mostra a atividade enzimática durante o tratamento combinado.

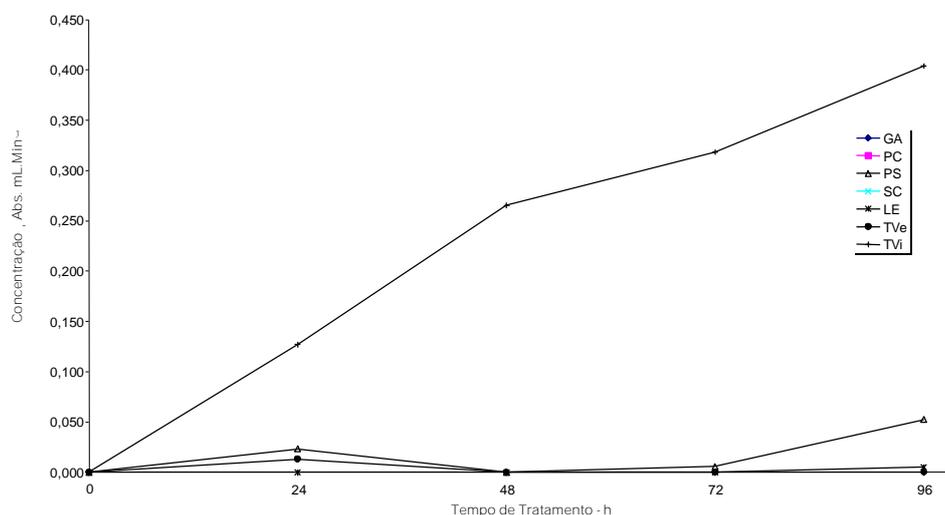


Figura 51 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da amostra 1 previamente tratado com fotocatalise em 8 min, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato.

Como o efluente foi previamente tratado, formas nitrogenadas mais fáceis de serem assimiladas podem ter sido geradas, aumentando a biodisponibilidade de compostos nitrogenados, inibindo a produção de MnP. Quando se usou o efluente *in natura*, o *Trametes villosa* teve a maior produção (0,404 Abs.mL.min⁻¹) e no tratamento com o efluente fotocatalítico prévio, não houve alteração da concentração dessa enzima.

A atividade da lacase foi acompanhada conforme mostra a Figura 52, mas o comportamento das curvas apresenta que o fungo *Pycnoporus sanguineus* em 96 horas de tratamento apresentou maior atividade enzimática em 3 minutos de reação (13,09 U.mL⁻¹), seguido do *Trametes villosa* em 24 horas de tratamento que apresentou concentração igual a 4,05 U.mL⁻¹.

As curvas apresentaram comportamento muito diferente dos outros processos de tratamento biológico, sugerindo que cada fungo reage diferentemente ao mesmo processo de tratamento.

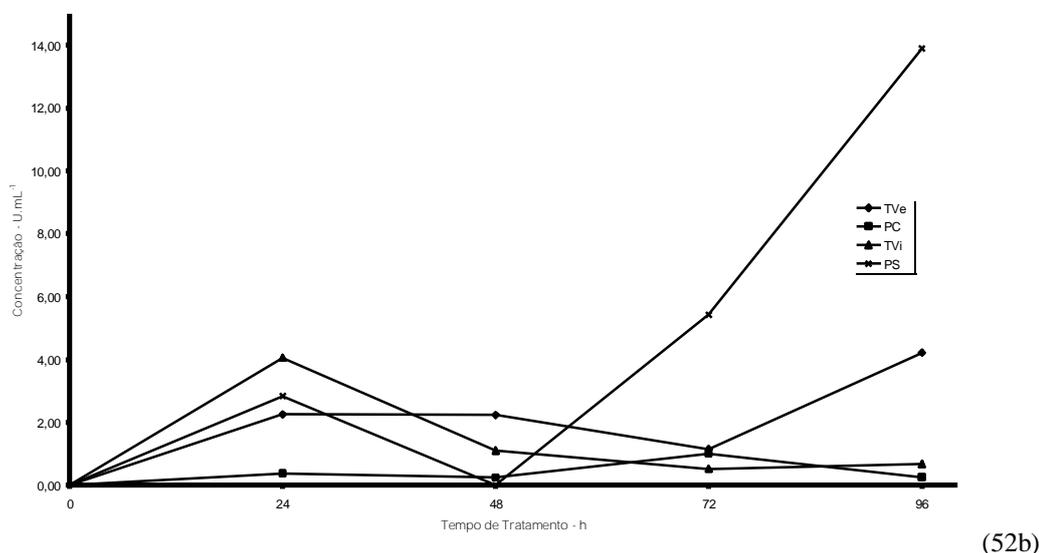
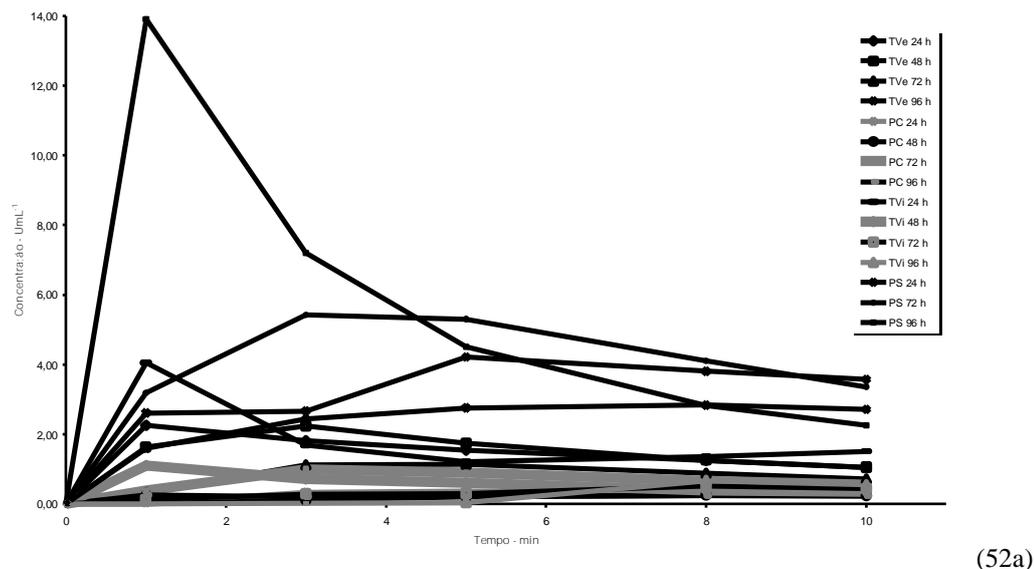


Figura 52 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados, usando-se o efluente fotocataliticamente tratado durante 8 min. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.

O decaimento do decaimento da DQO (Figura 53) mostrou que o comportamento apresentado nos outros métodos de tratamento, que fungo presente no sistema heterogêneo (agar - efluente) modificou o meio, alterando o pH, aumentou a síntese enzimática da lacase, tentando obter maior quantidade de fonte de carbono e nitrogênio a partir do meio em que ele se encontra.

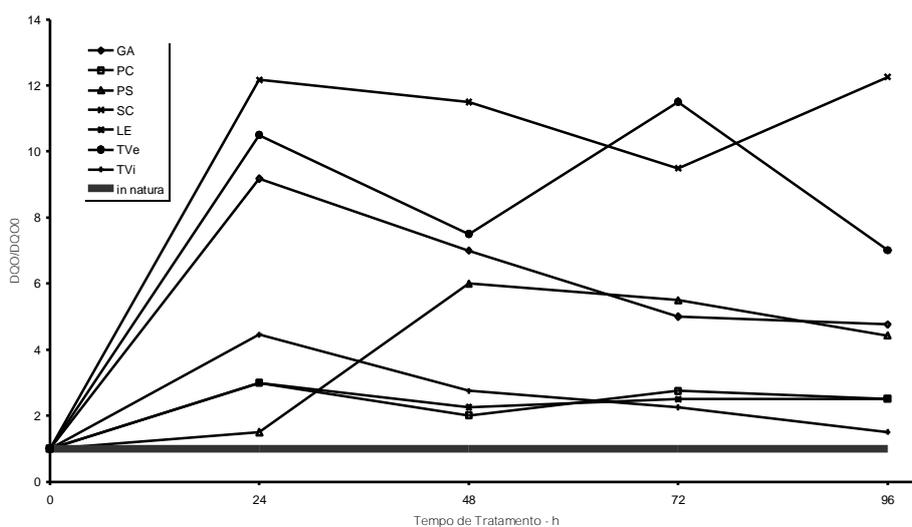


Figura 53 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da amostra 1 . A linha mais escura indica que abaixo dela, tem-se a degradação da matéria orgânica do efluente , usando um efluente previamente tratado fotocataliticamente durante 8 min.

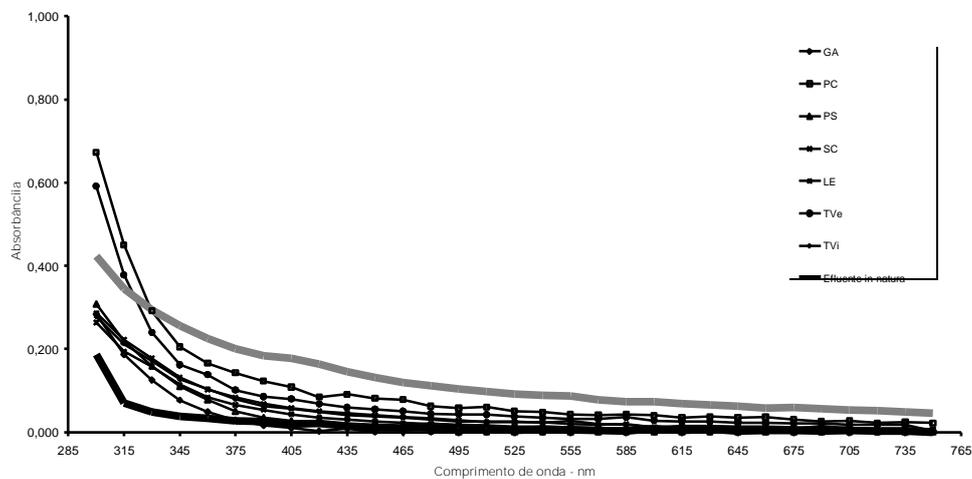
6.4.2- Tratamento da Amostra 5

Após a adição do catalisador (TiO_2) ao efluente tratado com fungo *P. sanguineus* e *T. versicolor*, em 96 h de tratamento, ele se precipitou, impossibilitando o processo fotocatalítico. Tal comportamento se deve à presença de PMS, conforme relatos de Aquino (2002), que associa o metabolismo e catabolismos celular ao PMS e que foram adsorvidos pela superfície do catalisador, formando grumos que impedem grandemente a reação de degradação, pois a interface reacional foi comprometida. Foram usados 0,1; 0,2; 0,5; 0,7 e 1,0 g de TiO_2 e em todas as dispersões, os resultados foram similares. De acordo com Ziulli e Jardim (1998), compostos hidrofílicos tendem a serem adsorvidos pelo catalisador. Como os PMS são hidrofílicos, assim como o catalisador, tal comportamento impede que a superfície de reação tenha sua eficiência no processo de fotodegradação. A síntese de PMS em meios com indutores em meio sólido apresentou maior produção, que pode ser notado pelo aumento da absorbância em 300 nm.

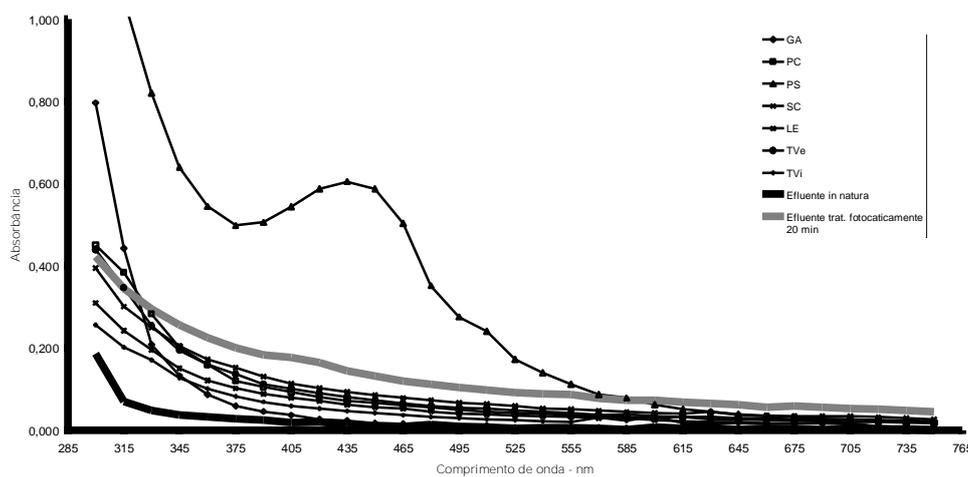
O tratamento combinado com o tratamento inicial com a fotocatalise e posterior tratamento biológico, foi efetuado com o efluente *in natura* tratado durante 20 min e 0,2 g de TiO_2 e volume de 450,0 mL, tendo como processo de seleção a redução da absorbância em 400 nm e a mudança da taxa cinética de degradação do contaminante orgânico (dado não mostrado).

O espectro do caldo filtrado da Amostra 5 foi realizado, como mostra a Figura 54. Observar que o tratamento fotocatalítico aumentou a coloração da Amostra 5 e o tratamento

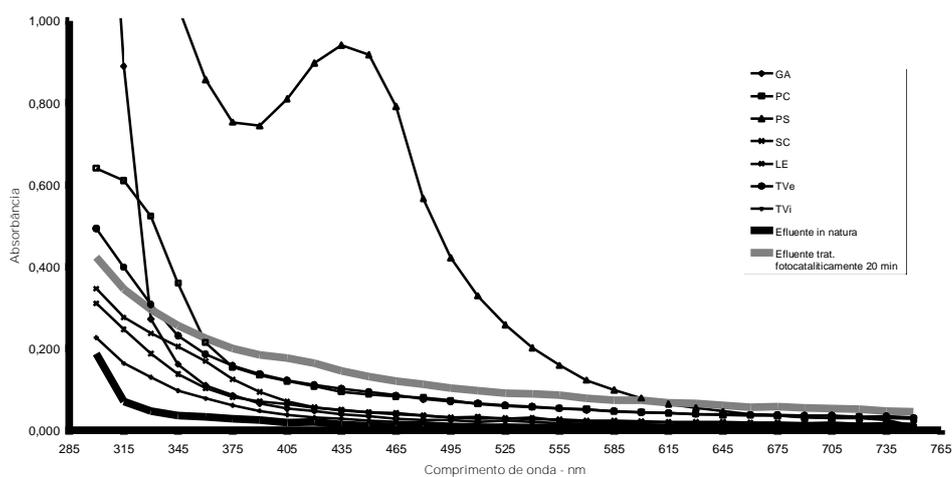
biológico diminuiu a coloração em 24 h de tratamento, principalmente o *G. applanatum*, que apresentou maior descoloração medidos em 400 nm.



(54a)



(54b)



(54c)

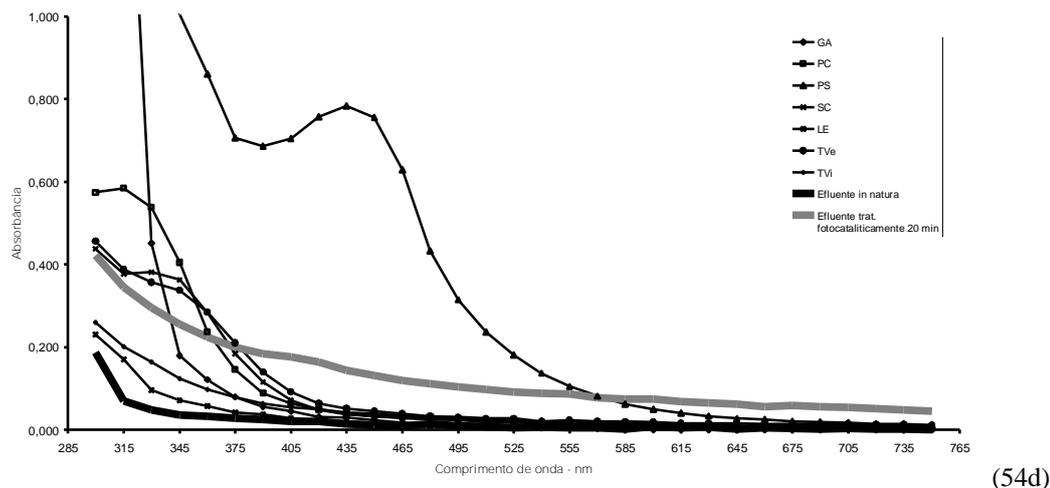


Figura 54 – Espectro de 300 a 750 nm da Amostra 5 tratada fotocataliticamente durante 20 min. (a) 24 horas de tratamento, (b) 48 horas de tratamento, (c) 72 horas de tratamento e (d) 96 horas de tratamento. Notar que o espectro do efluente *in natura* e o fotocataliticamente tratado servem como comparação da modificação do efluente.

Durante o tratamento biológico do processo combinado, apresentou boa performance de descoloração, se comparado ao efluente previamente tratado, mostrando que a o processo de adsorção tem importante papel neste processo, exemplificado pelo controle dos caldos filtrados (dados não mostrados).

A síntese da cinabarina foi detectada a partir de 48 h de tratamento e a coloração do caldo tratado com o *P. sanguineus* apresentou a maior coloração que os outros fungos. Comparando-se com o efluente fotocataliticamente, apenas o *P. sanguineus* aumentou a coloração, diferentemente dos outros fungos que se mediu uma maior descoloração. Tal experimento nos leva a crer que a fotocatalise quebrou as moléculas maiores em frações menores, facilitando a degradação desses fragmentos ou, conforme trabalho de Morais (2006), o tratamento inicial da fotocatalise e posterior tratamento biológico com fungos, altera a relação de biodegradabilidade do efluente, que é entendido pela relação entre a DBO₅/DQO.

A produção de MnP quando se usou o efluente fotocataliticamente tratado demonstrou que apenas cinco fungos produziram tal enzima, o que pode indicar que o pré-tratamento tenha diminuído a presença de inibidores de tal enzima (matéria orgânica nitrogenada, azida sódica), pois se comparando ao efluente *in natura* tratado com os fungos, menor quantidade de fungos produziram MnP, mas a produção foi maior (0,156 Abs. mL. min⁻¹). Entretanto, para a enzima LiP, a sua síntese não foi detectada, pois novamente não foi possível detectar a presença de tal enzima, mesmo em meio de cultura sólido. A Figura 55 mostra a produção de MnP durante o tratamento com as sete linhagens fúngicas.

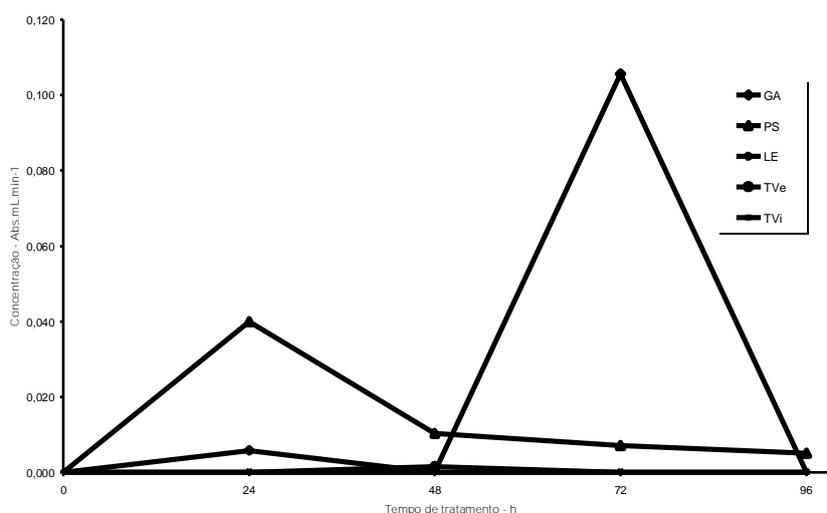


Figura 55 – Determinação da atividade de manganês peroxidase dos caldos filtrados da Amostra 5 do efluente previamente tratado com fotocatalise em 20 min, após 5 minutos de incubação a 30° C em pH 4,5 e vermelho de fenol como substrato.

A variação do pH dos caldos filtrados foi monitorado, conforme mostra a Figura 56. Como já foi notada, a faixa de pH ácido foi entre 3,0 a 5,0; notadamente repetitivo durante todo o processo biológico, o que reforça que o pH ideal para os fungos em estudo é o pH ácido. Observou-se que o pH manteve-se mais estável durante o tratamento biológico, diferentemente da outras formas de tratamento, que havia uma oscilação de pH, possivelmente devido à disponibilidade de compostos mais facilmente bioassimiláveis, o que pode ter inibido a síntese de compostos ácidos, responsáveis pela manutenção de pH ideal para o crescimento do micélio em meio líquido.

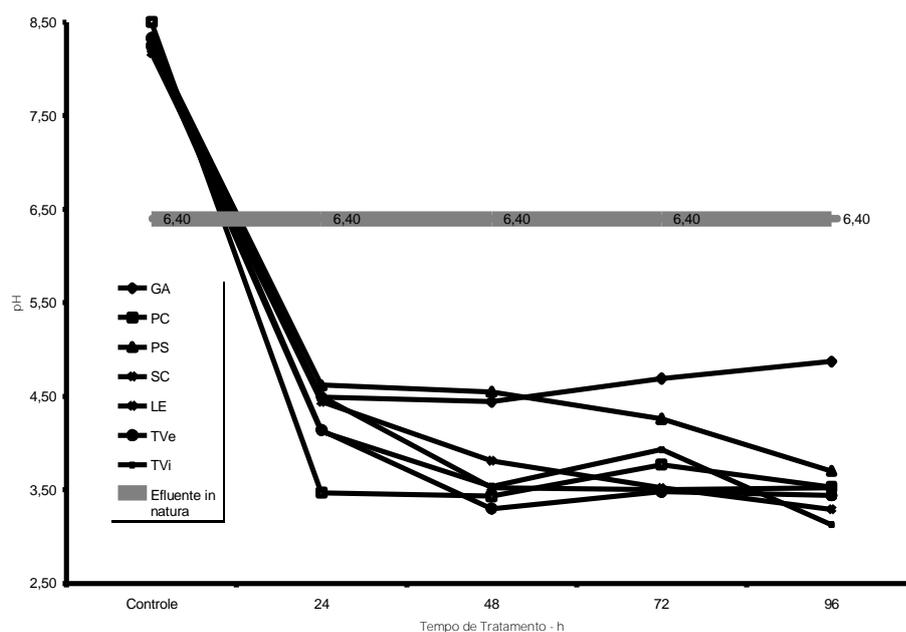
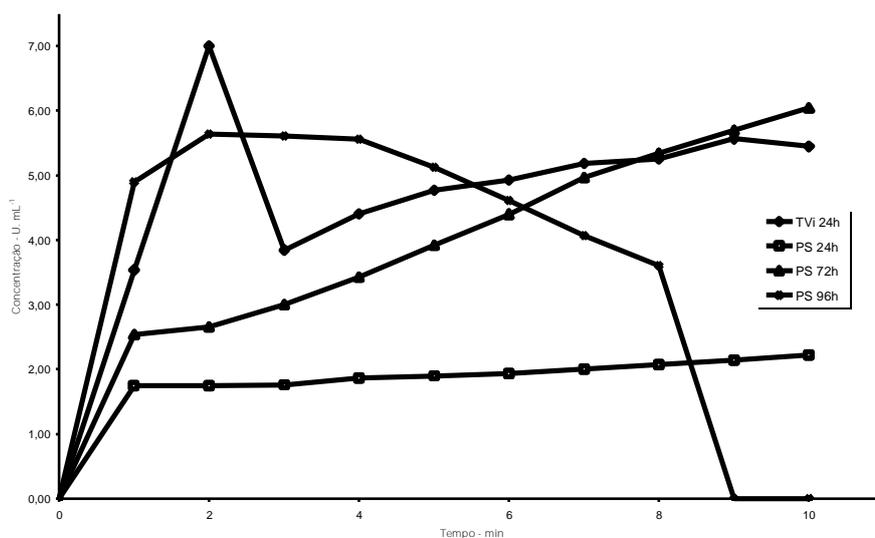
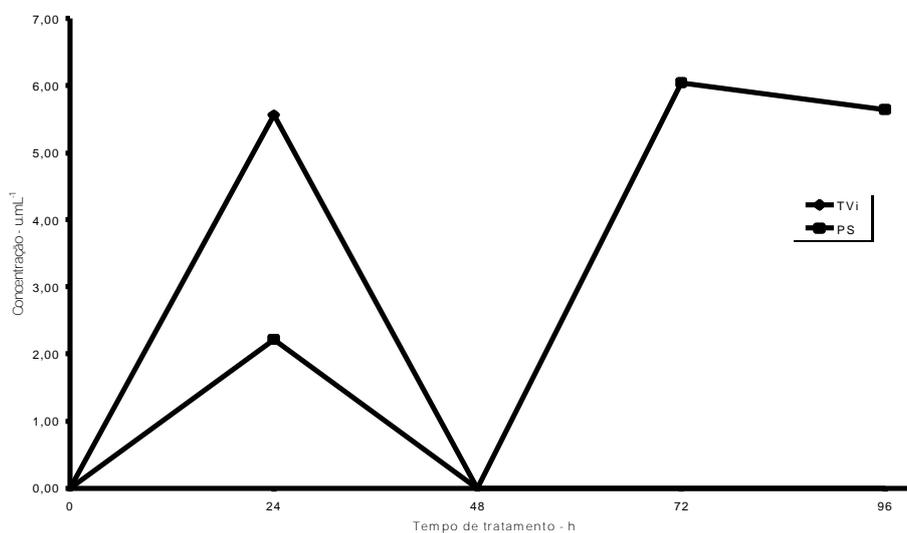


Figura 56 – Variação do pH durante o tratamento biológico da Amostra 5, usando-se o efluente fotocataliticamente tratado durante 20 minutos, com 0,2 g de TiO₂.

A produção de lacase foi acompanhada durante o tratamento, conforme a Figura 56. Nestas condições, a síntese da lacase por *T. villosa* foi detectada apenas em 24 h de tratamento, sendo que a produção dessa enzima não foi detectada em meio sólido. Para o *P. sanguineus*, a produção enzimática foi menor se comparado ao tratamento com efluente *in natura*, levando a crer que a fotocatalíse inicialmente degradou compostos mais facilmente assimiláveis pelas espécies fúngicas, privando-as de substratos importantes para a síntese enzimática.



(57a)



(57b)

Figura 57 – (a) Determinação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados da Amostra 5, usando-se o efluente fotocataliticamente tratado durante 20 min. (b) Variação da concentração da lacase, durante o tratamento biológico. O pH reacional foi igual a 5,0 e a seringaldazina foi usada como substrato.

O decaimento da DQO foi mesurado, como mostra a Figura 58. O gráfico mostra que não houve diminuição da DQO durante o tratamento, reforçando a proposição de que a

fotocatálise degradou inicialmente os compostos de maior importância ao metabolismo biológico, deixando contaminantes recalcitrantes ainda presentes no efluente.

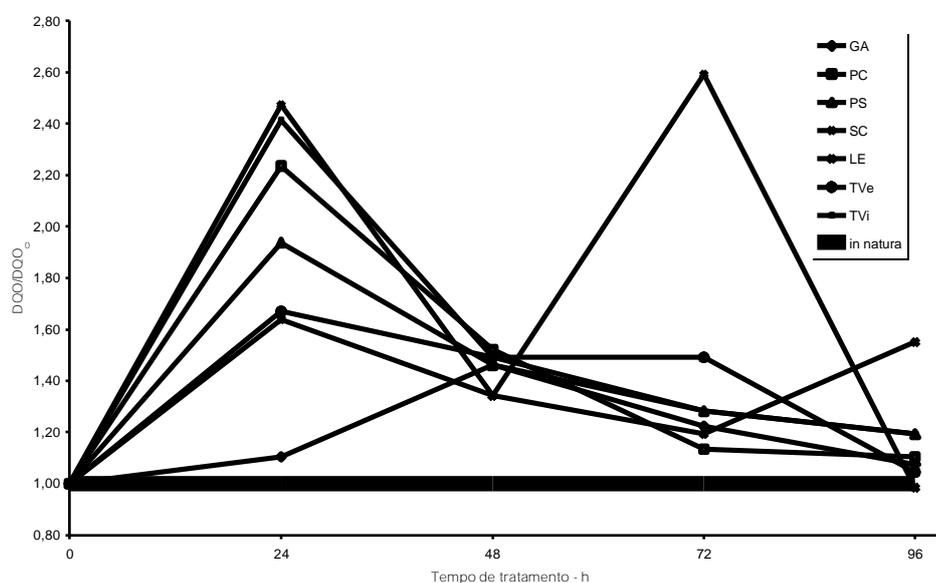


Figura 58 – Relação entre a DQO final e a DQO inicial da Amostra 5. A linha mais escura indica que abaixo dela, tem se a degradação da matéria orgânica do efluente, usando um efluente previamente tratado fotocataliticamente durante 20 min.

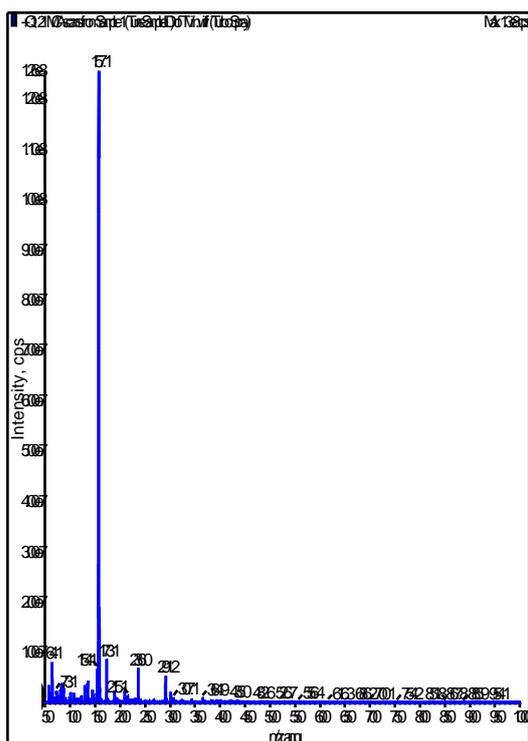
Embora o contaminante orgânico represente um problema ambiental, para o tratamento biológico, alguns contaminantes facilmente assimiláveis podem vir a ser um importante suporte para o crescimento microbiano, auxiliando e viabilizando o uso dessa metodologia para o tratamento de efluentes, portanto, o tratamento físico-químico da fotocatalise heterogênea inicial para efluentes posteriormente tratados biologicamente, pode não representar um interessante metodologia para degradação de poluentes orgânicos.

6.5 Avaliação da distribuição de massas, usando espectrômetro de massa e sua relação com a toxicidade do efluente

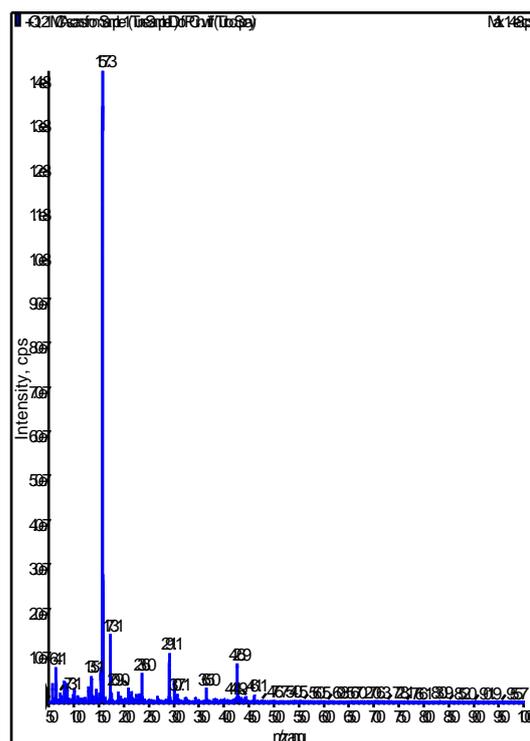
De acordo com Aquino (2002), processos biológicos produzem compostos de alto peso molecular (>100.000 Da) e de baixo peso molecular (<1.000Da) que são os PMS. Geralmente os compostos de alto peso molecular são de maior dificuldade de biodegradação, sendo que os de menor peso, apresentam maior DQO.

6.5.1-Tratamento da Amostra 1

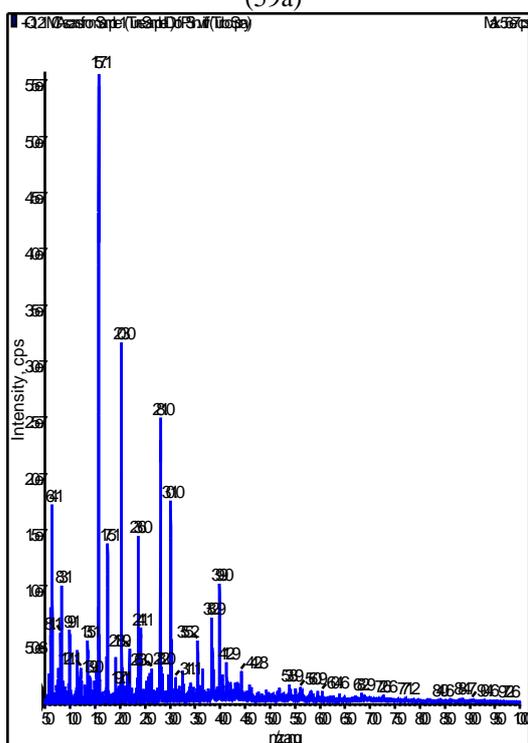
Para verificar se houve aumento de compostos com maiores massas que o efluente *in natura*, indicando uma biotransformação dos contaminantes orgânicos, foram feitos vários espectros de massa, tendo como comparação o efluente *in natura*, conforme mostra a Figura 59.



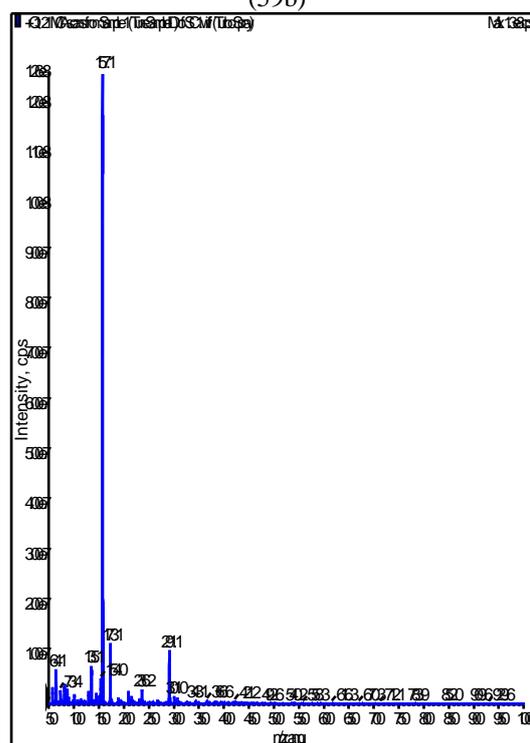
(59a)



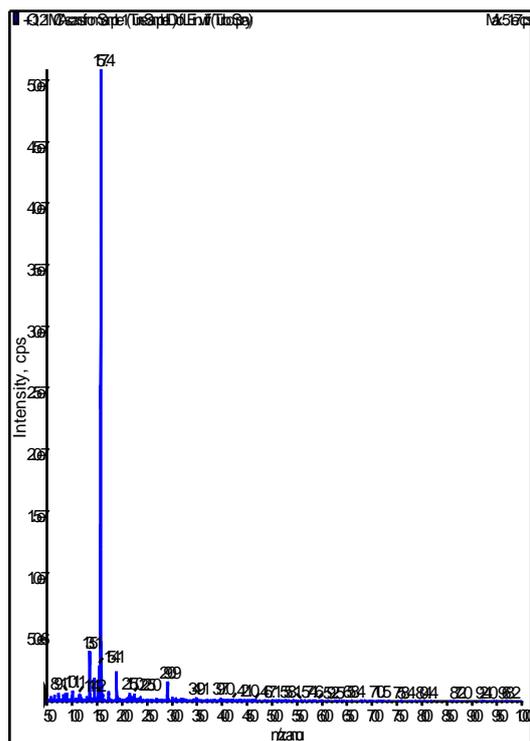
(59b)



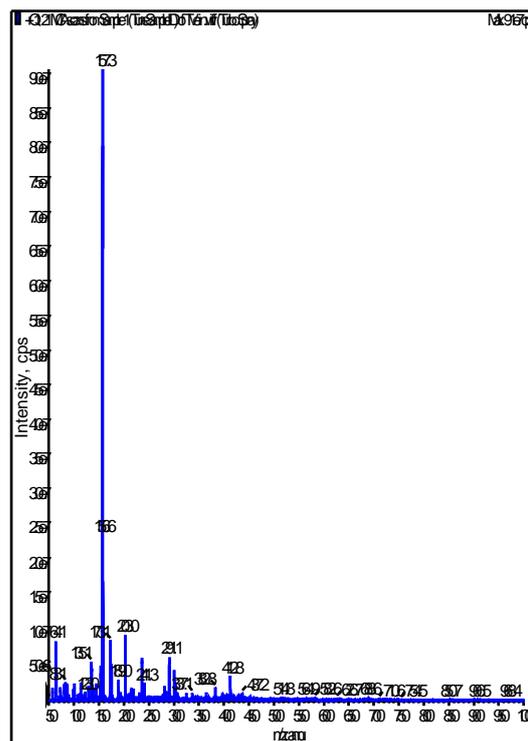
(59c)



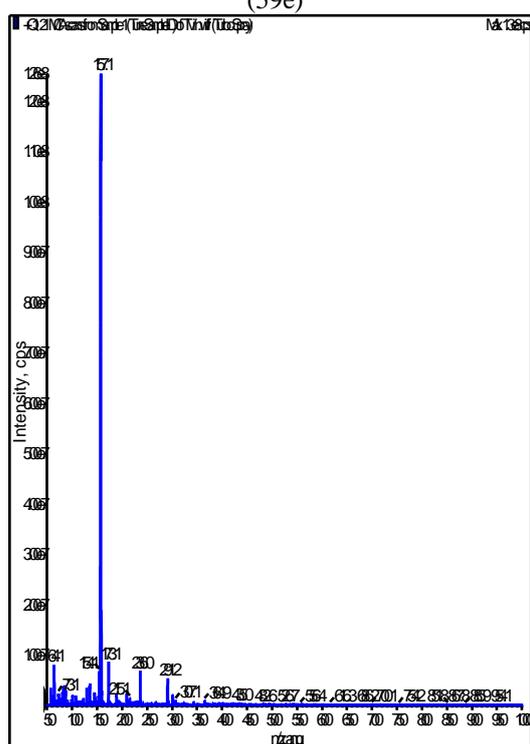
(59d)



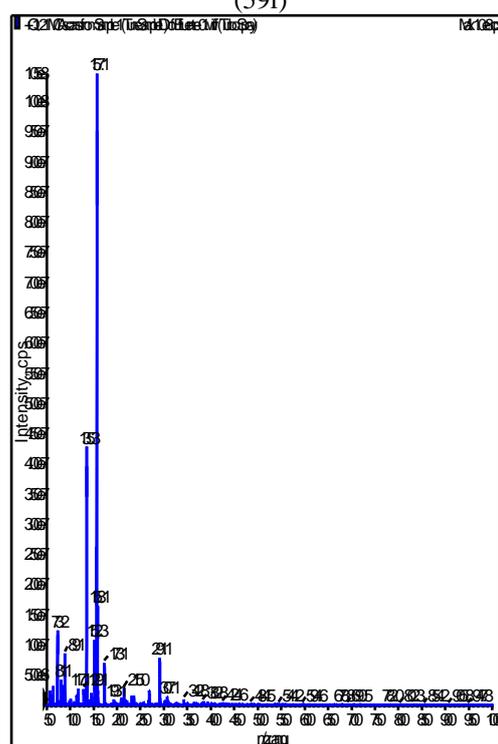
(59e)



(59f)



(59g)



(59h)

Figura 59 – Espectro de massa da amostra 1 em modo positivo, com relação m/z entre 50 e 1000 Da. (a) *G. applanatum* (b) *P. chrysosporium* (c) *P. sanguineus* (d) *S. commune* (e) *L. edodes* (f) *T. versicolor* (g) *T. villosa* e (h) Efluente *in natura*. Todos os espectro são relativos aos tratamentos com o efluente *in natura* e fungos.

Santiago (1999), também estudou compostos de baixo peso molecular que mimetizavam fenoloxidases, o que pode ser um importante meio de tratamento ou mediador

das enzimas, principalmente a lacase. Ao se avaliar a relação carga e massa igual a 135,1 , alguns fungos em 96 h de tratamento foram capazes de diminuir grandemente a intensidade deste contaminante, como o *T. villosa* tratado em efluente *in natura*, o *P. sanguineus* tratando o efluente autoclavado, o *P. chrsosporium* tratado com indutor em meio sólido, *S. comunne* e *T. versicolor* tratado com efluente previamente tratado por fotocatalise. Tal diminuição indica a degradação de compostos presentes no efluente *in natura*.

A forma de tratamento da amostra 1 que apresentou maior produção ou polimerização de compostos foi quando se usou o fungo *P. sanguineus*, tratando um efluente fotocataliticamente tratado durante sete minutos, o que pode relacionar com o “stress” em que este fungo pode ter sido submetido durante o tratamento biológico (diminuição de fontes de carbono e nitrogênio, presença de compostos tóxicos, como o fenol, etc.). Embora tenha havido uma maior produção de biomoléculas, avaliando-se a toxicidade (Figura 60) com a *A. salina*, o *P. sanguineus* não aumentou a toxicidade, comparando-se com o efluente não tratado. A forma de tratamento que apresentou resultados com maior porcentagem de mortalidade foi quando se usou ou indutor em meio sólido, o que pode indicar que o meio se tornou mais tóxico para o fungo, fazendo que os fungos diferenciasssem o metabolismo. Entretanto, o fungo *L. edodes* diminuiu a toxicidade do efluente, quando usado o indutor em meio sólido, indicando massa que o a inibição catabólica por excesso de fontes primárias de carbono e nitrogênio para o fungo citado, diminua a toxicidade do efluente.

Em geral, nas condições do tratamento com o efluente pré-tratado fotocataliticamente, houve maior produção de biocompostos de baixa molecular, que de acordo com Aquino (2002), são mais propensos à biodegradação. Embora apresente um pico recorrente em 157,1 (m/z) não foi possível determinar que substância é, pois necessitar-se-ia de purificação e avaliação de bandas de estiramento em infra-vermelho, para se determinar a possível estrutura molecular. Compostos de alta massa molecular podem ter sido fragmentados, embora se tomou o cuidado de não fornecer energia capaz de tal feito, devido ao alto potencial aplicado no *eletrospray*.

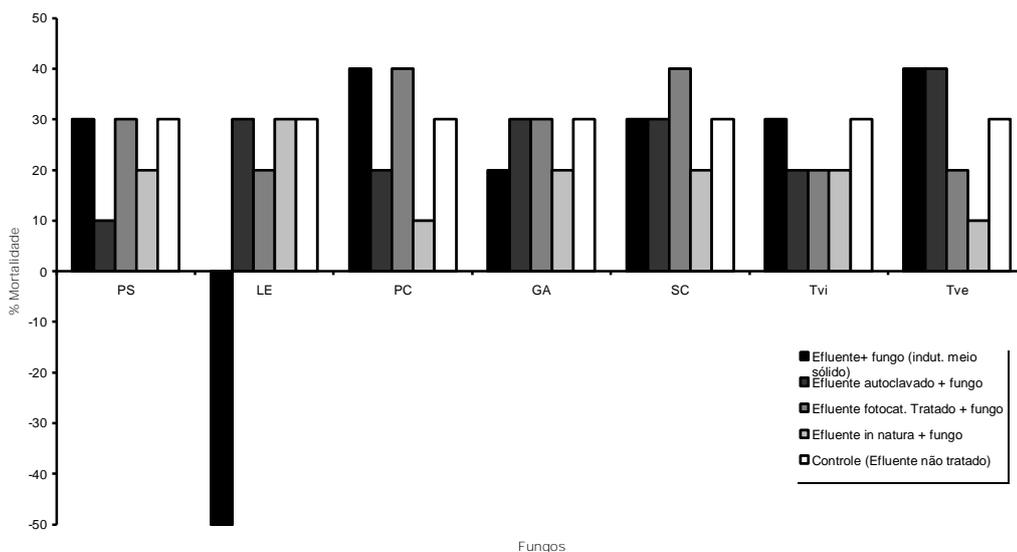
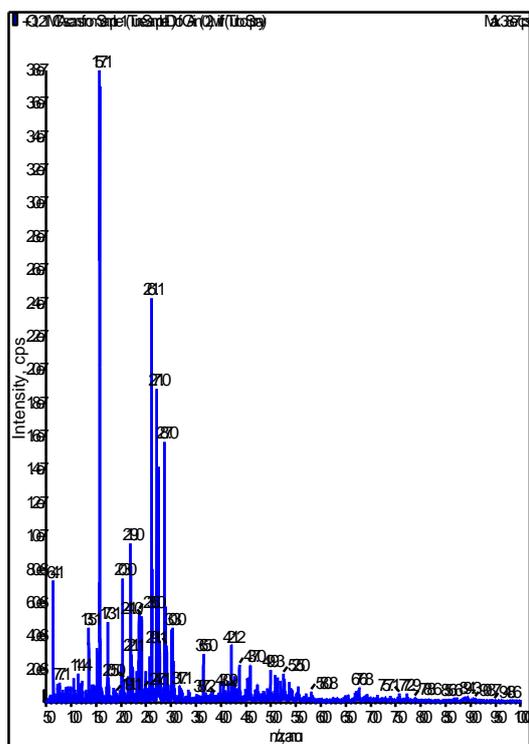


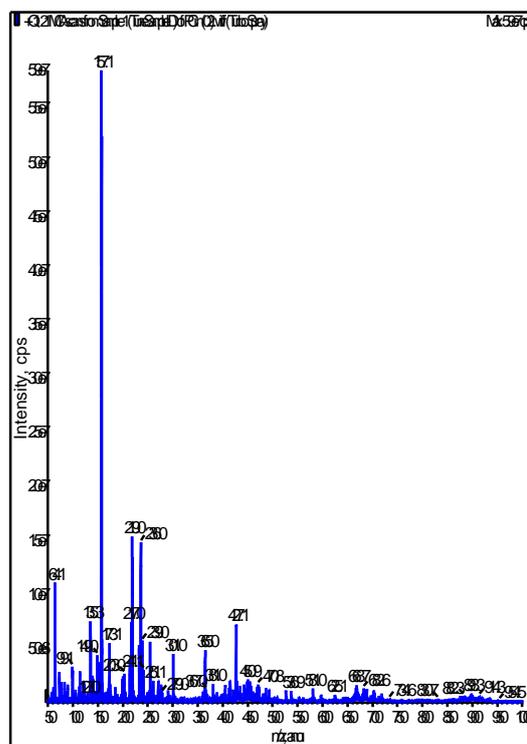
Figura 60 - % mortalidade dos náuplios de *A. salina*, submetidos ao teste de toxicidade da amostra 1. As amostras correspondem a 96 h de tratamento

6.5.2-Tratamento da Amostra 5

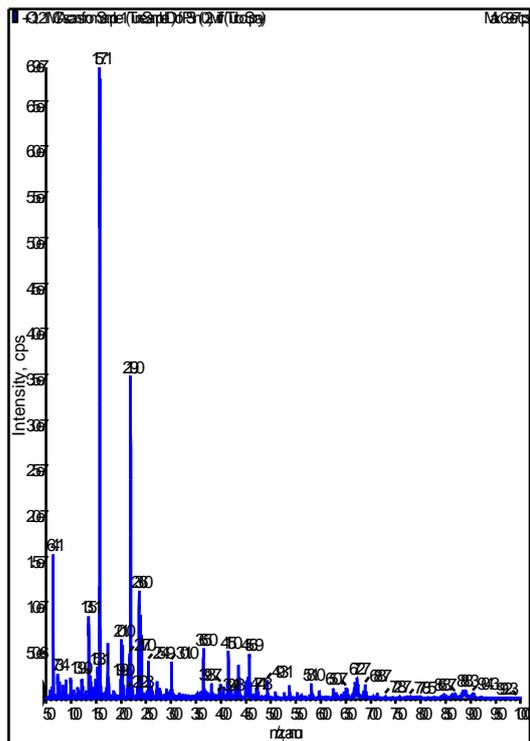
A distribuição de massas da Amostra 5, sob várias formas de tratamento, também foi efetuada, conforme mostra a Figura 61. Similarmente à amostra 1, a forma de tratamento que apresentou maior produção de biocompostos de baixa massa molecular foi quando se usou o efluente previamente tratado fotocataliticamente.



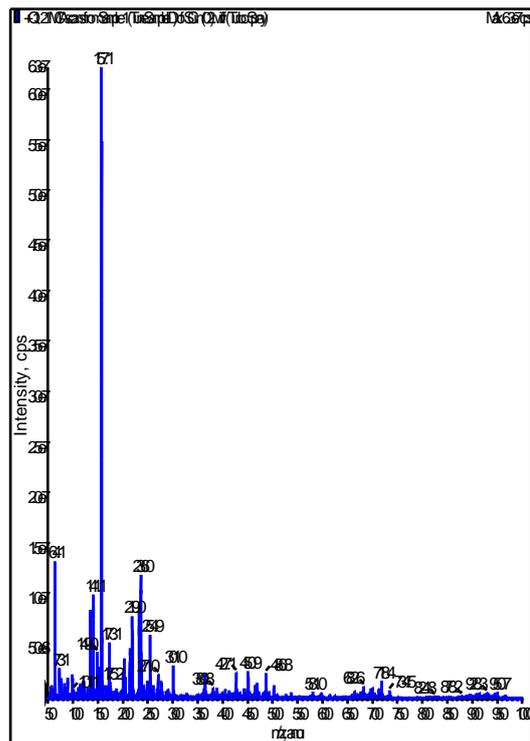
(61a)



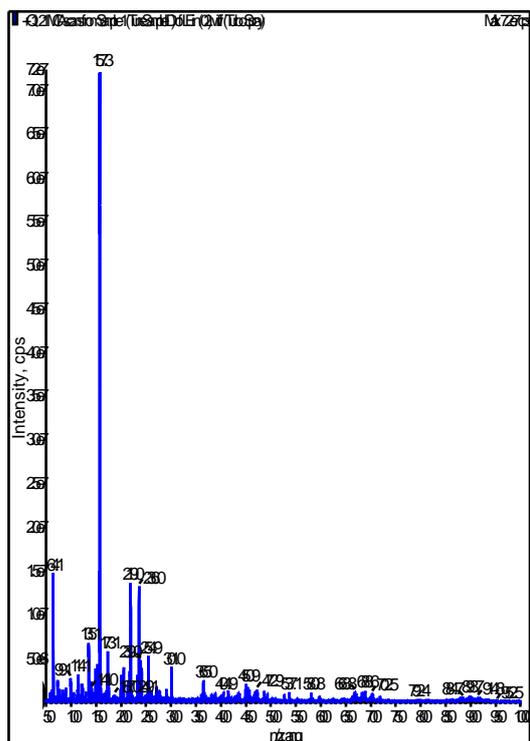
(61b)



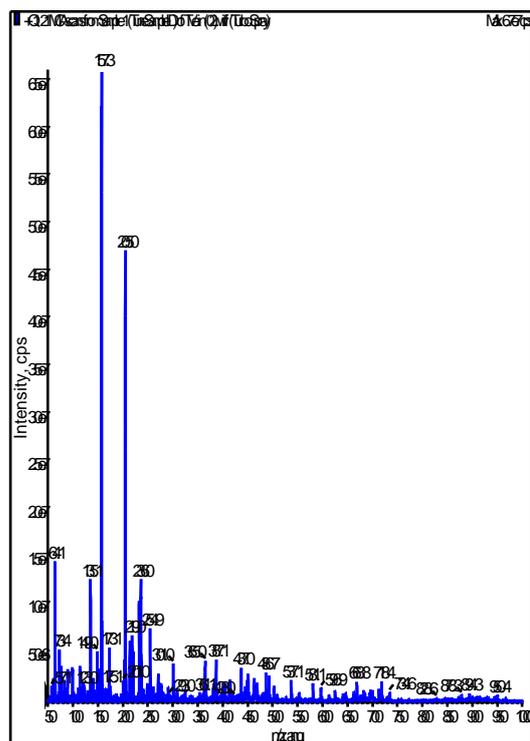
(61c)



(61d)



(61e)



(61f)

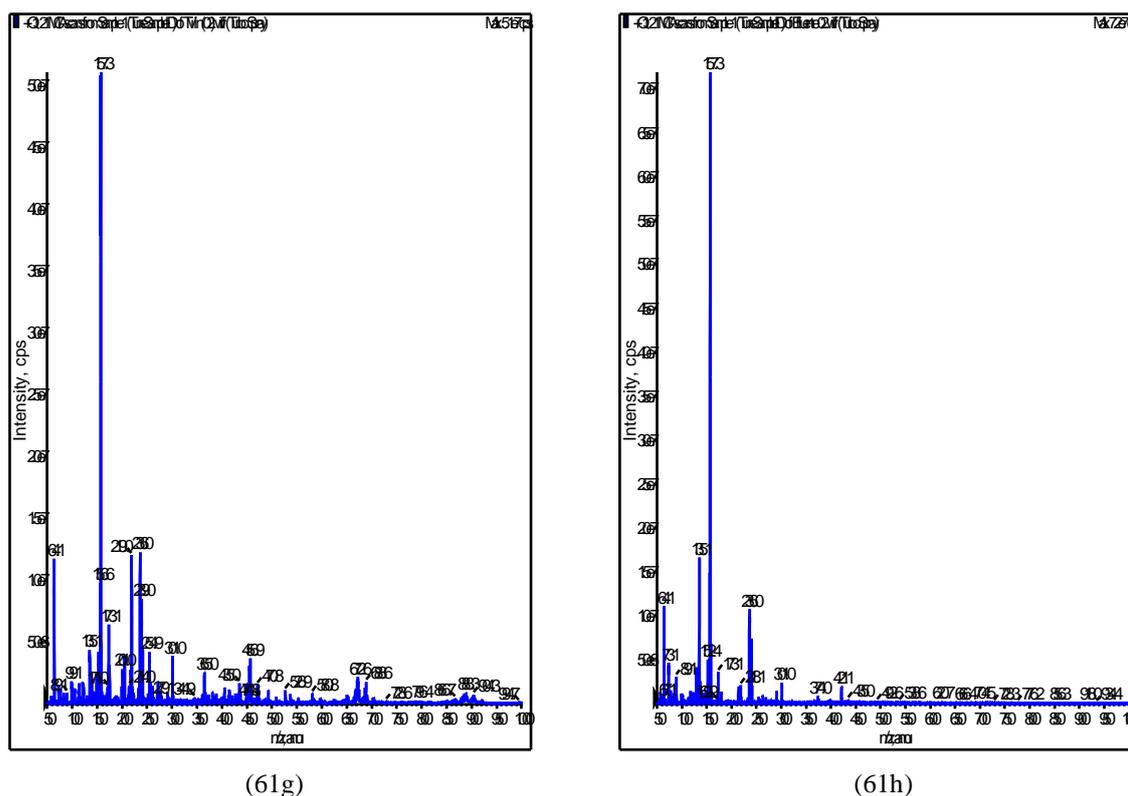


Figura 61 – Espectro de massa da Amostra 5 em modo positivo, com relação m/z entre 50 e 1000 Da. (a) *G. applanatum* (b) *P. chrysosporium* (c) *P. sanguineus* (d) *S. commune* (e) *L. edodes* (f) *T. versicolor* (g) *T. villosa* e (h) Efluente *in natura*. Todos os espectro são relativos aos tratamentos do efluente *in natura* e fungos.

O fungo que teve maior produção de biocompostos foi o *T. versicolor*, quando se usou o efluente *in natura*. Comparando-se com a porcentagem de mortalidade (Figura 62) dos náuplios de *A. salina*, houve um crescimento da porcentagem de mortalidade do efluente, indicando que relação direta entre produção de compostos de baixo peso molecular e o aumento da toxicidade do efluente. A forma de tratamento que, em geral, aumentou a toxicidade foi quando se utilizou o efluente *in natura*, o que possivelmente está relacionado à síntese e de antibióticos naturais, como a cinabarina (SMANIA; SMANIA-JUNIOR; LOGUERCIO-LEITE, 1998).

A forma de tratamento que apresentou melhores resultados de toxicidade foi quando se usou o efluente previamente tratado fotocataliticamente, o que reforça a possibilidade do antibiótico natural (cinabarina) ser o maior causador do aumento da toxicidade, bem como a presença de compostos menos biodegradáveis, resultantes da degradação do contaminante orgânico.

Avaliando-se os compostos com relação massa/carga 135,1, apenas o fungo *S. commune* tratando a Amostra 5 (efluente *in natura*) foi capaz de diminuir a intensidade deste contaminante, diferentemente da amostra 1, que outros fungos em diversas formas de tratamento foram capazes de diminuir a intensidade deste contaminante.

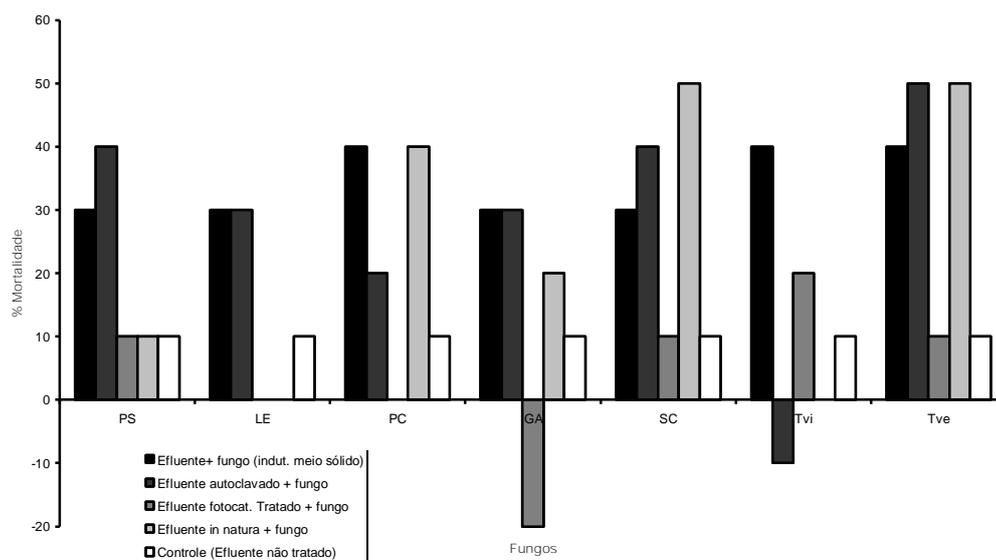


Figura 62 - % mortalidade dos náuplios de *A. salina*, submetidos ao teste de toxicidade da Amostra 5. As amostras correspondem a 96 h de tratamento.

7-CONCLUSÕES

Avaliando-se o decaimento da DQO do efluente, a melhor forma de tratamento da amostra 1 e 5 foi usando-se o fungo *S. commune* (78 %), sendo o efluente *in natura* e com indutor em meio sólido com indutor em meio líquido em 48 h de tratamento (amostra 1) e tendo o efluente *in natura* sem tratamento prévio da amostra (78 %) em 48 h de tratamento, para Amostra 5. Não se comprova a relação entre degradação e síntese de lacase e de manganês peroxidase nas condições estudadas, o que pode ser sugerido que a processos não enzimáticos poderiam estar relacionados à degradação do contaminante orgânico. Avaliando-se a toxicidade do efluente final, aumentou a toxicidade do efluente na amostra 1, indicando que um possível stress metabólico levou o fungo a produzir compostos de maior toxicidade e na Amostra 5, a toxicidade diminuiu possivelmente devido à maior quantidade de matéria orgânica disponível para manutenção do metabolismo primário.

Em geral, houve um aumento de coloração do efluente tratado biologicamente, em todas as formas de tratamento, caso já relatado na literatura científica (KUNZ et al., 2002).

Avaliando-se o uso combinado dos métodos, conclui-se que o tratamento biológico com fungos seguido do tratamento de fotocatalise apresenta baixo rendimento, devido à adsorção de PMS ao TiO_2 . Usando-se o pré-tratamento fotocatalítico, seguido do tratamento biológico com fungos, os resultados também apresentaram baixo rendimento de degradação, possivelmente devido à maior disponibilidade de compostos não biodegradáveis resultantes do processo degradativo. Comparando-se todos os métodos, o melhor rendimento degradativo é quando se usa o efluente *in natura* e sem qualquer pré-tratamento para a Amostra 5, ou com indução no meio sólido (amostra 1), indicando que o tratamento biológico com fungos pode ser um método interessante de tratamento do efluente da indústria farmacêutica.

Embora o *S. commune* não tenha produzido lacase em nossos experimentos, a literatura científica mostra que ele pode produzir tal enzima (DE VRIESS, KOOISTRA, WESSELS, 1986). O fungo *L. edodes* também não produziu lacase, mas também há estudos que mostra a síntese dessa enzima por *L. edodes*, cultivado em condições diferentes das que foram estudadas neste trabalho (ZHAO; KWAN, 1999 e NAGAI et al., 2002). Se avaliarmos a produção de lacase, para a amostra 1, o *T. versicolor* apresentou maior produção dessa enzima em 96h de tratamento, usando o indutor em meio sólido (17,00 U. mL^{-1}). Para a amostra 5, o fungo que apresentou maior produção foi também o *T. versicolor* em 96 h de tratamento, mas usando o efluente autoclavado e efluente *in natura* (45,00 U. mL^{-1}).

A produção de manganês peroxidase teve maior expressão na amostra 1 quando se usou o *P. chrysosporium* em efluente autoclavado em 48 h de tratamento (4,500 Abs mL. min⁻¹) indicando que a presença de microrganismos foi importante para a inibição da produção dessa enzima ou mesmo concorrência por substratos essenciais (nitrogênio e carbono) e o *G. applanatum* em 72 h de tratamento de efluente fotocataliticamente tratado durante 7 min (4,000 Abs mL. min⁻¹), indicando que para esse fungo, a indisponibilidade de nutrientes induz a produção de MnP. Para a amostra 5, o *P. chrysosporium* com efluente autoclavado tratado em 24 apresentou maiores resultados (8,500 Abs mL. min⁻¹) e *P. sanguineus* em 72 h de tratamento com efluente autoclavado (8,000 Abs mL. min⁻¹), também indicando que a presença de microrganismo pode ter sido um fator de inibição dessa enzima, no tratamento do efluente.

8-RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

- Adicionar glicose e fontes de nitrogênio (proteína, NH_3 , NO_3^-) ao efluente e estudar se tal procedimento pode vir a melhorar o processo de degradação de matéria orgânica, ou mesmo inibir ou induzir a síntese enzimática de lacase, MnP e LiP;
- Adicionar apenas esporos dos fungos em estudo, pois assim, dados referentes à DQO podem apresentar maior confiabilidade sobre o processo degradativo;
- Uso combinado de fungos produtores de lacase, MnP e LiP com fungos que não produzem tais enzimas, mas que se mostraram eficientes no tratamento de efluentes;
- Uso de reator com injeção de ar ou oxigênio, para aumentar a quantidade de O_2 dissolvido, na tentativa de aumentar a produção de peroxidases (MnP e LiP);
- Uso de suportes físicos para o crescimento dos fungos, tais como fios de nylon, crisotila, plásticos, etc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K-H.; CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G.M. Decolorization and Detofication of Textile Dye with Laccase from *Trametes hirsuta*. Applied Environmental Microbiology , 66, 8, 3357-3362, 2000.ç
- ALEXOPOULUS C.J.; MIMS C.W. BLACKWELL M. Introductory mycology. New York : John Wiley; Sons, 1996.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17. ed. APHA. Washington, DC, 1992.
- ANDERSON, L. A.; RENGANATHAM, V.; CHIU, A. A.; LOEHR, T. M.; GOLD, M. H. Spectral characterization of dairylpropane oxygenase, a novel peroxide-dependent, lignin-degrading heme enzyme. Journal Biology Chemistry, 260, 6080 – 6087, 1985.
- AQUINO, S. F. Caracterização Da DQO Efluente De Sistemas De Tratamento Biológico Engenharia Sanitária e Ambiental, 8, 3, 135-144, 2003.
- ARJONA, B. T.; RUIZ, J. I. O. Diseño e implementacion de um programa de minimizacion de resíduos de la industria farmacéutica, Centro de Calidade Ambiental, ITESM, Copyright, BTA-CTL-04-130398, 1997.
- ASSALIN, M. R.; FIGUEIREDO, R. F.; ZIOLLI, R. L.; GUIMARÃES, J. R. Processos Oxidativos Avançados (POA): aplicação da fotocatalise heterogênea na desinfecção de águas de abastecimento. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental ,1999.
- BAJPAI, P.; ANAND, A.; SHARMA, N.; MISHRA, S.P.; BAJPAI, P.K . Enzymes Improve Ecf Bleaching Of Pulp. Bioresources, 1, 1, 34-43, 2006.
- BALAN, D.S.; MONTEIRO, R.T. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. Journal of Biotechnology. 23,89, 2-3, 2001.
- BALCIOGLU, I. A.; OETKER, M. Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O sub and O sub(3)/H sub(2)O sub(2) processes. Chemosphere, 50, 1, 85-95, 2003.
- BALDRIAN, P. Increase of Laccase Activity During Interspecific Interactions Of White-Rot Fungi.FEMS Microbiology Ecology .50, 33, 245-253, 2004.
- BARBOSA, D. R.; SANTIAGO, M. F. Descoloração Do Corante Antraquinona(Remazol Brilhante Laranja) Por Fungos De Decomposição Branca. Revista Eletrônica de Farmácia, 2 , 2, 32-33 2005.
- BARR, D. P. ; AUST, S. D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. Environmental science & technology, 28, 2, 79A-87A, 1994.
- BELSARE D. K.; PRASAD, D. Y. Decolorization of effluent from the bagasse-based pulp mills by white-rot fungus *Schizophyllum commune*. Environmental Microbiology, 28, 3, 301-304, 1988.

BELINKY, P. A.; FLIKSHTEIN, N.; LECHENKO, S.; GEPSTEIN, S.; DOSORETZ, C. G. Reactive Oxygen Species and Induction of Lignin Peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium* Applied Environmental Microbiology, 69,11, 6500-6506, 2003.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P., MACHADO, B. C. , Sideróforos: “uma resposta dos Microrganismos”. Química Nova, 25, 6B, 1155, 2002.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. Ciência e Cultura, 42, 3/4, 271-277, 1990.

BERTOLETTI, E. Tratabilidade e toxicidade de efluentes industriais. Engenharia Sanitária, 28, 1, 38-41, 1989.

BERVOETS, L.; BAILLIEUL, M.; BLUST, R.; VERHEYEN, R. Evaluation of effluent toxicity and ambient toxicity in a polluted lowland river. Environmental Pollution, 91, 333-341, 1996.

BOLLAG, J.-M.; LEONOWICZ, A. Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases . Applied Environmental Microbiology, 48, 849-854, 1984.

BOLLAG, J.-M.; SHUTTLEWORTH, K.L.; ANDERSON, D.H. Laccase-mediated Detoxification of Phenolic Compounds. Applied Environmental Microbiology, 54, 3086-3091, 1988.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G.; REID, I. D.; LANTHIER, P.; YAGUCHI, M. Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,29-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. Applied And Environmental Microbiology, 61, 1886-1890,1995.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G.; FREIERMUTH, B., BODIE, E.; BORNEMAN, S. Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds. Applied And Environmental Microbiology, 63; 4627-4629,1997.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLLO, V. R.; RASLAN. D. S.; JAMAL C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. Revista. Brasileira de. Ciências. Farmacêuticas , 42, 2, 195-202, 2006.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of Nutrient Nitrogen and Manganese on Manganese Peroxidase and Laccase Production by *Lentinus edodes*. FEMS Microbiol.Lett., 128, 81,1995.

CARBALLO, J. L.; HERNANDEZ-INCA, S. L.; PEREZ, P.; GARCIA-GRÁVALOS, M. D. A Comparison Between of Two Brine Shrimp Assays to Detect in vitro Cytotoxicity in marine Natural Products .BMC Biotechnology, 1, 2, 17-20, 2002.

CARDOSO, L; LUCA S. J. Toxicity Of Biologically Treated Efluentes Disinfected By Hypochlorite And Ferrate (VI). Engenharia Sanitária E Ambiental, 9, 1, 26-29, 2004.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C. DE; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA A. Síntese De 1,3,5-Triazinas Substituídas e Avaliação da Toxicidade Frente a *Artemia salina* Leach, *Química Nova*, 23, 1, 20-22, 2000.

CHO, N-S.; SHIN, W.; JEONG,S-W.; LEONOWICZ, A. Degradation of Lignosulfate by Fungal Laccase with Low Molecular Mediator *Bull. Korean Chemistry Society*, 25, 10, 1551-1554, 2004.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. *Resolução CONAMA 357, de 18/03/2005. Dispõe sobre a classificação das águas.* Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>> . Acesso em 12/04/2005.

CHOU, S. C.; GOLDSTEIN, A. Chromogenic groupings in the Lowry protein determination *Biochemical Journal*, 75, 109-115; 1960.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 35, 93-96,2004.

COLE, J.L.; TAN, G.O., YANG, E.K.; HODGSON, K.O.; SOLOMON, E.I. Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an x-ray absorption edge, *Journal American of Chemistry. Society*, 112, 2243, 1990 .

COLE, R. B. *Electrospray ionization Mass Spectrometry-Fundamentals, Instrumentation & Applications.* New York: John Wiley&sons, 1997.

COLNAGO, L. A.; ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE, A. P. Espectrometria de Massa e RMN Multidimensional e Multinuclear: Revolução nos Estudos de Macromoléculas Biológicas *Química Nova*, 16, 9-14, 2002.

CORDEIRO, A. C. S.; LEITE, S. G. F.; DEZOTTI; M. Inativação Por Oxidação Fotocatalítica De *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. *Química Nova*, 27, 5, 689-694, 2004.

CORREIA, C. R. D. , COSTA, P. R. R., FERREIRA, V. F. Vinte e cinco anos de reações e estratégias em química orgânica, *Química Nova*, 25, 74-80, 2002.

COSTA, F. C.; CAMPOS, J. C. ; SANT'ANNA JR., ,G. L;. DEZOTTI, M. Aplicação De Carvão Ativado Em Pó (CAP) Ao Processo Biológico De Tratamento De Um Efluente Da Indústria Química, *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 9, 2, 170-176, 2007.

DANTAS, T. L. P., JOSÉ, H. J., MOREIRA, R. DE F. P. M Fenton and Photo-Fenton oxidation of tannery wastewater. *Acta Scientiarum - Technology*, 25, 1, 91-95,2003.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 107, 907-938, 1999.

DEMIR, G. Degradation of toluene and benzene by *Trametes versicolor* *Journal of Environmental Biology*; 25 , 1, 19-25, 2004.

DE VRIES, O. M. H.; KOOISTRA, W. H. C. F.; WESSELS, G. H.. Formation Of An Extracellular Laccase By *Schizophyllum Commune* Dikaryon. Journal of Genetic of Microbiology 132, 2817–2836,1986.

DHOUIB, A.; ELLOUZ M.; ALOUI, F.; SAYADI, S. Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. Letters in Applied Microbiology, 42 , 4 , 405-411, 2006.

DITTMER, J. K.; PATEL, N. J.; DHAWALE, S. W.; DHAWALE S. S. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency FEMS Microbiology Letters, 149 ,1, 65–70, 1997.

DONG, J. L.; ZHANG, W.; ZHANG, R.; HUAI, H.; WEI, Z. Influence of Culture Condition on Laccase Production and Isoenzyme Patterns in the White-rot Fungus *Trametes gallica*. Journal of Basic Microbiology, 45, 3, 190-198, 2005.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. In Microbiologia Ambiental (I.S. De Melo and J.L. De Azevedo, Eds.) EMBRAPA Publ.,268,1997.

DURÁN, N.; FERRER, I.; RODRÍGUEZ, J. Ligninases from *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441) Applied Biochemistry Biotechnology ,16. 57,157- 167, 1997.

DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A. ; GIANFREDA. L. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: A Review. Enzyme and Microbial Technology. 31 ,7, 907-931, 2002.

EDWARDS, S. L.; RAAG, R.A.; WARSHII, H.; GOLDT, M. H.; POULOS, T. L. Crystal structure of lignin peroxidase. Proclamation National Academy Science USA - Biochemistry, 90, 750-755,1993.

EL-GOHARY, F. A.; ABOU-ELELA, S. I.; ALY, H. I. Evaluation of biological technologies for wastewater treatment in the pharmaceutical industry. Water science technology; 32, 11, 13-20, 1995.

FEEMA, Método de Determinação do Efeito Agudo Letal Causado por Agentes Tóxicos em Crustáceos da Espécie *Artemia salina*-Método Estático. Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Rio de Janeiro, Brasil, MF-454 ed., 1993a.

FEEMA, Método de Determinação do Efeito Agudo Letal Causado por Agentes Tóxicos em Crustáceos da Espécie *Artemia salina*-Método Estático. Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Rio de Janeiro, Brasil, MF-459 ed., 1993b.

FERREIRA, I. V. L. ; DANIEL, L. A. Fotocatálise Heterogênea Com TiO₂ Aplicada Ao Tratamento De Esgoto Sanitário Tratado Engenharia. Sanitária e Ambiental , 9, 4, 335-342, 2004.

FERREIRA, V. S. ; SILVA Jr., J. G.; BOM, E. P. S. Degradação e síntese de corantes usando lignina peroxidase fúngica. Anais do 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC, p. VIII.1, Rio de Janeiro, Brasil, 1999.

FERRER, I.; ESPOSITO, E.; DURÁN, N. Lignin peroxidase from *Chrysonilia sitophila* : Heat-denaturation kinetics and pH stability. *Letter Applied Microbiology* 13, 82-86, 1992.

FILIPIC, M.; TOMAN, M. J. Genotoxicity of influents and effluents of the wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*, 34, 7-8, 9-14, 1996.

FORRESTER, I. T.; BRABSKI, A. C.; MISHRA, C.; KELLY, B. D.; STRICKLAND, W. N.; LEATHAM, G. F. ; BURGESS, R. R. Characteristics and N-terminal amino acid sequence of a manganese peroxidase purified from *Lentinula edodes* culture grown on a commercial wood substrate. *Applied Microbiology Biotechnology*, 33, 359-365, 1990.

FREIRE R. S. , PELEGRINI R., KUBOTA L. T. ; DURÁN, N.; PERALTA-ZAMORA ,P., N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas, *Química Nova*, 23 , 4, 504-511, 2000.

FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T. Development of Laccase-based Flow Injection Electrochemical Biosensor for the determination of Phenolic Compounds and its Application for Monitoring Remediation of Kraft E1 Paper Mill Effluent. *Analytica Chimica Acta*, 463, 229-238, 2002.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource technology*; 79,2, 251-262, 2001.

GADD, G. M. Fungal Production Of Citric And Oxalic Acid : Importance In Metal Speciation, Physiology And Biogeochemical Processes. *Advances in Microbial Physiology* , 41, pp. 47-92, 1999.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Chemical constituents from roots and leaf stalks of açai (*Euterpe precatoria* Mart., *Arecaceae*). *Química Nova*, 28, 4, 610-613, 2005.

GARCIA, T. A. Produção e caracterização de duas lacases do Fungo *Pycnoporus sanguineus*, Tese de doutorado, Universidade de Brasília, 2006.

GARCIA, T. A.; SANTIAGO, M. F.; ULHOA, C.J. Properties of Laccases Produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5 xylydine. *Biotechnology Letters*, 28, 633-636, 2006).

GARG, S.K.; MODI, D.R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi *Critical Review of Biotechnology* , 19, 2 , 78-85, 1999.

GARRAWAY, M. O.; EVANS, R. C. Fungal Nutrition And Physiology. New York: J. Wiley, 1984.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. M. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes, *Biorremediation Journal*, 3, 1-25, 1999.

GOLD, M.H. ; ALIC, M. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews*. 57, 3, 605-622, 1993.

GONÇALVES, S.D. Tratamento dos efluentes industriais e seus impactos no meio ambiente. Em: *4º Encontro Racine para as Indústrias Farmacêuticas e Cosméticas*. Ed Racine, p. 59, 2000.

GROSS, J. H. Mass Spectrometry- A Textbook. Berlin: Springer, 2004.

HALLING-SORENSEN, B.; NORS NIELSEN, S.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F, HOLTEN LUTZHOFT, H. C.; JORGENSEN, S E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere*, 36, 2, 357–393, 1998.

HASSEMER, M. E. N.; SENS, M. L. Tratamento Do Efluente De Uma Indústria Têxtil Processo Físico-Químico Com Ozônio E Coagulação/Floculação. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 7, 1, 30-36, 2002 .

HATVANI, N. ; MECS, I. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicology Environmental Safety*; 55, 199-205, 2003.

HE, C.; XIONG, Y.; CHEN, J.; ZHA, C.; ZHU, X. Photoelectrochemical performance of Ag–TiO₂/ITO film and Photoelectrocatalytic activity towards the oxidation of organic pollutants. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 157, 1, 71-79, 2003.

HEBERER, T. Occurrence, Fate, And Removal Of Pharmaceutical Residues In The Aquatic Environment: A Review Of Recent Research Data. *Toxicology Letters*, 131, 1-2, 5–17, 2002.

HEIDLER, J., HALDEN, R. U. Mass Balance Assessment Of Triclosan Removal During Conventional Sewage Treatment. *Chemosphere*, 66,2, 362-369, 2006.

HERRERA, A.E.M. Produção e caracterização parcial de um composto de baixa massa molecular, com atividade fenoloxidásica e *Thermoascus aurantiacus*, Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 1995.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation, *Wood Science Technology*. 24, 23,1990.

HILTON, M.J., THOMAS, K.V. Determination Of Selected Human Pharmaceutical Compounds In Effluent And Surface Water Samples By High Performance Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Analysis*. 129, 41, 1015-1022, 2003.

HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K., KRATZ, K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Rev. Science Total Environment*; 225, 109-118, 1999.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30, 454-466, 2002.

HU, J. Y., ONG, S. L., NG, W. J., HE, B. P., LIU, W. J., FANG, Z. D., ZHANG, X. H., WANG, Z. S. Mutagenicity of polluted reservoir water and its reduction by a pilot-scale

integrated biological treatment process. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71, 1, 204–211, 2003.

INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS. Diagnóstico Das Condições Sedimentológicas Dos Principais Rios Brasileiros. 2ed. Rio de Janeiro: IPH/UFRGS, ELETROBRÁS, 1998.

JIANG, D.; ZHAO, H.; ZHANG, S.; JOHN, R. Kinetic Study Of Photocatalytic Oxidation Of Adsorbed Carboxylic Acids At TiO₂ Porous Films By Photoelectrolysis, *Journal of Catalysis*, 223,1, 212-220,2004.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Natural Mediator of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 2, 524-528, 2000.

JOHJIMA, T.; ITOH, N., KABUTO, M.; TOKIMURA, F.; NAKAGAWA, T.; WARIISHI, H.; TANAKA, H. Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, 96, 1989-1994. 1999.

JOLIBOIS, B.; GUERBET, M. Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the Salmonella fluctuation test and the SOS chromotest. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 565 , 2, 151–162, 2005.

JOLIBOIS, B.; GUERBET, M.; VASSAL, S. Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOS chromotest and Ames fluctuation test. *Chemosphere*, 51, 6, 539–543, 2003.

JONSSON, C.M.. Fosfatase ácida da microalga *Selenastrum capricornutum*: extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 117 p., 2005.

JORGENSEN, S. E.; HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the environment. *Chemosphere*, 40 , 7, 691–699, 2000.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*. 82, 215-217, 2002.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E.D. Biodegradation of textile effluents by *Pleurotus sajor-caju*. *Química Nova*, 28, 4 , 629-632, 2005.

KAPDAN, I. K.; KARGIA, F.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *T. versicolor*. *Enzyme and microbial technology*; 26, 381-387, 2000.

KARGALIOGLU, Y.; MCMILLAN, B. J.; MINEAR, R. A.; PLEWA, M. J. Analysis of the cytotoxicity and mutagenicity of drinking water disinfection by-products in *Salmonella typhimurium*. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 22, 2, 113–128, 2002.

KELLEY, R.L.; REDDY, C.A. Purification and Characterization of glucose oxidase from lignolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *Journal of Bacteriology*, 166, 269-274, 1986.

KHINDARIA A, GROVER T.A.; AUST S.D., Reductive dehalogenation of aliphatic halocarbons by lignin . Wood Science Technology,19, 521,1998.

KIM, S. J.; SHODA, M. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. Applied Environment Microbiology, 65, 1029 – 1035, 1999.

KIM, Y.; NICELL , J. A. , Laccase-catalysed oxidation of aqueous triclosan Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 81, 8 , 1344–1352, 2006.

KIRK, T.K., SCHULTZ, E., CONNORS, W.J., LORENZ, L.F.; ZEIKUS, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Microbiology. 117, 277-285, 1978.

KLING, S. H. Aplicação de lignina peroxidase fúngica na degradação de corantes. Anais do 3º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC, Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

KLONOWSKA, A.; GAUDIN, C.; FOURNEL, A.; ASSO, M.; PETIT, J.L.; GIORGI, M.; TRON, T. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. European Journal of Biochemistry. 269, 6119-6125, 2002.

KNAPP, J. S. ; NEWBY, P. S. The microbiological decolourization of an industrial effluent containing a diazo-linked chromophore. Water research; 29, 7, 1807-1809, 1995.

KOPPINKE, F. D.; POERSCHMANN, J.; STOTTMEISTER, U. Environment Science Technology, 29, 941-950, 1995.

KUMAHARA, M.; GLENN. J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters, 169, 242-247, 1984.

KUMARAN, P.; PARUCHURI, Y. L. Kinetics of phenol biotransformation. Water research, 31, 1, 11-22 ,1997.

KÜMMERER, K. Drugs, diagnostic agents and disinfectants in wastewater and water-a review. Rev. Schiftenr Ver Wasser Boden Lufthyg; 105, 59-71, 2000.

KÜMMERER, K. Resistance in the Environment: Kümmerer, K (ed), Pharmaceuticals in the Environment, sources, fate, effects and risks, second edition edn. Springer, 2004.

KÜMMERER, K.; HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. Clinical Microbiology and Infection, 9,12, 1203–1214, 2003.

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

- KUTLU, M.; AYDOGAN, G.; SUSUZ, F.; OZATA, A. The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk River in Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17, 2, 111–116, 2004.
- LANG, E.; ELLER, G.; ZADRAZI, F. Lignocellulose Decomposition and Production of Ligninolytic Enzymes During Interaction of White Rot Fungi with Soil Microorganisms *Microbial Ecology*, 34, 1, 1-10, 1997.
- LARRONDO, L.F.; SALAS, L.; MELO, F.; VICUÑA, R.; CULLEN, D. A Novel Extracellular Multicopper Oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with Ferroxidase Activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 ,10, 6257–6263, 2003.
- LEE, H.B.; PEART, T.E. Determination of 17 beta estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal AOAC International*, 81, 6, 1209-1216,1998.
- LEE, K.K., KASSIM; A.M., LEE H.K. The effect of nitrogen supplementation on the efficiency of colour and COD removal by Malaysian white-rot fungi in textile dyeing effluent. *Water Sci Technol.*50, 5, 73-77, 2004.
- LEFF, L. G.; DANA, J. R.; MCARTHUR, J. V.;SHIMKETS, L. J. Detection of Tn5-Like Sequences in Kanamycin-Resistant Stream Bacteria and Environmental DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 ,2, 417–421, 1993.
- LICCARDO, A; OLIVEIRA, E.F.; JORDT-EVANGELISTA, H. Rubis e Safiras de Minas Gerais, Brasil. *REM-Revista Escola de Minas*, 58, 3, 237-245, 2005.
- LILLY, V. G.; BARNETT, H. L. *Physiology of the Fungi*. New York: McGraw-Hill Book, 1951.
- LINKO, S. Production of *Phanerochaete chrysosporium* Lignin Peroxidase. *Biotechnology Advertisieng*, 10, 191,236-240, 1992.
- LOBOS, S.; LARRAÍN, J.; SALAS, L., CULLEN; D.; VICUNA, R. Isozymes of manganesedependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology*. 140, 1691-1698,1994.
- LÓPEZ, C., MOREIRA, M. T.,FEIJOO G., LEMA, J. M. Dye Decolorization by Manganese Peroxidase in an Enzymatic Membrane Bioreactor, *Biotechnol. Prog*, 20, 74-81, 2004.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275, 1951.
- LUND, MARTIN; ERIKSSON, MARIE; FELBY ; Claus , Reactivity of a Fungal Laccase towards Lignin in Softwood Kraft Pulp, *Holzforschung*,57, 21, 2003.
- MARQUES, L. A., Aplicação de Técnicas Avançadas de Espectrometria de Massas em Ciências de Alimentos e Perfumaria. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química, 69, 2006.

MARTÍNEZ, A.T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*. 30, 425-444, 2002.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60 ,6, 551-565, 2002.

MCLAUGHLIN, J. L.; COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; ANDERSON, J. E. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*; 18, 4, 13-8, 1995.

MELO, P. S.; FABRIN-NETO, J. B., MORAES, S. G.;M. ASSALIN, R.; DURÁN, N. , HAUN, M. Comparative toxicity of effluents processed by different treatments in V79 fibroblasts and the *Algae Selenastrum capricornutum*, *Chemosphere*, 62, 1207–1213, 2006.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Biodegradation of Wastewater from Dairy Industries Previously Treated with Lipases. *Brazilian Journal Food Technology*, 9, 2, 143-149, 2006.

MILLER, G. S. DNS, *Analytical Chemistry*, 31, 3, 426-428, 1959.

MOHAN, S. V.; PRAKASHAM, R. S.; SATYAVATHI, B., ANNAPURNA, J. ; RAMAKRISHNA, S. V. Biotreatability studies of pharmaceutical wastewater using an anaerobic suspended film contact reactor. *Water science technology*; 43, 2, 271-6, 2001.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; COLLIVIGNARELLI, C.; GUZZELLA, L.; ZERBINI, I., BERTANZA, G.; PEDRAZZANI, R. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Research*, 34 ,17, 4261–4269, 2000.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria De Massas Com Ionização Por Electrospray Aplicada Ao Estudo De Espécies Inorgânicas E Organometálicas. *Química Nova*, 26, 4, 556-563, 2003.

MORAIS, J. L.; SIRTORI, C.; PERALTA-ZAMORA P. G. Tratamento de chorume de aterro sanitário por fotocatalise heterogênea integrada a processo biológico convencional. *Química Nova*, 29, 1, 20-23, 2006.

MORAIS, J. L. Estudo da Potencialidade de Processos Oxidativos Avançados, Isolados E Integrados Com Processos Biológicos Tradicionais, Para Tratamento de Chorume de Aterro Sanitário, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Exatas, Curitiba, 2006.

MORAIS, J. L.; SIRTORI, C.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Tratamento De Chorume De Aterro Sanitário Por Fotocatalise Heterogênea Integrada A Processo Biológico Convencional *Química Nova*, 29, 20-23, 2006.

MOREIRA, F. P. M.; COUTINHO, V., MONTANHER, A. B. P.; CARO, M. S. B. ; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. MONACHE, F. D. Flavonóides E Triterpenos de *Baccharis Pseudotenuifolia* – Bioatividade Sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, 26, 3, 309-311, 2003.

NAGAI, M.; SATO, T.; WATANABE, H.; SAITO, K.; KAWATA, M.; ENEI, H. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 3, 327-335, 2002.

NANDY, T. KAUL, S. N. Anaerobic pre-treatment of herbal-based pharmaceutical wastewater using fixed-film reactor with recourse to energy recovery. *Water research*, 35, 2, 351-362, 2001.

NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 270,45 ,45, 1995.

NEW, A. P.; FREITAS DOS SANTOS, L.M.; LO BIUNDO, G.; SPICQ, A. Analytical techniques used for monitoring the biodegradation of flourinated compounds in waste streams from pharmaceutical production. *Journal chromatografy A*; 889, 1-2,, 177-184, 2000.

NIELEN, M. W. F.; BOVEE, T. F. H.; VAN ENGELEN; M. C., RUTGERS P.; HAMERS, A. R. M., VAN RHIJN J. H. A.; HOOGENBOOM L. R. A. P. Urine Testing for Designer Steroids by Liquid Chromatography with Androgen Bioassay Detection and Electrospray Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification. *Analitical Chemistry*, 78, 2, 424-431, 2006.

NOGUEIRA, R.F.P.; JARDIM, W.F. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental, *Química Nova*, 21,1, 69-76, 1998.

NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D. ; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES,R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus L.* (alcachofra) cultivada no Brasil. *Química Nova*, 26, 3, 331-334, 2003.

NOVOTNY, C.; RAWAL, B.; BHATT, M.; PATEL, M.; SASEK, V.; MOLITORIS, H.P. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes, *Journal of Biotechnology*; 89, 113-122, 2001.

O'NEILL, F. J.; BROMLEY-CHALLENGER, K.C.A.; GREENWOOD, R.J.; KNAPP, J.S Bacterial growth on aniline: implications for the biotreatment of industrial wastewater. *Water research*, 34, 18, 4397-4409, 2000.

ONO, Y., SOMIYA, I., KAWAGUCHI, T., MOHRI, S. Evaluation of toxic substances in effluents from a wastewater treatment plant. *Desalination*, 106, 1-3, 255-261, 1996.

PAICE, MG, REID, I. D. , BOURBONNAIS, ARCHIBALD, F. S ., JURASECK, J. Manganese Peroxidase, Produced by *Trametes versicolor*, during Pulp Bleaching, Demethylates and Delignifies Kraft Pulp. *Applied and Enviromental Microbiology*, 59, 1, 260-265,1992.

PALMIERI, G.; GIARINA, P; MARZULLO, L; DESIDERIO, B., NITTI, G.; CANNIO, R.Ç SANNIA, G. Stability and activity of phenol oxidase from Lignolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 39, 632-636, 1993.

PARK, J. H., LEE, B. J., LEE, S. K, KIM, K., LEE, K. H., CHE, J. H., KANG, K. S., LEE, Y. S. Genotoxicity of drinking water from three Korean cities. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 466, 2, 173–178, 2000.

PASCHOAL, F. M. M., TREMILIOSI-FILHO, G. Application of the electroflocculation technology for the recovery of indigo blue from industrial effluents. *Química. Nova*, 28, 5, 766-772, 2005.

PELEGRINI, R. T., Tratamento do Corante Reativo e Lignina Sulfonato pelo Processo Fotocatalítico Eletroquimicamente Assistido, Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

PERALTA-ZAMORA, P.; KUNZ, A; MORAIS, S.G.; PELEGRINI, R.; MOLEIRO, P.C., J.REYES, DURAN, N. Degradation of reactive dyes I. A comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical process. *Chemosphere*,. 38, 4, 835-839, 1999.

PERALTA-ZAMORA, P.; KUNZ,A; MORAIS, S.G.; PELEGRINI, R.; MOLEIRO, P.C., J.REYES, DURAN, N. Degradation of reactive dyes I. A comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical process. *Chemosphere*, 38, 4, 835, 1999.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, S.G.; PELEGRINI R.; FREIRE JR , M.; REYES, J.; MANSILLA , DURAN,H., N. Evaluation of ZnO, TiO₂ and Supported ZnO on the Photoassisted Remediation of Black Liquor. *Chemosphere* , 36, 9, 2119, 1998.

PLETSCH, M.; DE ARAUJO, B.; CHARLWOOD; B. Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnology Advances*,17, 8, 679-687, 1999.

POINTING, S. B.; VRIJMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 3, 317-318, 2000.

PONEZI, A. N.; DUARTE, M. C. T.; CORAUCCI FILHO, FIGUEIREDO, R. F. Analysis Of Biodegradation Of Citric Oil Compounds By Gc/Msd And Analysis Of The Microbial Population Of An Activated Sludge Reactor In The Treatment Of A Citric Wastewater. *Engenharia Sanitária Ambiental* ,10, 4 , 278-284,2005.

POWLOWSKI, J.; SHINGLER, V. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation*; 5, 219-236, 1994.

PRADO, A. G. S., *Química Verde, Os Desafios Da Química Do Novo Milênio*, Química Nova, 26, 5, 738-744, 2003.

RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASILCHENKO, L.G. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 40, 1, 1-17, 2004.

REINHAMMAR, B., Laccase. Em: *Koper Proteins and Koper Enzymes*, R. Lontil (ed.), Boca Raton, CRC Press, 3, 2-35, 1984.

RENGANATHAN, S.; RICHARD THILAGARAJ,W.; MIRANDA, L. R.; GAUTAM, P. ; VELAN,M. Accumulation of Acid Orange 7, Acid Red 18 and Reactive Black 5 by growing *Schizophyllum commune* Bioresource Technology.97, 16 , 2189-2193, 2006.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource technology, 77, 247-255, 2001.

ROCKNE, K. J.; STRAND, S. E. Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. Water research, 35,1, 291-299, 2001.

ROSÉN, M.; WELANDER, T.; LÖFQVIST, A.; HOLMGREN, J. Development of a new process for treatment of a pharmaceutical wastewater. Water Science Technology, 37 , 9, 251-258, 1998.

SANTANA, V. S.; MACHADO, N. R. C. F. Degradação fotocatalítica de efluentes de indústria têxtil empregando TiO₂ e Nb₂O₅, sob irradiação visível. Acta Scientiarum Maringá, 24, 6, 1681-1686, 2002.

SANTIAGO, M. F. Estudo De Substâncias De Baixa Massa Molar Que Mimetizam As Fenoloxidasas Com Aplicações Em Tratamentos De Efluentes Industriais, Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas,1999.

SARAVANANE, R.; MURTHY, D. V. S.; KRISHNAIAH, K. Bioaugmentation and treatment of cephalixin drug-based pharmaceutical effluent in an upflow anaerobic fluidized bed system. Bioresource technology; 76, 3, 279-81, 2001.

SCHERER, M. ; FISCHER, R. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiology Letters, 199, 2, 207-213, 2001.

SCHLIEPHAKE, K.; MAINWARING, D. E.; LONERGAN, G. T.; JONES, I. K. ; BAKER, W. L. Transformation and degradation of the disazo dye Chicago sky blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. Enzyme Microbial Technology, 27, 100-107, 2000.

SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, M.B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L.K.; OSTERGAARD, P.R. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. Enzyme Microbial Technology. 25, 502-528, 1999.

SCHULTZ, M. M.; BAROFSKY, D. F.; FIELD, J. A. Quantitative Determination of Fluorinated Alkyl Substances by Large-Volume-Injection Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry-Characterization of Municipal Wastewaters Environmental Science Technology, 40, 1, 289 -295, 2006.

SHIN, K-S. The Hole of Enzymes Produced by White-rot fungus *Irpex lacteus* in the Decolorization of Textile Industry Effluent. The Journal of Microbiology, 42, 37-41, 2004.

SILVA, A. C. Tratamento do Percolado de Aterro Sanitário e Avaliação da Toxicidade Do Efluente Bruto e Tratado. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 111, 2002.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D., PEREIRA, GOMES, N. F.; Garcez, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. Química Nova, 21,557-559, 1998.

SKOOG; D. A., HOLLER; F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental, 5^a. ed., (Ignez Caracelli, Paulo C. Isolani et al. - trads., Célio Pasquini, supervisão e revisão), Porto Alegre/São Paulo, Artmed - Bookman , 836 , 2002.

SMANIA, E. F. A.; SMANIA JUNIOR, A.; LOGUERCIO-LEITE, C. Síntese de cinabarina por *Pycnoporus sanguineus* e sua atividade antimicrobiana sobre bactérias isoladas de alimentos. Revista de Microbiologia, 29, 4, 317-320, 1998.

SORSA, M.; HEMMINKI, K.; VAINIO, H. Occupational exposure to anticancer drugs - Potential and real hazards. Mutation Research, 154, 135–149, 1985.

STEFANELLO, M. É. A.; SALVADOR, M. J. ; ITO, I. Y.; MACAR, P. A.T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha ssp floccosa*, Revista Brasileira de Farmacognosia, 16, 4, 525-530,. 2006.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes –mine review. Applied Microbial Biotechnology; 56, 69-80, 2001.

SUGIURA, M.; HIRAI, H. ; NISHIDA, T. Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochate sordida* YK-624. FEMS Microbiology Letters. 224, 285-290, 2003.

SUNDARAMOORTHY, M.; KISHI, K., GOLD, M. H.; POULOS, T. L. Crystal Structures of Substrate Binding Site Mutants of Manganese Peroxidase. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 28, 17574, 1997.

SUNDARAN, U.M., ZHANG, H.H., HEDMAN, B., HODGSON, K.O. AND SOLOMON, E.I. Journal of American Chemistry Society, 119, 12525,1997.

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.

TAUCHERT, E. ; PERALTA-ZAMORA, P . Avaliação De Processos Fotoeletroquímicos No Tratamento De Líquidos Lixiviados De Aterros Sanitários Engenharia Sanitária e Ambiental, 9, 3, 197-201, 2004.

TERNES, T., BONERZ, M., SCHMIDT, T. Determination Of Neutral Pharmaceuticals In Wastewater And Rivers By Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. J. Chromatogr. A. 938 ,1/2, 175–185, 2001.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. Microbiology, 140, 19-26, 1994.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceeding National Academic Science USA*. 81, 2280-2284, 1984.

TONDO, E. C.; ANDRETTA, C. W. S.; SOUZA, C. F. V.; MONTEIRO, A. L.; HENRIQUES, J. A. P. ; AYUB, M. A. Z. Altos níveis de biodegradação do 4,5,6-tricloroguaiacol por *Bacillus* sp. isolado de efluente de indústria de polpa de celulose. *Revista de Microbiologia*, , 29, 4, 265-270, 1998.

TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; BORGNE, S. L. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*. 46, 1-15, 2003.

TRUPKIN, S.; LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F. ; VIALE, A. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30, 682-690, 2003.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K. , FLECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinations for wood decay, *Journal of Biotechnology*, 41, 1, 1995.

UMBUZEIRO, G. D.; ROUBICEK, D. A.; SANCHEZ, P. S.; SATO, M. I. Z. The Salmonella mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 491, 1-2, 119–126, 2001.

UNAL, A.; KOLANKAYA, N. Dechlorination of Bleached Kraft Pulp by Laccase Enzyme Produced from some White-rot Fungi. *Turkish Journal Biology*, 25, 67-72, 2001.

USEPA. Development documents for effluent limitations guidelines and standards for the pharmaceutical manufacturing point source category. EPA, 440, 84, 1-83, 1983.

VAN DER MERWE, J. J. Production of laccase by the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. Dissertação de mestrado, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa, 125 p., 2002.

VANEGAS, C.; ESPINA, S.; BOTELLO, A. V.; VILLANUEVA, S. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 58, 87-92, 1997.

WEBB, S. F. A Data-based Perspective on the environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals I - Collation of Available Ecotoxicity Data. Páginas 175–201 de: Kümmerer, K (ed), *Pharmaceutical in the Environment: Sources, fate, effects and risks*. Berlin Heidelberg New York: Springer, 2001.

WESENBERG, D., KYRIAKIDES, I.; AGATHOS. S.N.. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22, 161-187. 2003.

WHO (World Health Organization), International Drug Monitoring, the Role of National Centers. Report of a WHO Meeting. Geneva: WHO, 1972.

WU, J.; XIAO Y.; YU, H. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource Technology*, 96,12 , 1357-1363, 2005.

www.meiaponte.org/bacia.htm, acessado em 22 de fevereiro de 2002.

YIANG BIAN, P.E.; NIGEL, J.S.; YU, C. Conversion from Oxidation Ditch to Sequencing Batch Reactor for the Treatment of Pharmaceutical Wastewater. 19th Conference of the International Assess on Water Quality. Vancouver, Canada, P6003, 1998.

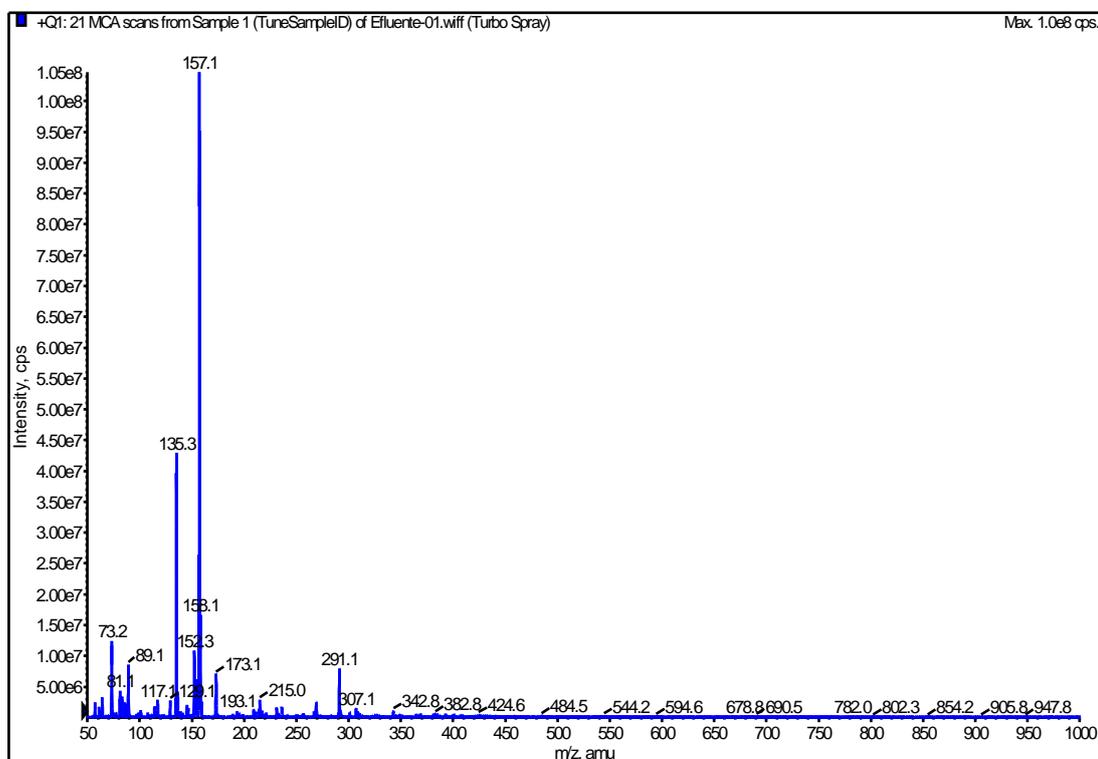
ZHAO, J.; KWAN, H. S.Characterization, Molecular Cloning, and Differential Expression Analysis of Laccase Genes from the Edible Mushroom *Lentinula edodes* Applied. *Environmental. Microbiology*, 65, 4908-4913, 1999.

ZIOLLI, R. L.; JARDIM, W. F. Mecanismo de Fotodegradação e Compostos Orgânicos Catalisada Por TiO_2 , *Química Nova*, 21, 3, 319-325, 1998.

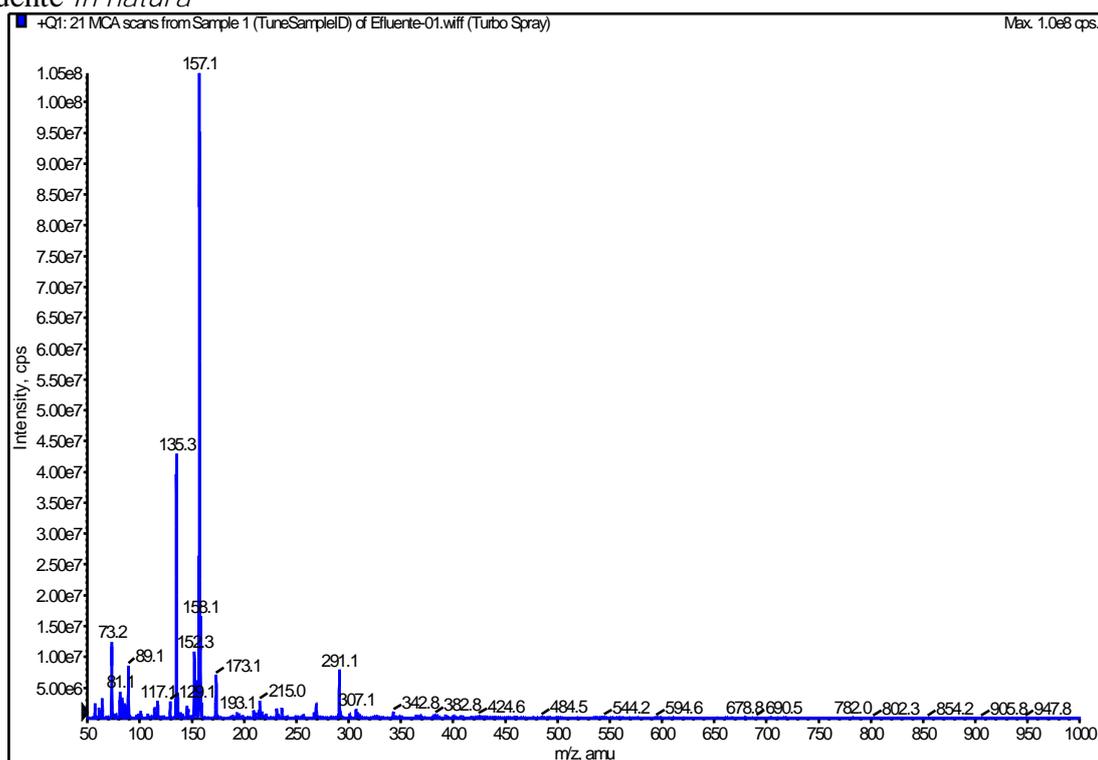
APÊNDICE

Espectros de massa

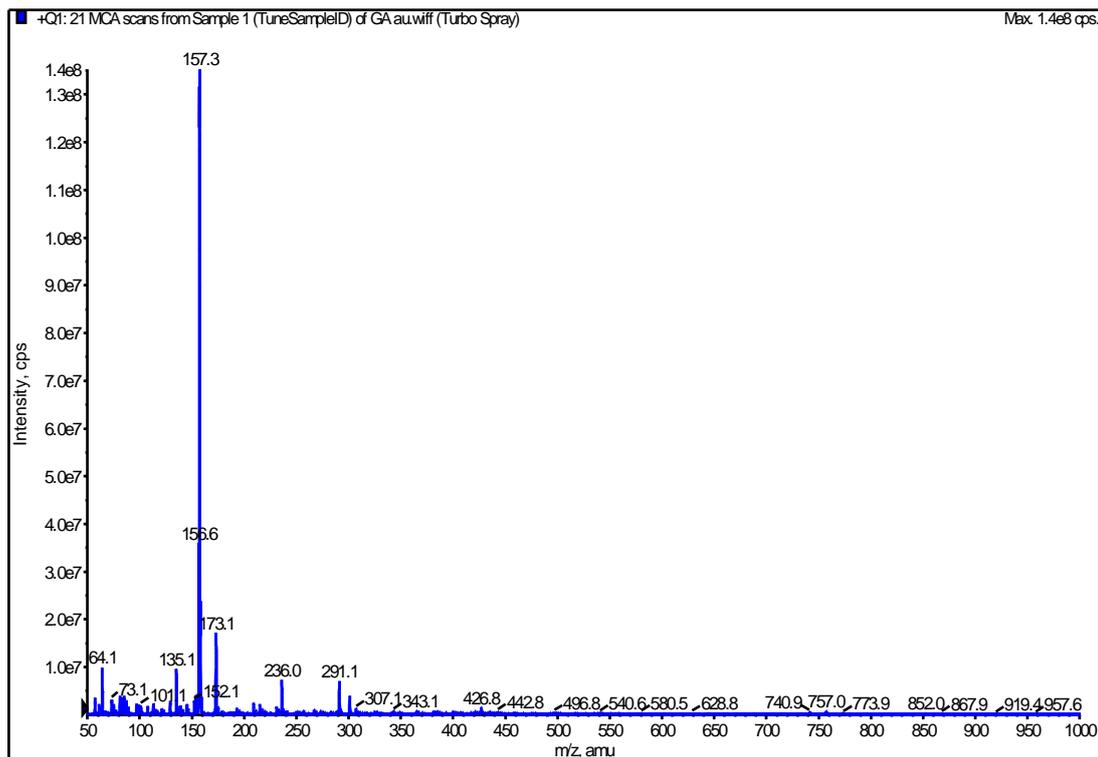
Amostra 1 sem tratamento



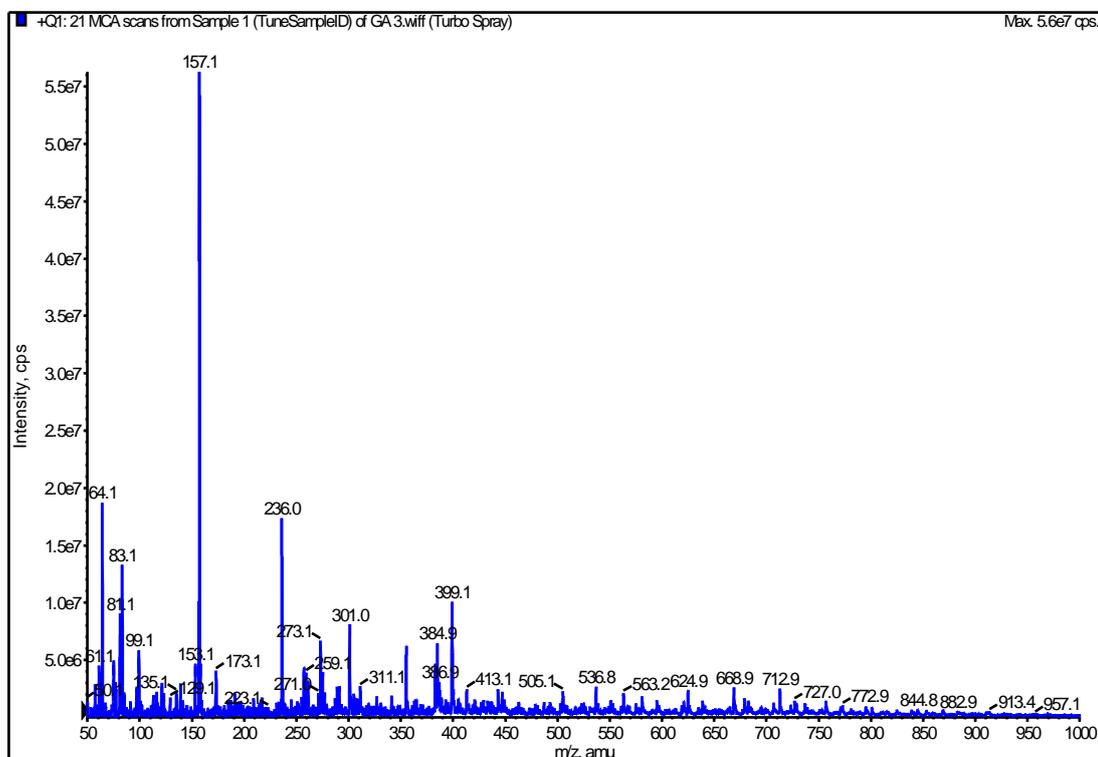
Amostra 1 com tratamento

*Ganoderma applanatum*Efluente *in natura*

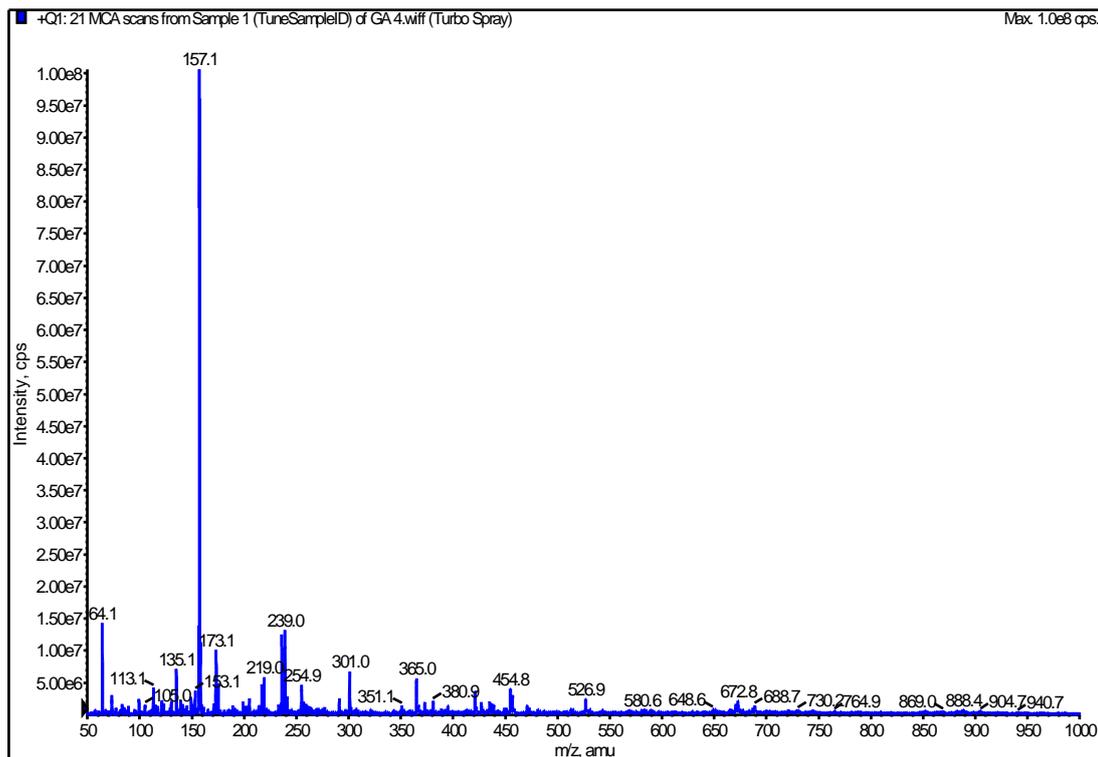
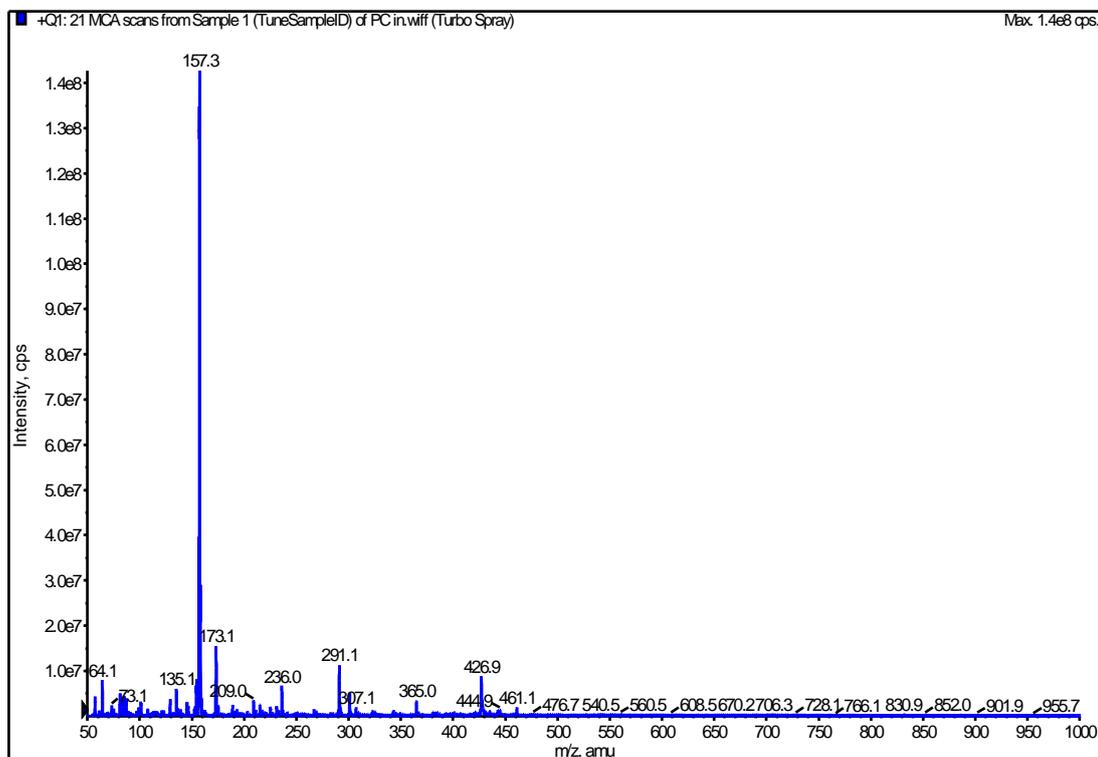
Efluente autoclavado



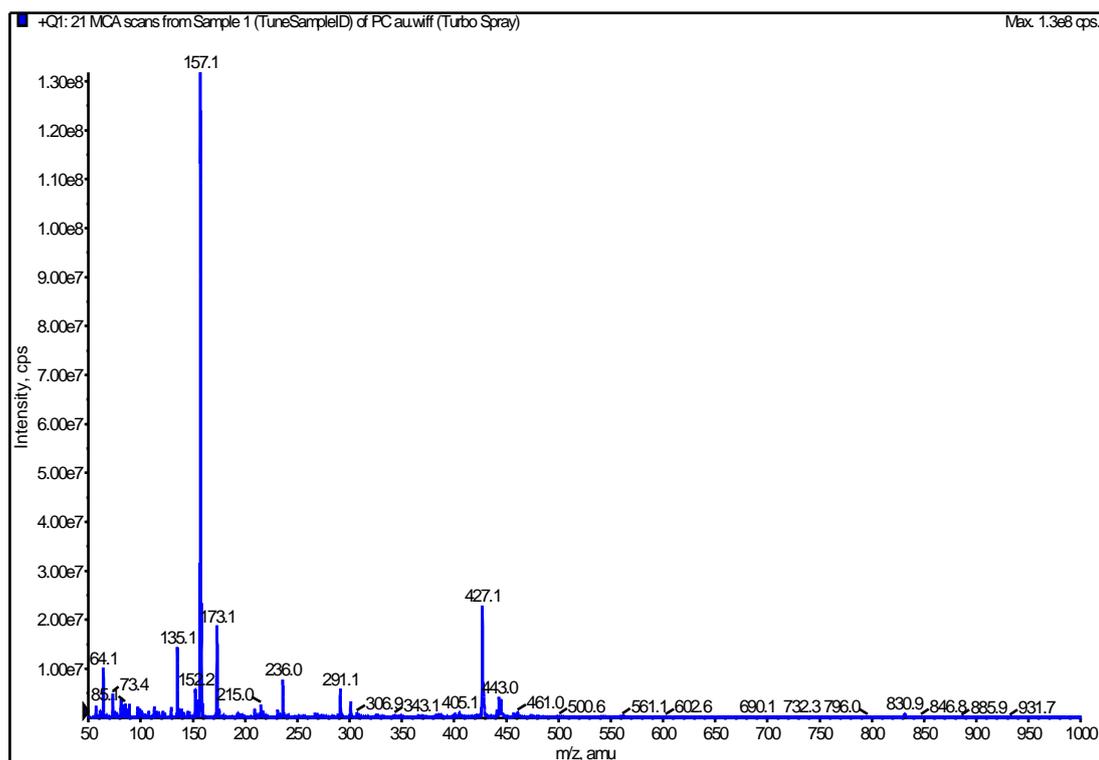
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



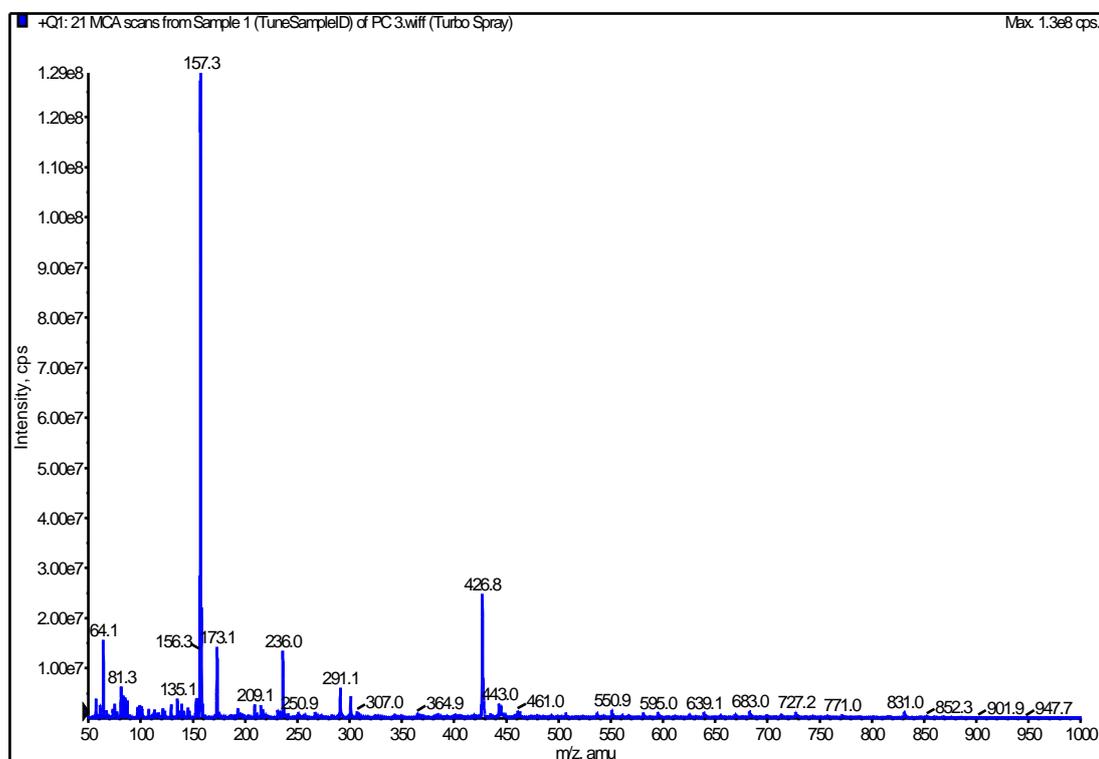
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Phanerochaete chrysosporium*Efluente *in natura*

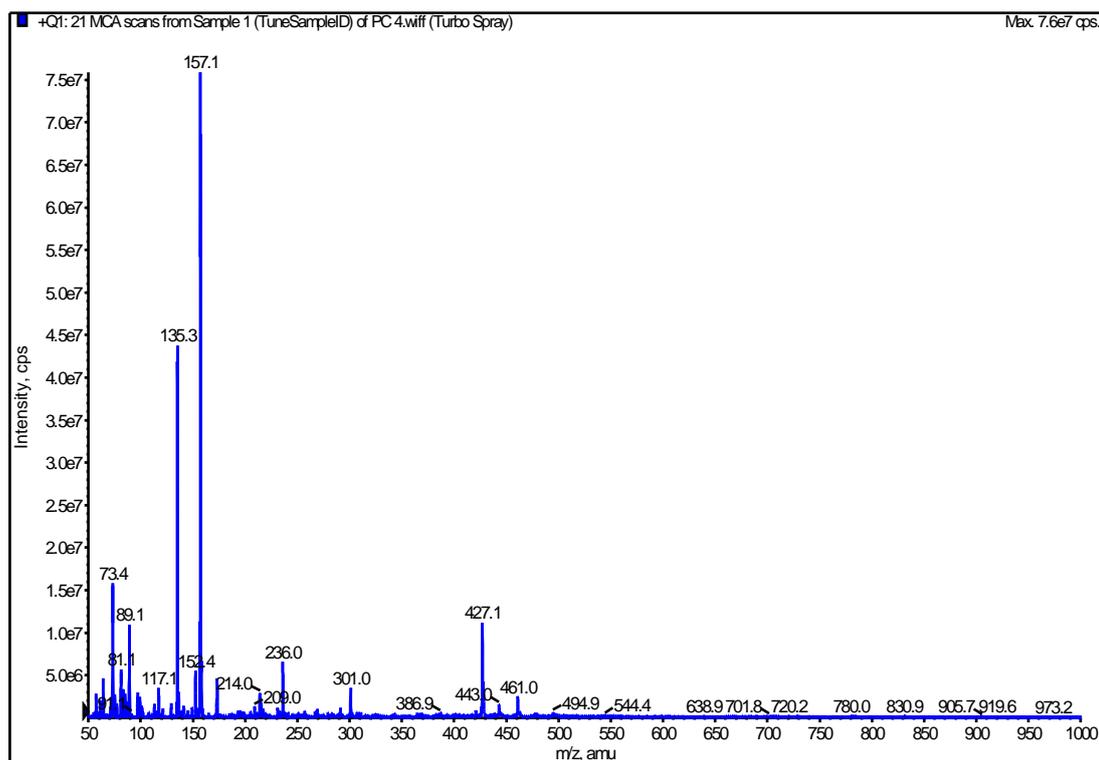
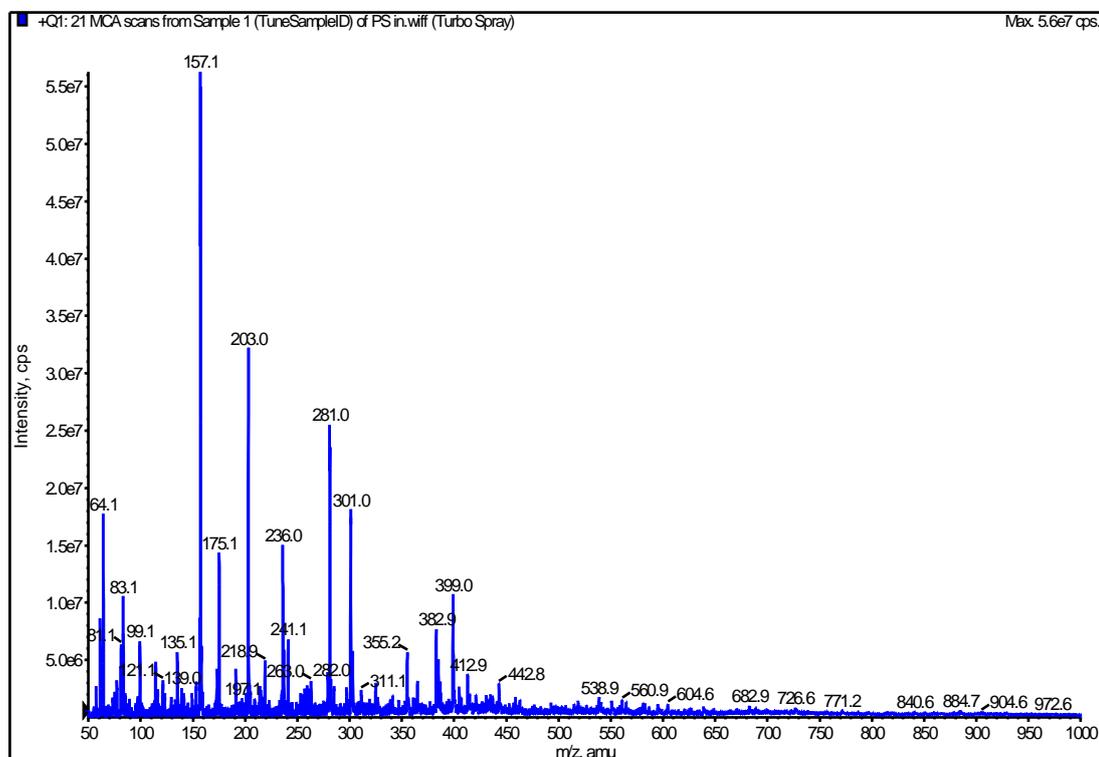
Efluente autoclavado



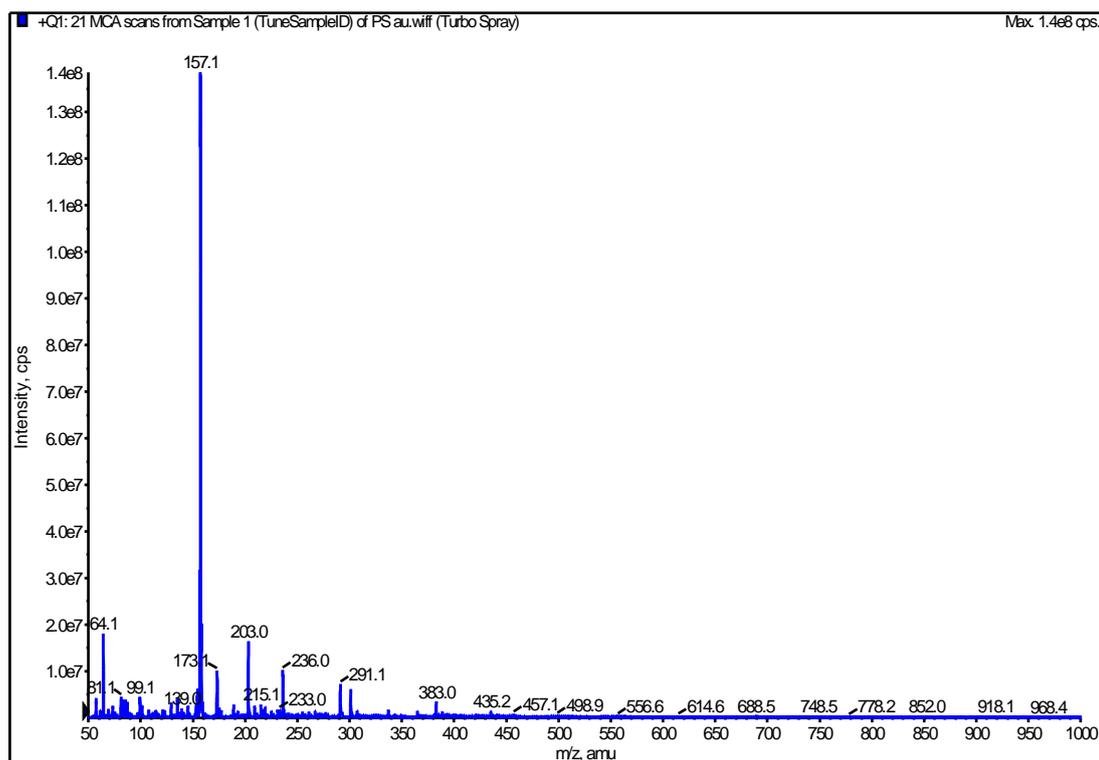
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



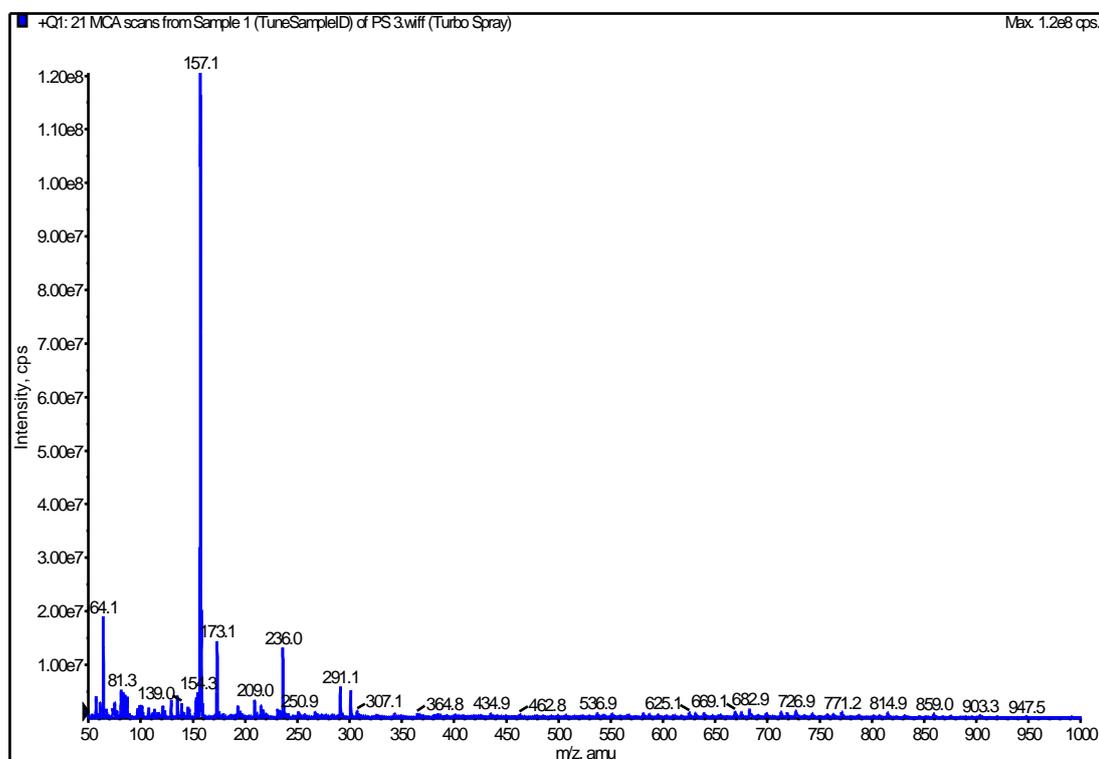
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Pycnoporus sanguineus*Efluente *in natura*

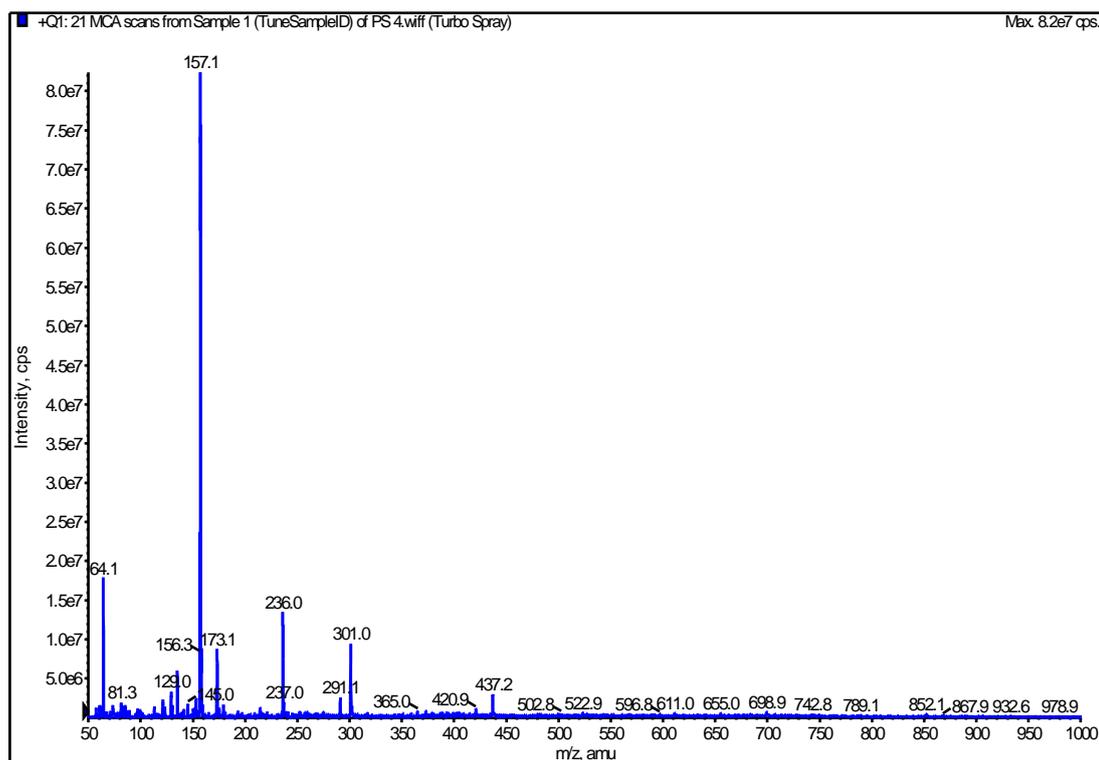
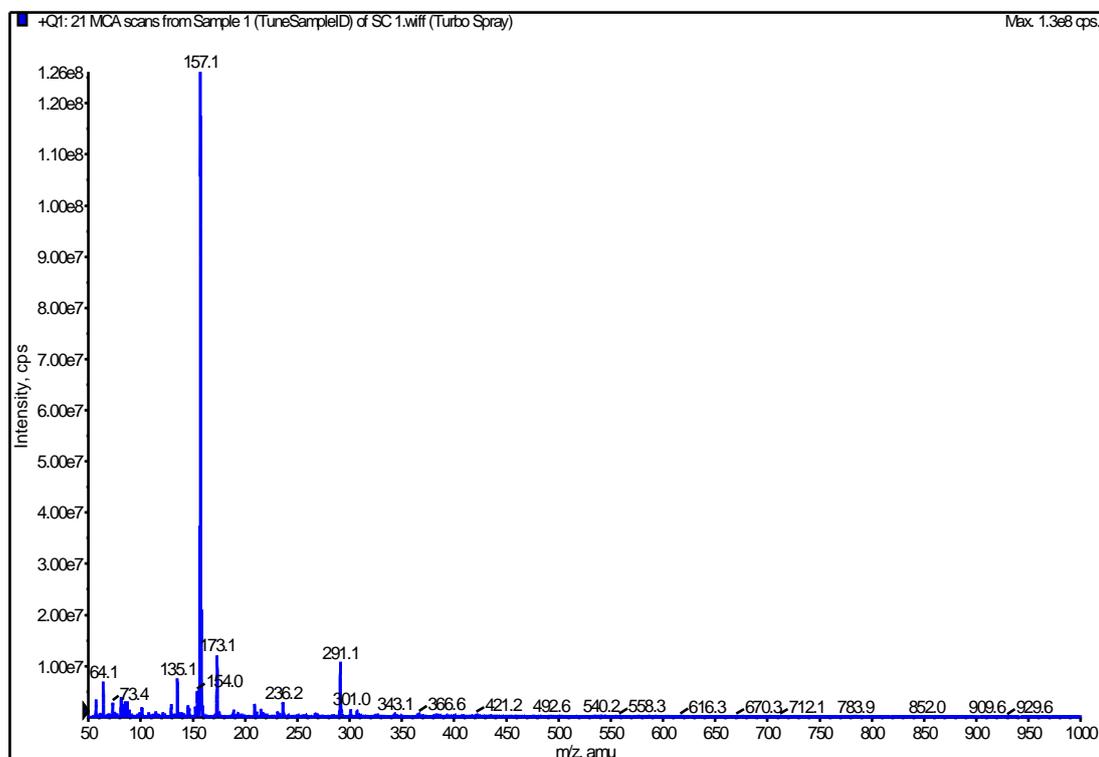
Efluente autoclavado



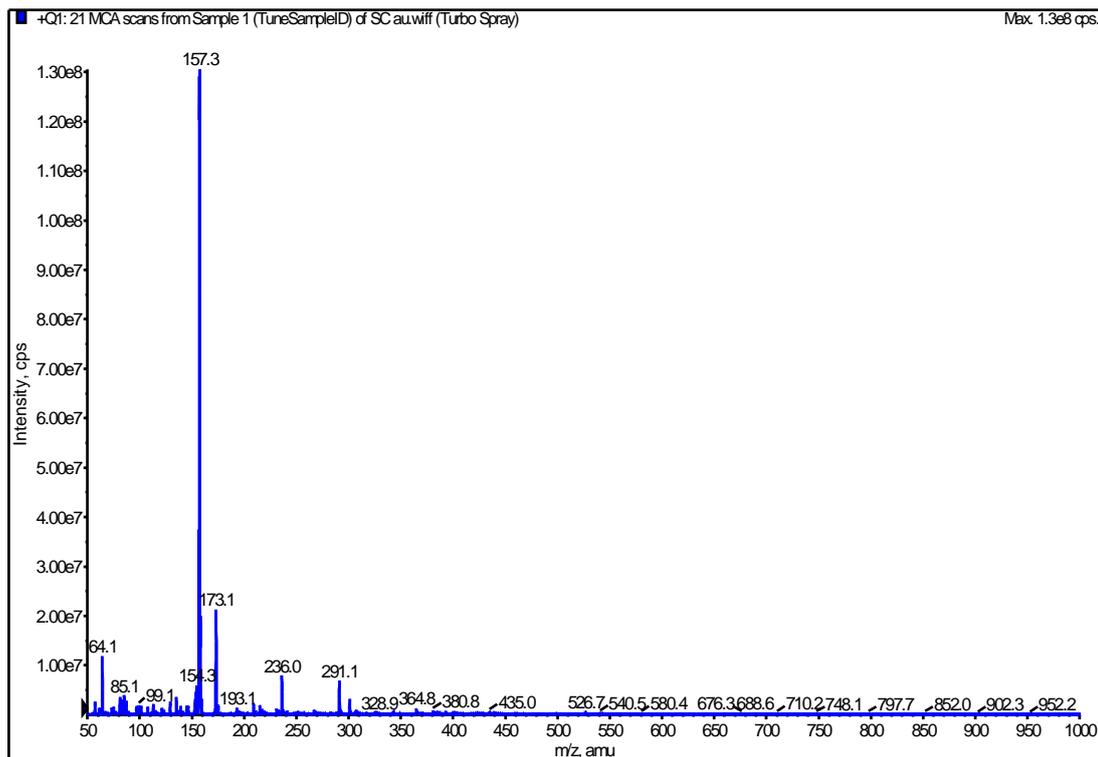
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



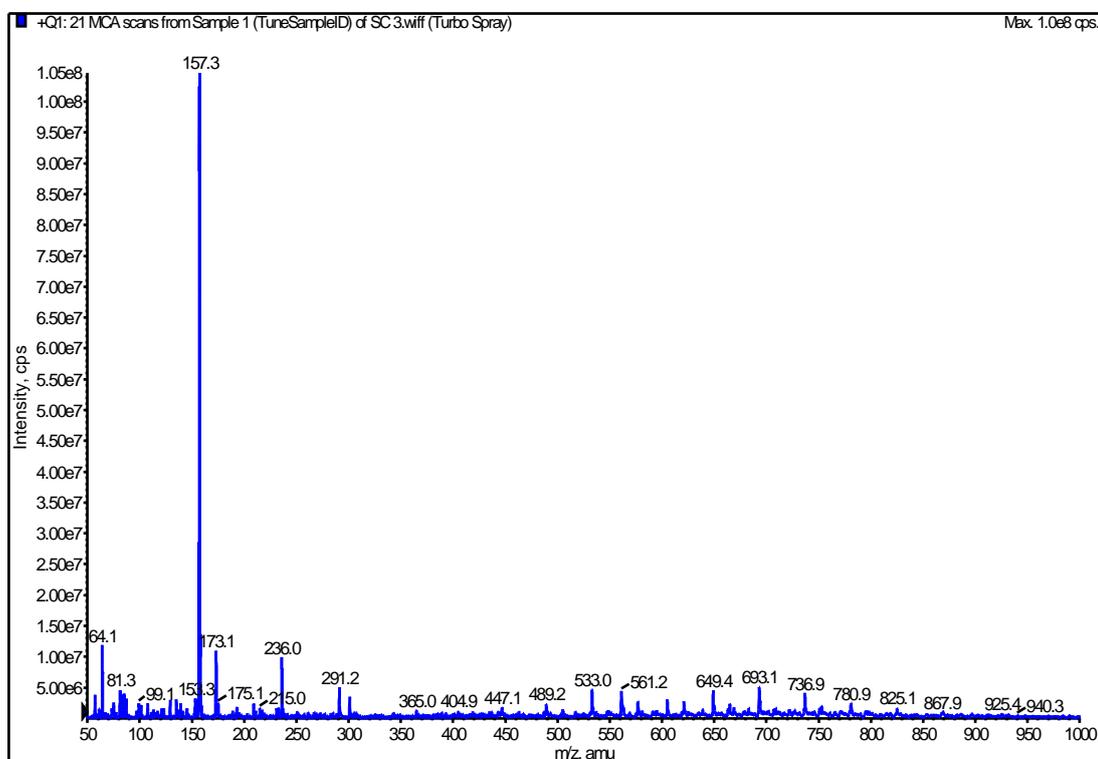
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Schizophyllum commune*Efluente *in natura*

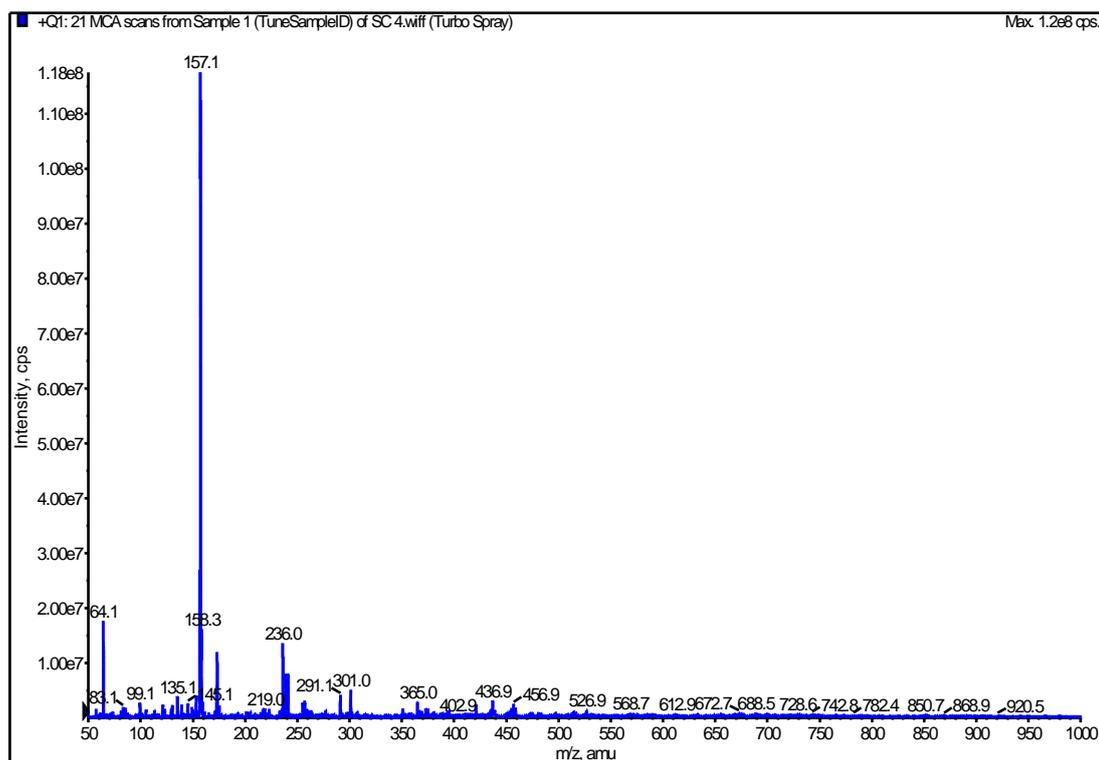
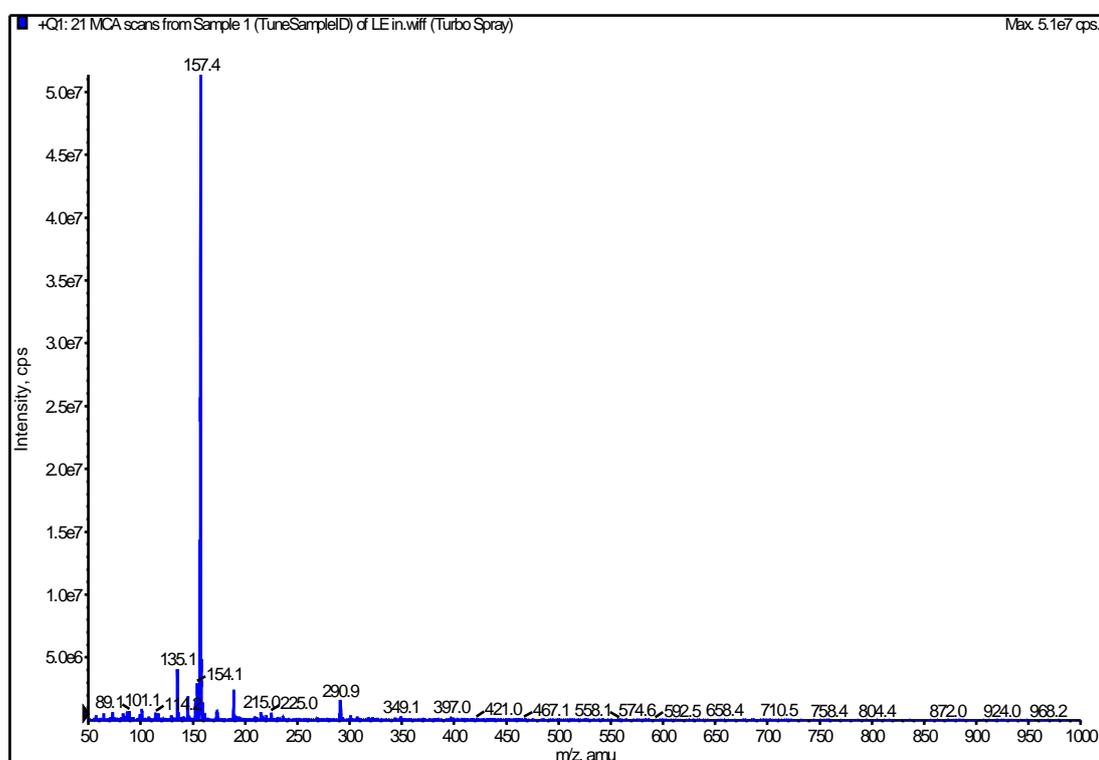
Efluente autoclavado



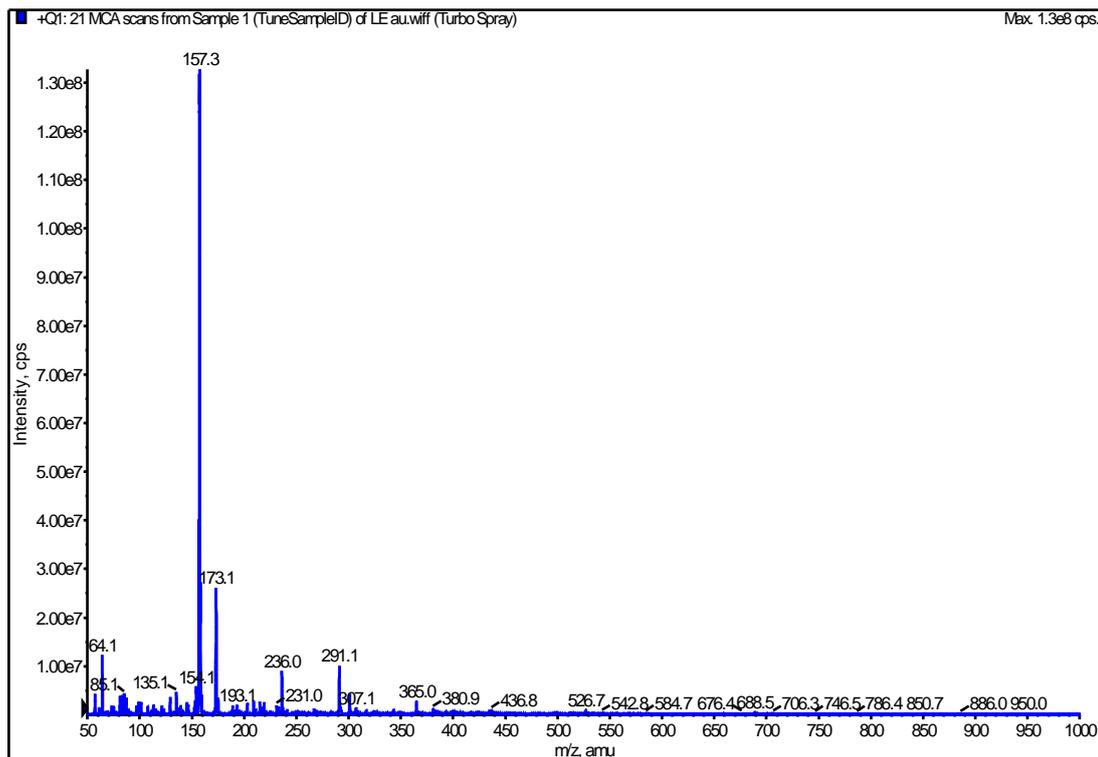
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



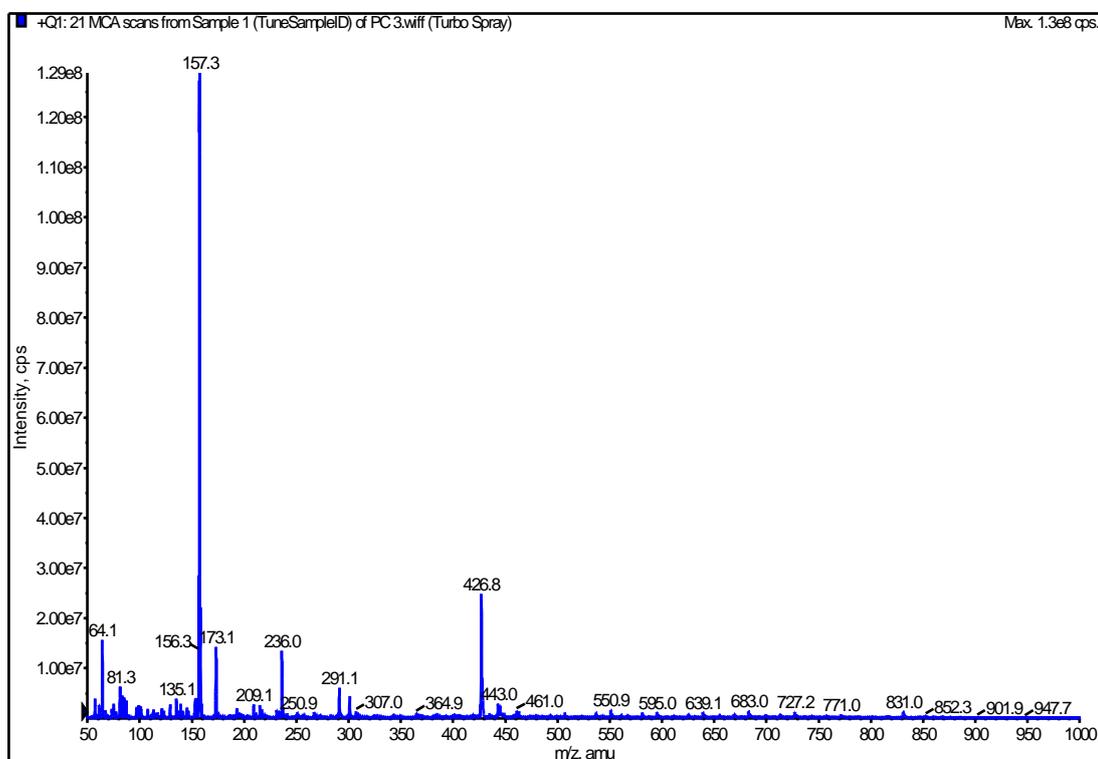
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Lentinus edodes*Efluente *in natura*

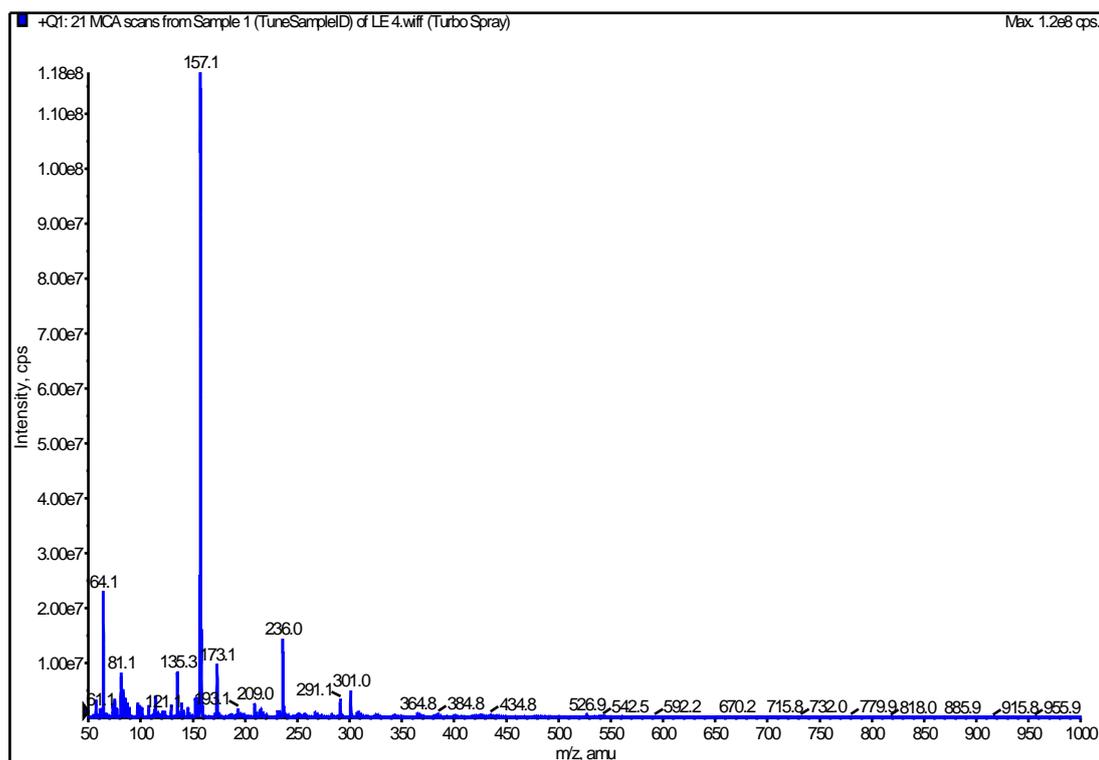
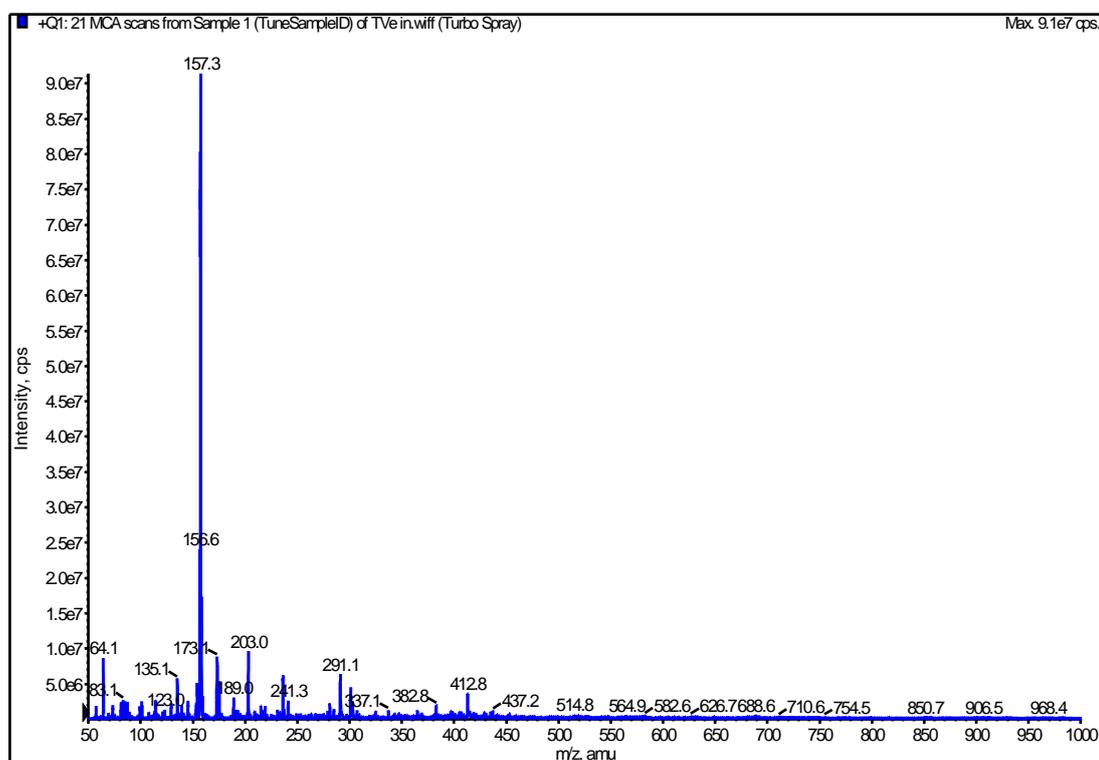
Efluente autoclavado



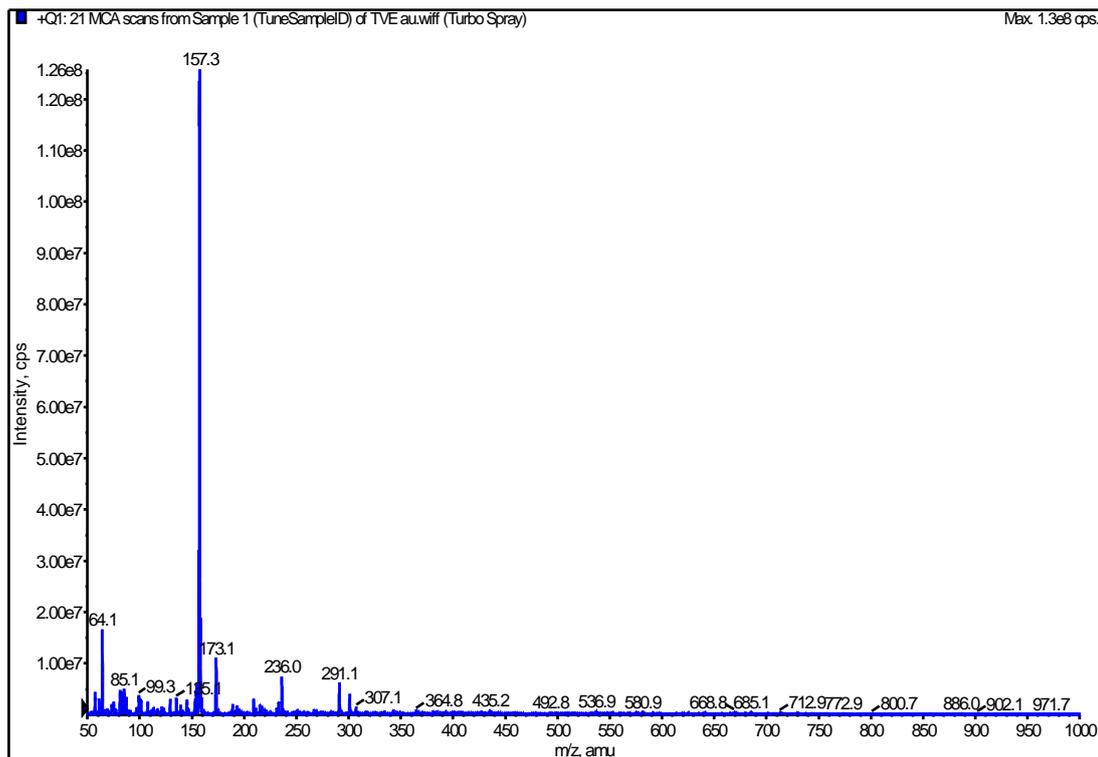
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



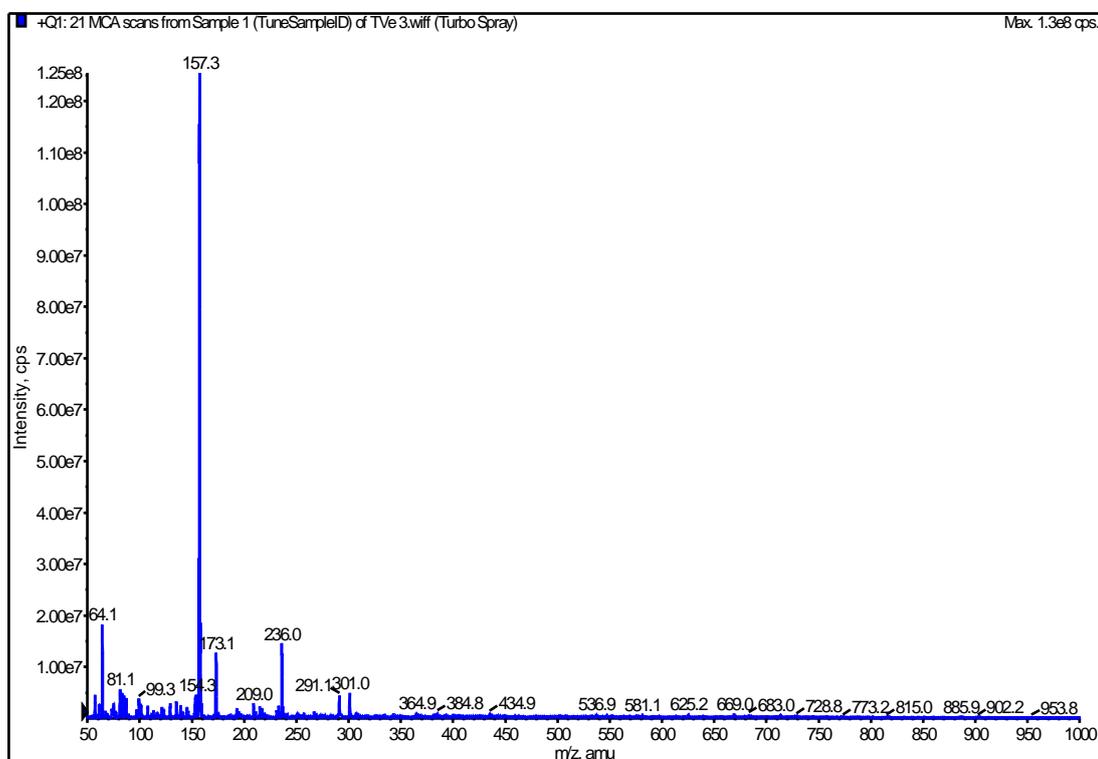
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Trametes versicolor*Efluente *in natura*

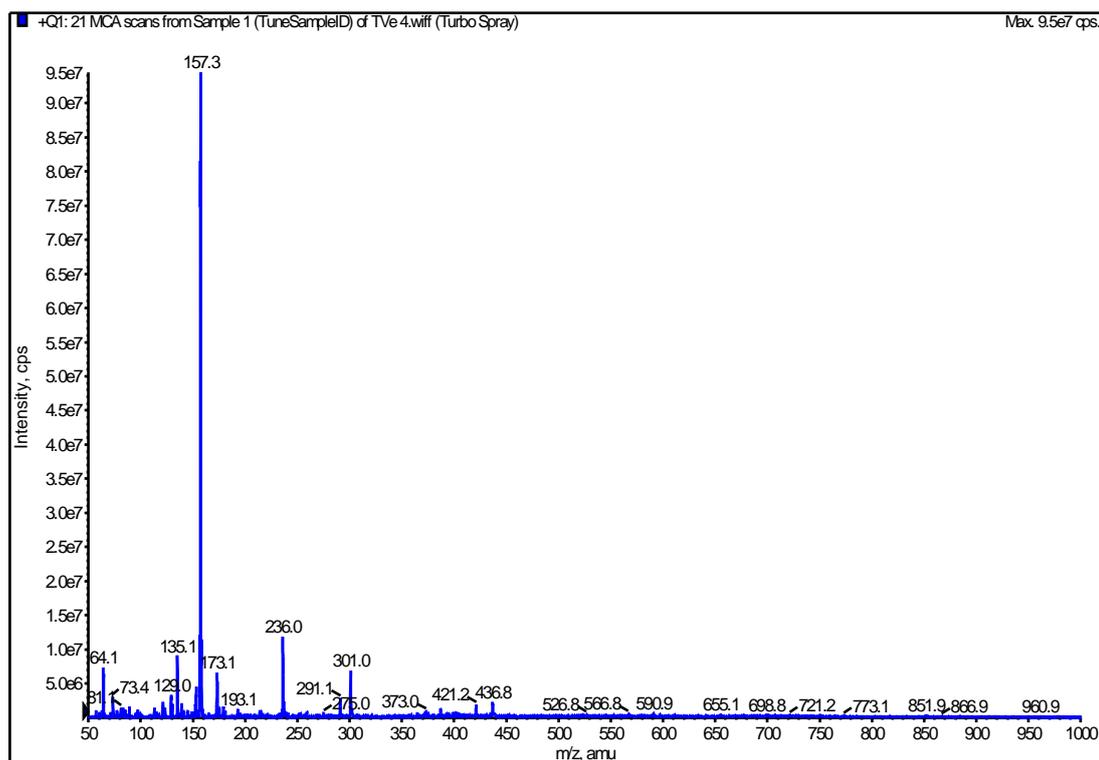
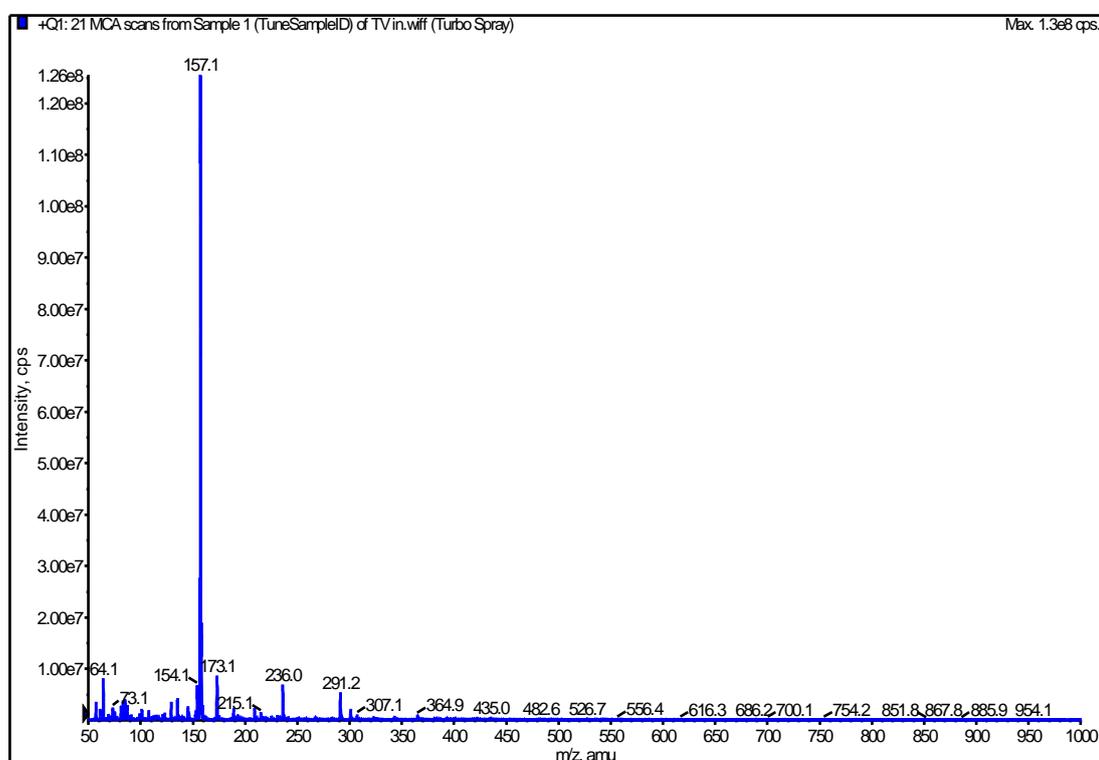
Efluente autoclavado



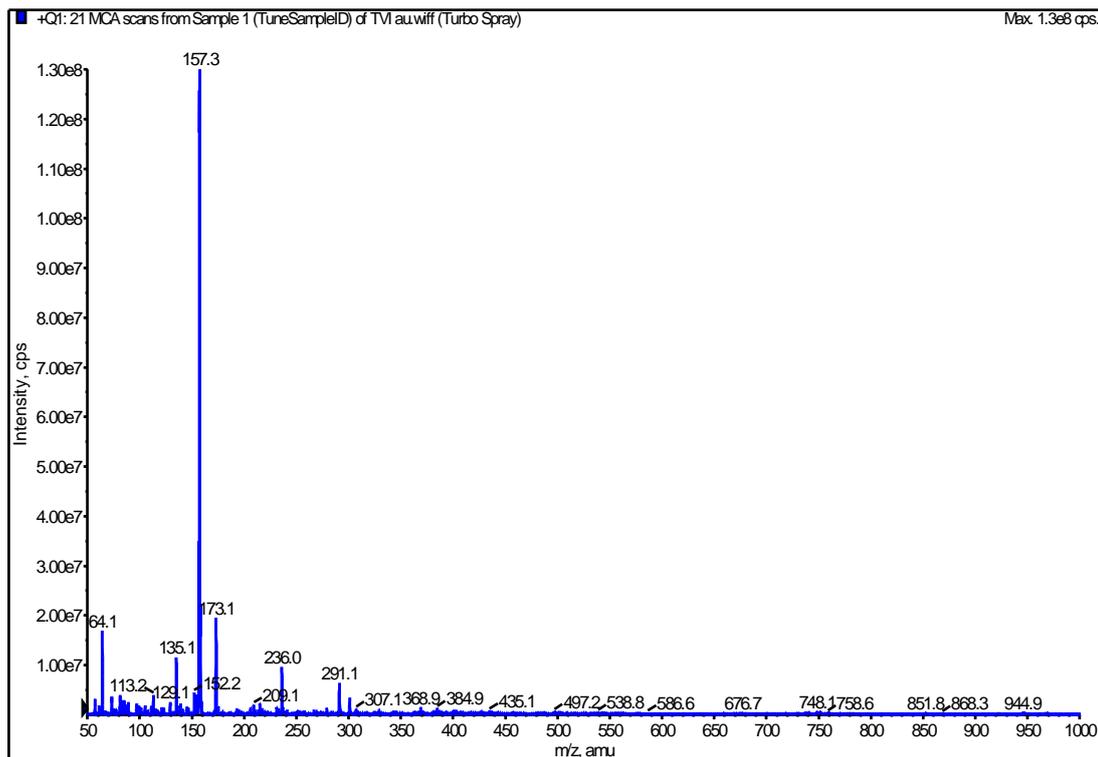
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



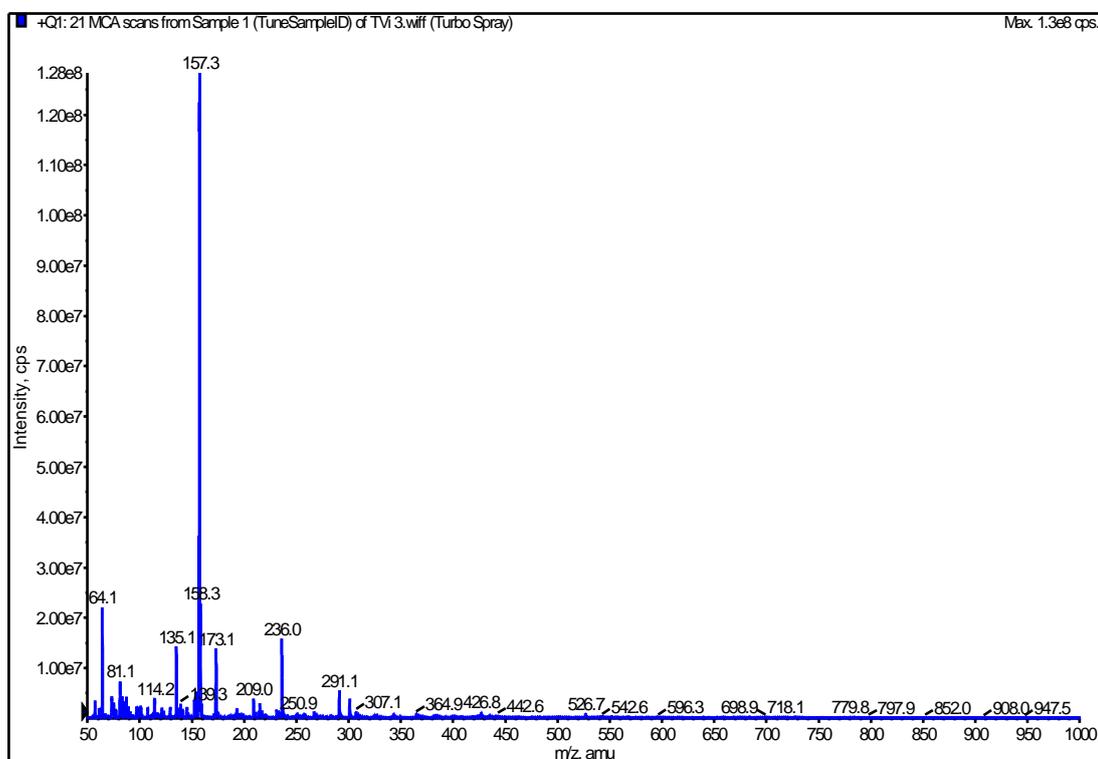
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Trametes villosa*Efluente *in natura*

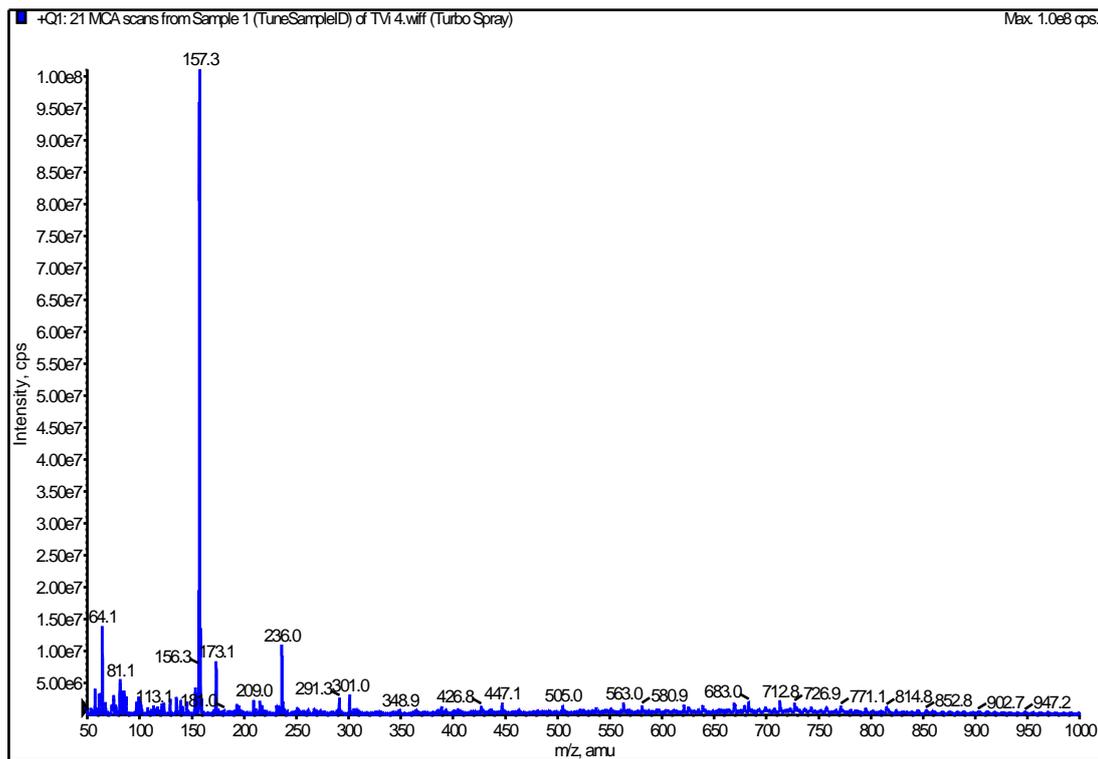
Efluente autoclavado



Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação

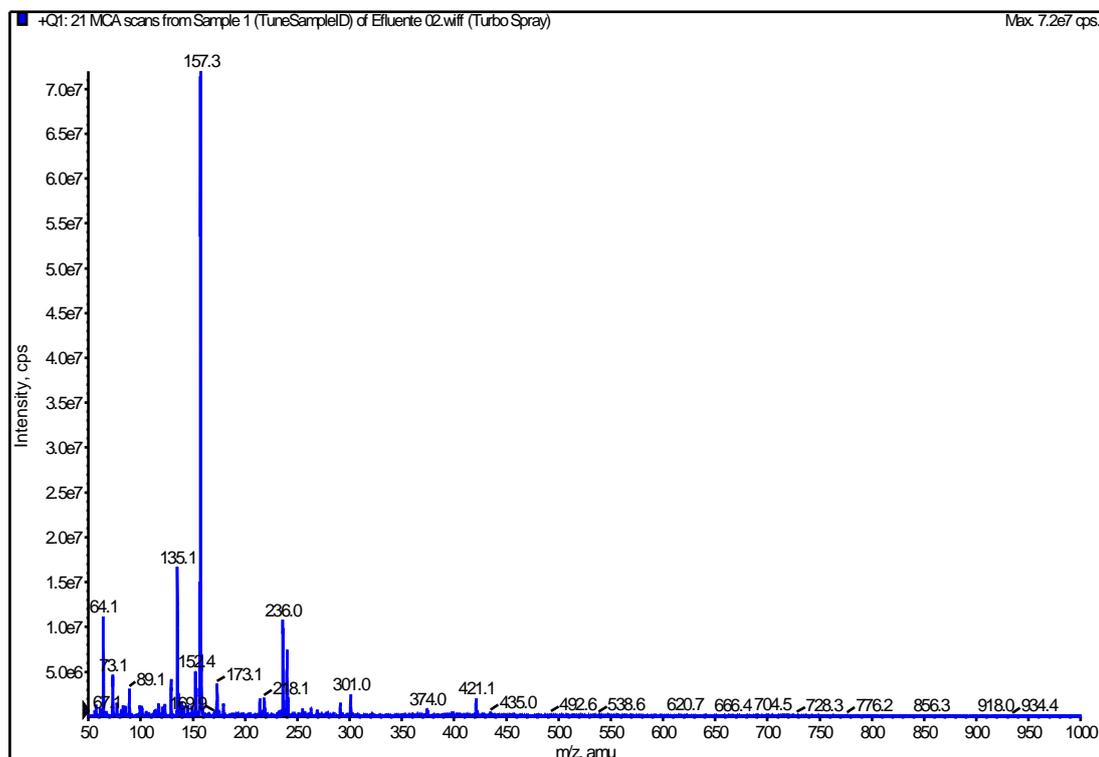


Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

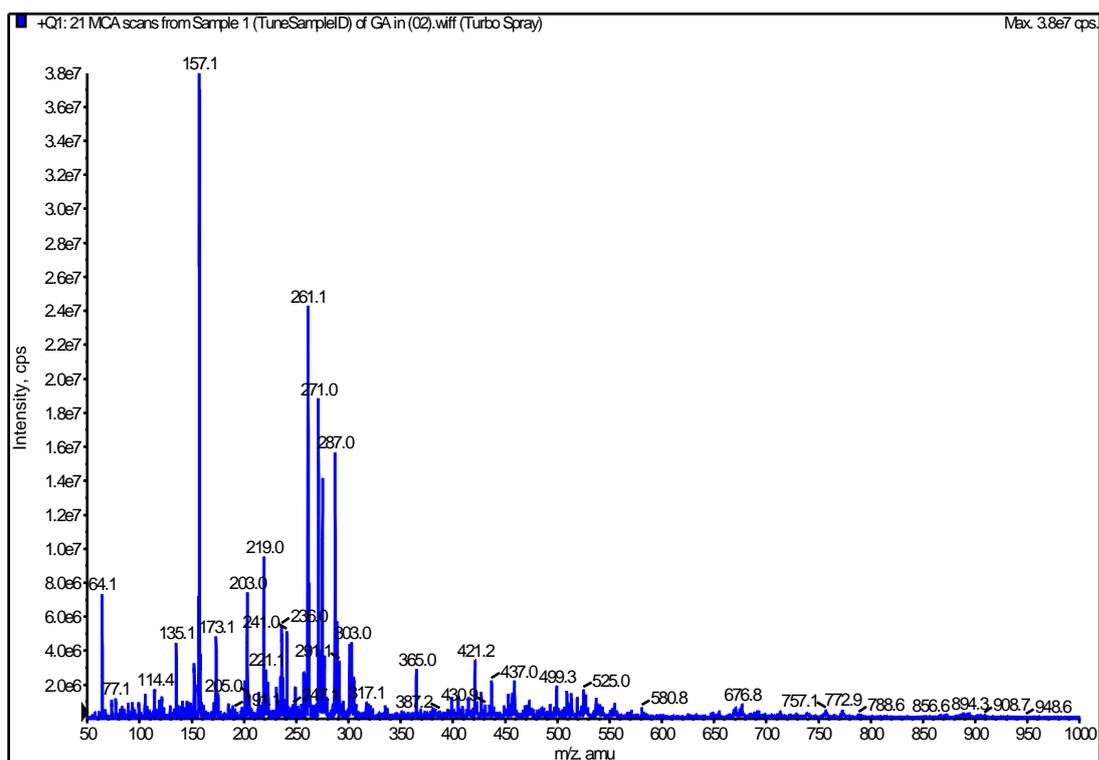


Espectros de massa

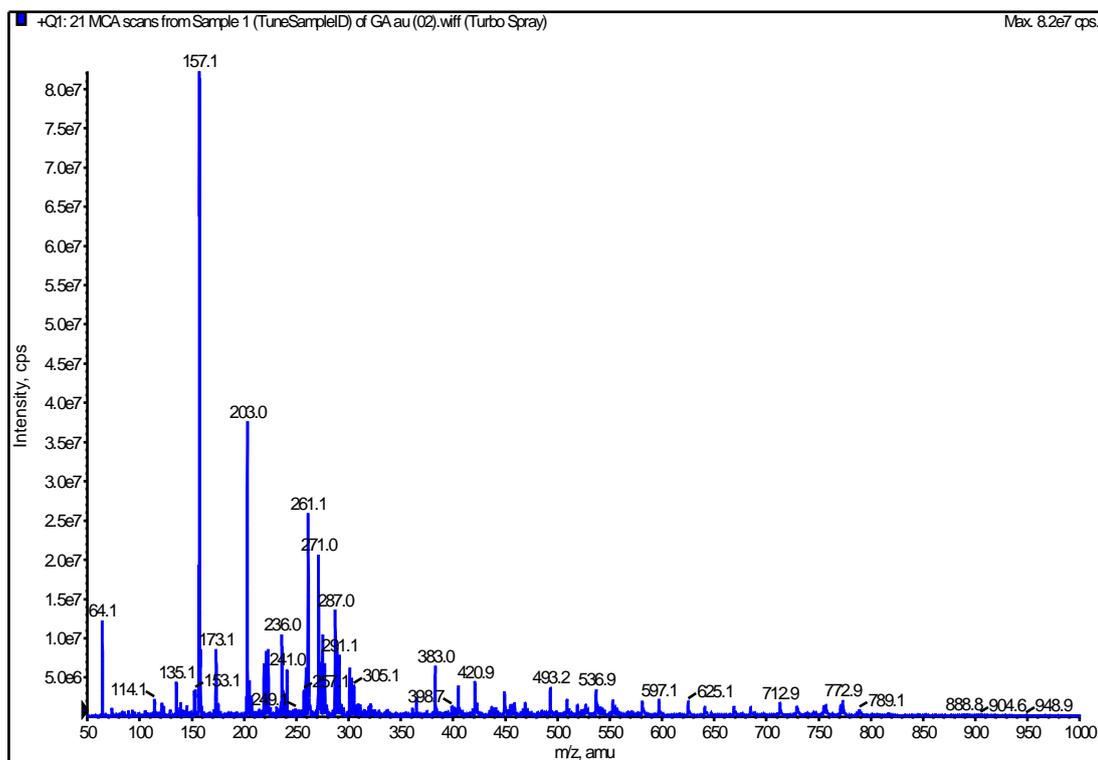
Amostra 5 sem tratamento



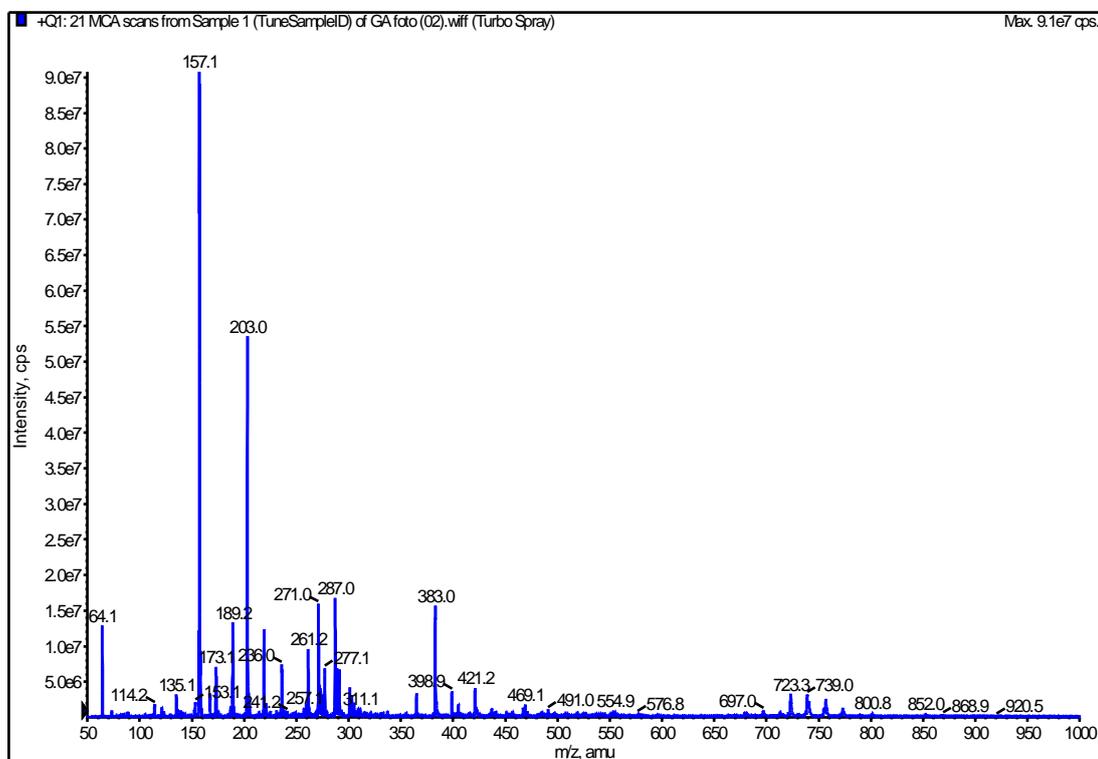
Amostra 5 com tratamento

*Ganoderma applanatum*Efluente *in natura*

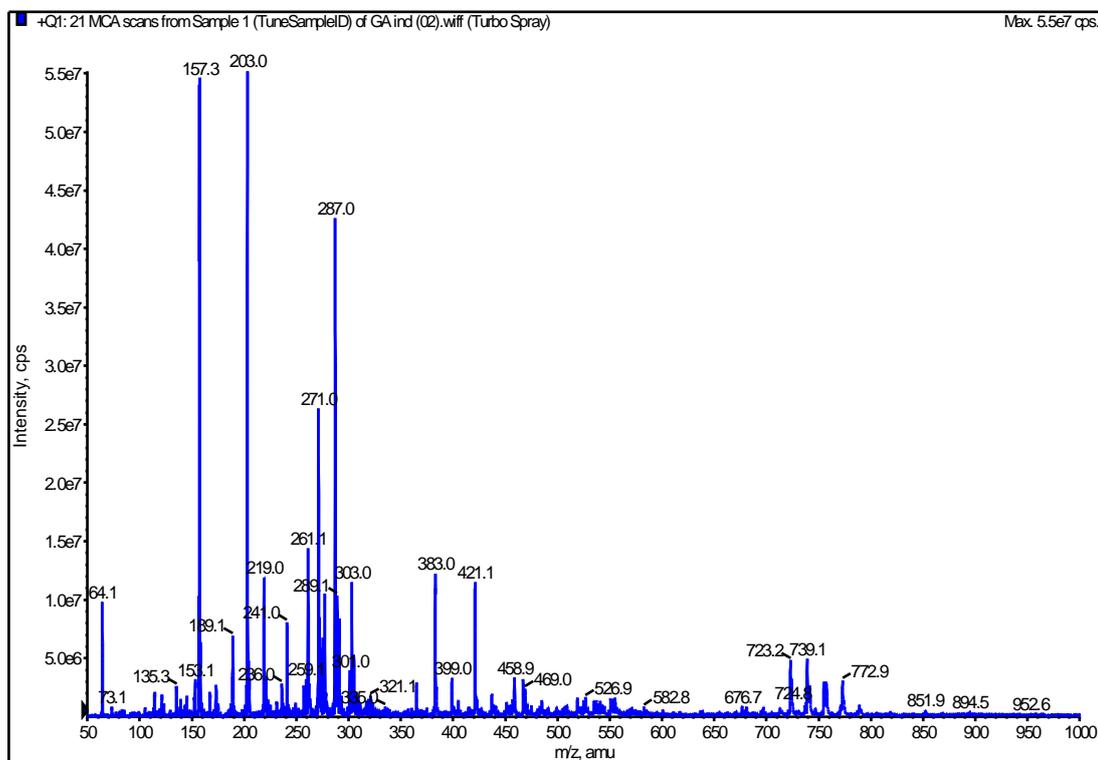
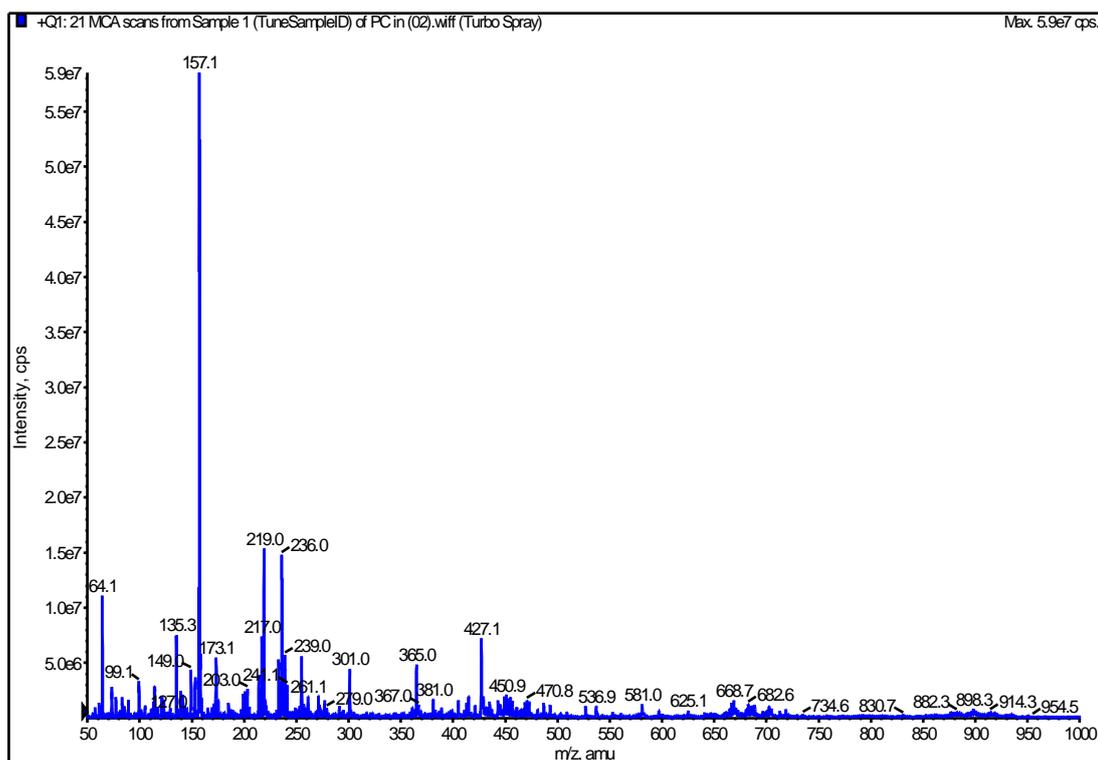
Efluente autoclavado



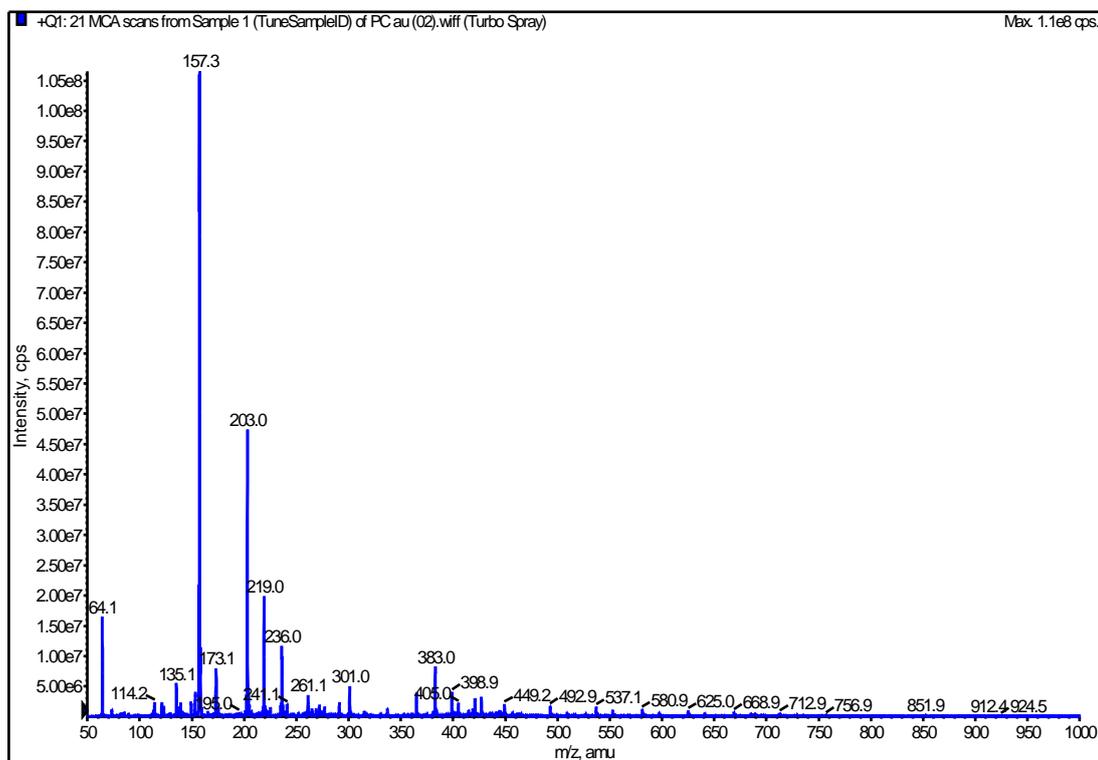
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



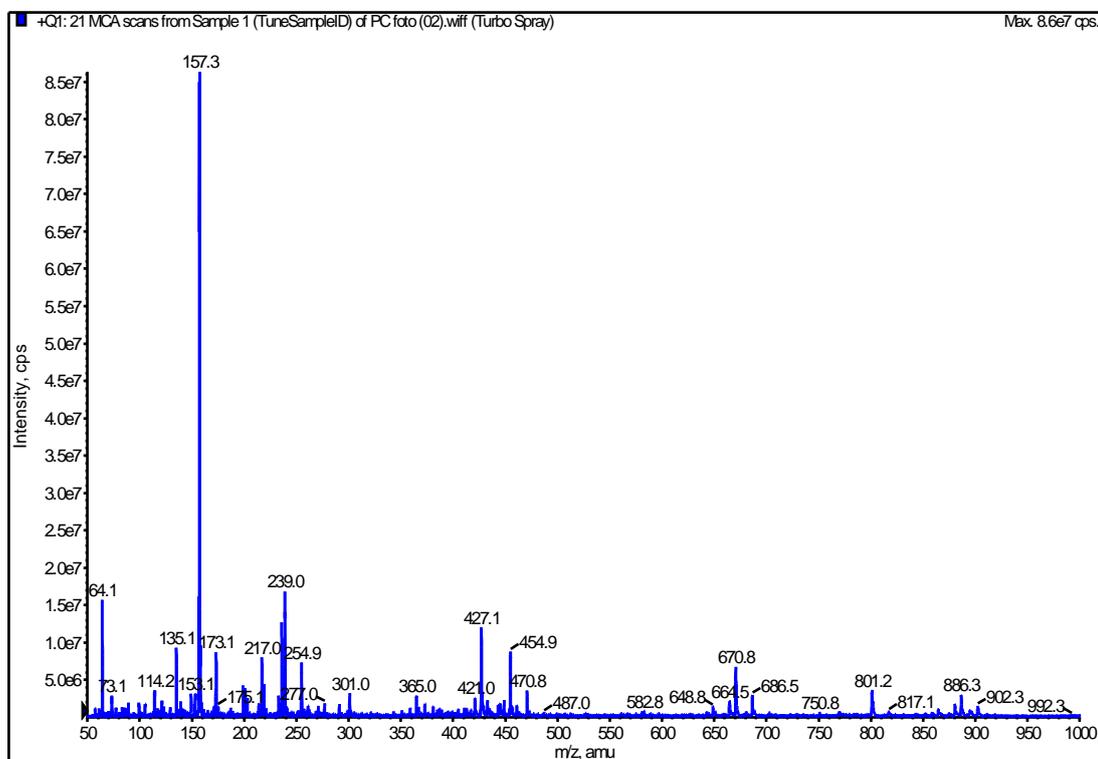
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Phanerochaete chrysosporium*Efluente *in natura*

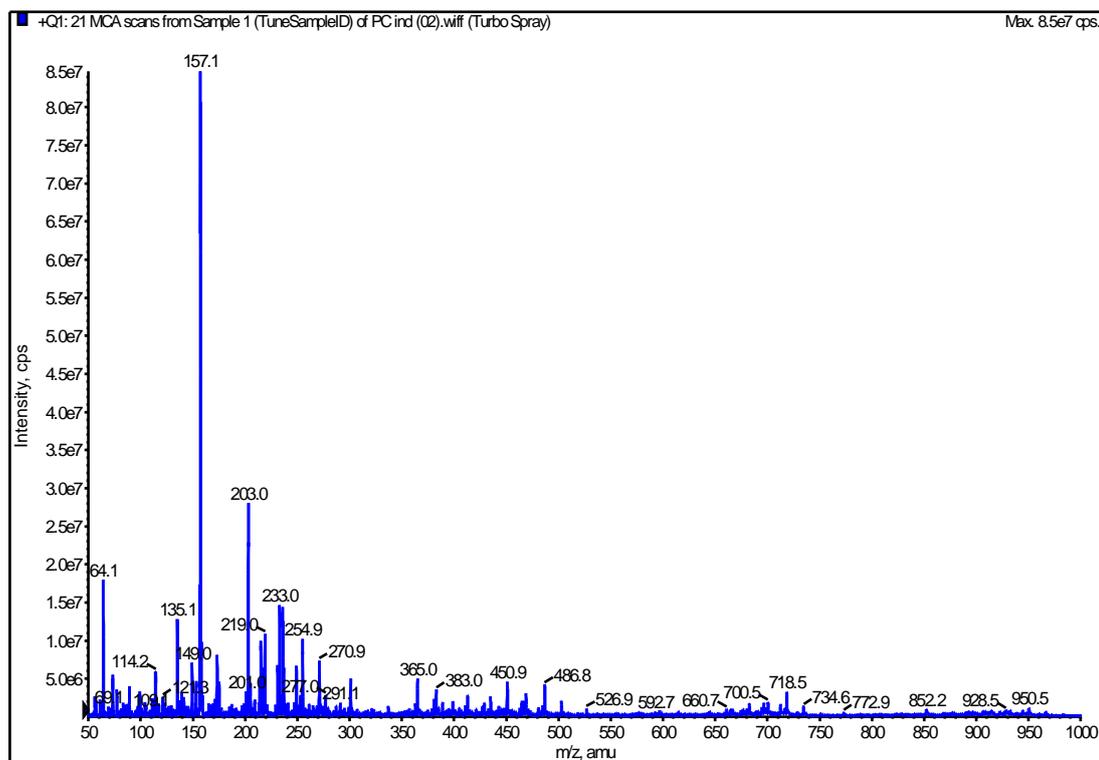
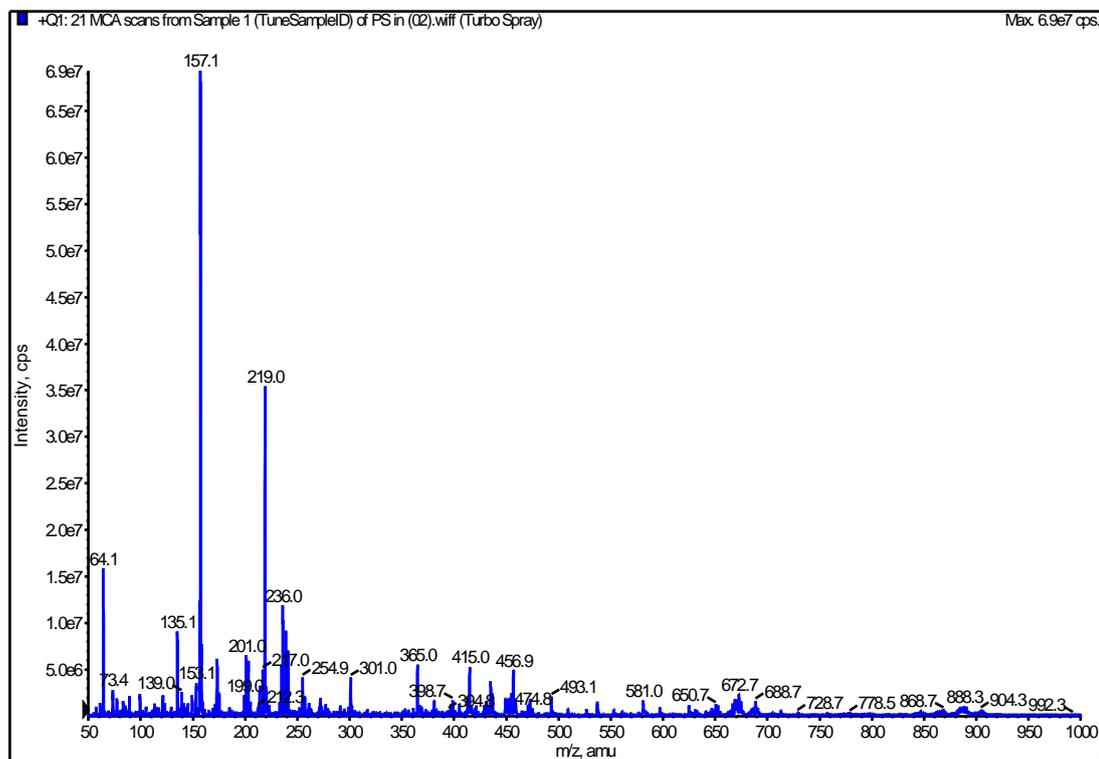
Efluente autoclavado



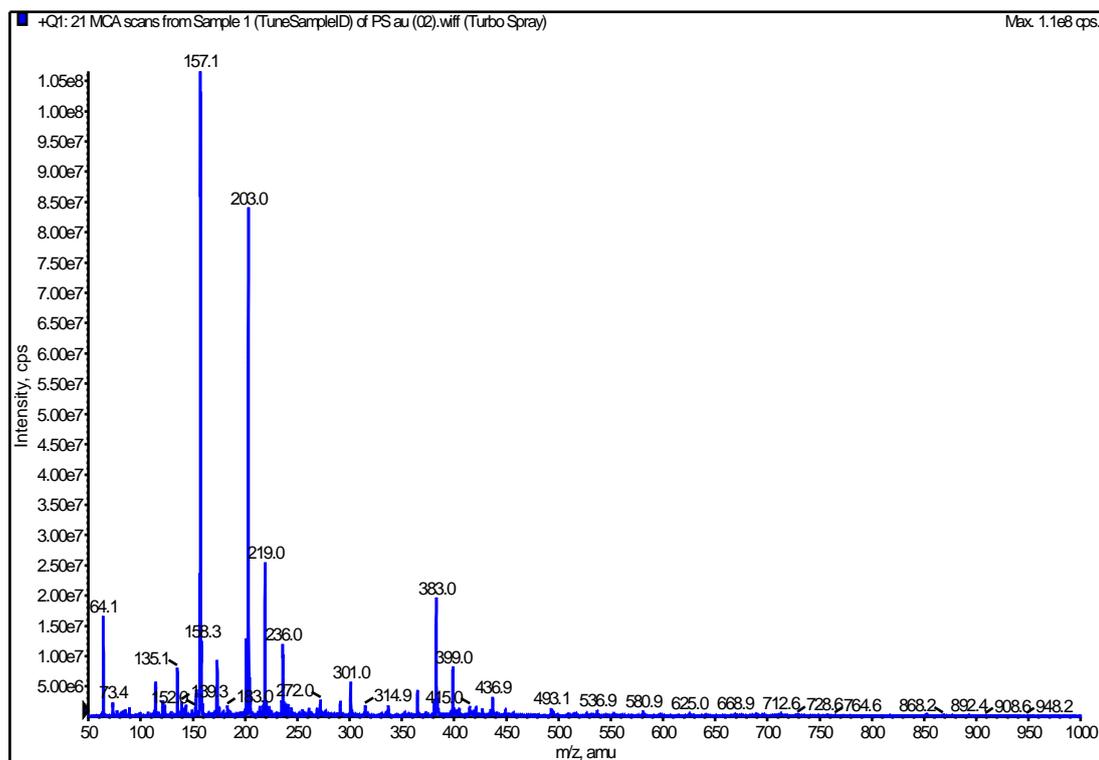
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



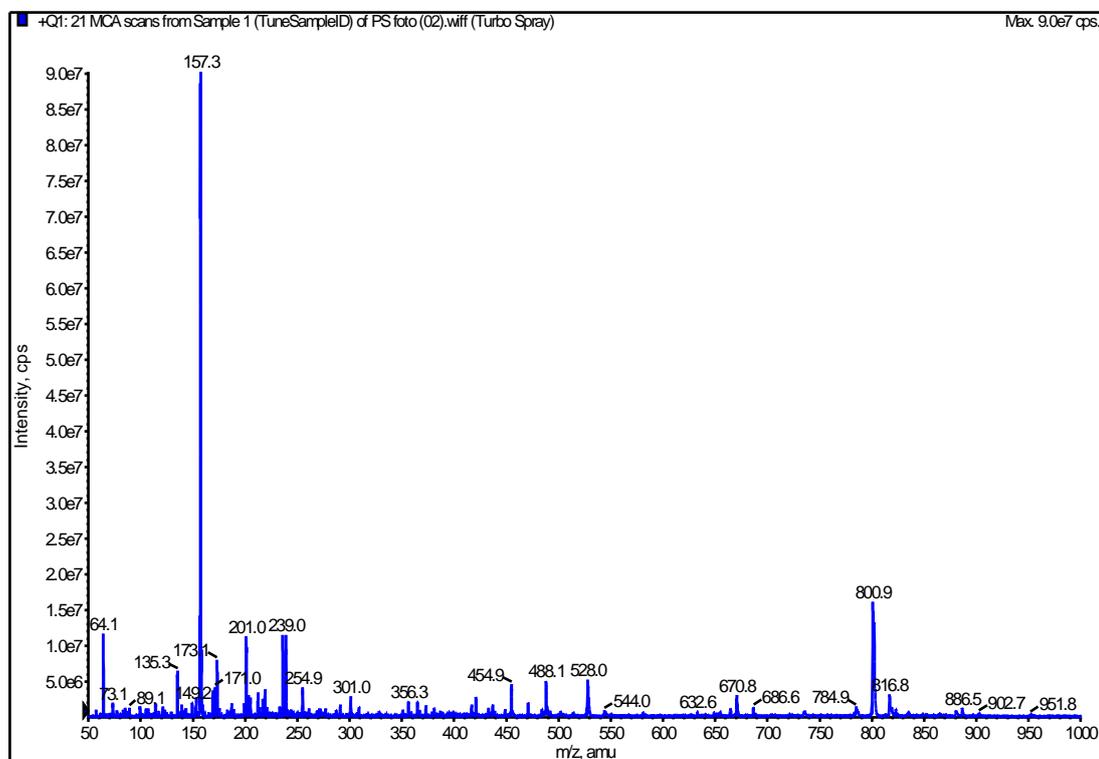
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Pycnoporus sanguineus*Efluente *in natura*

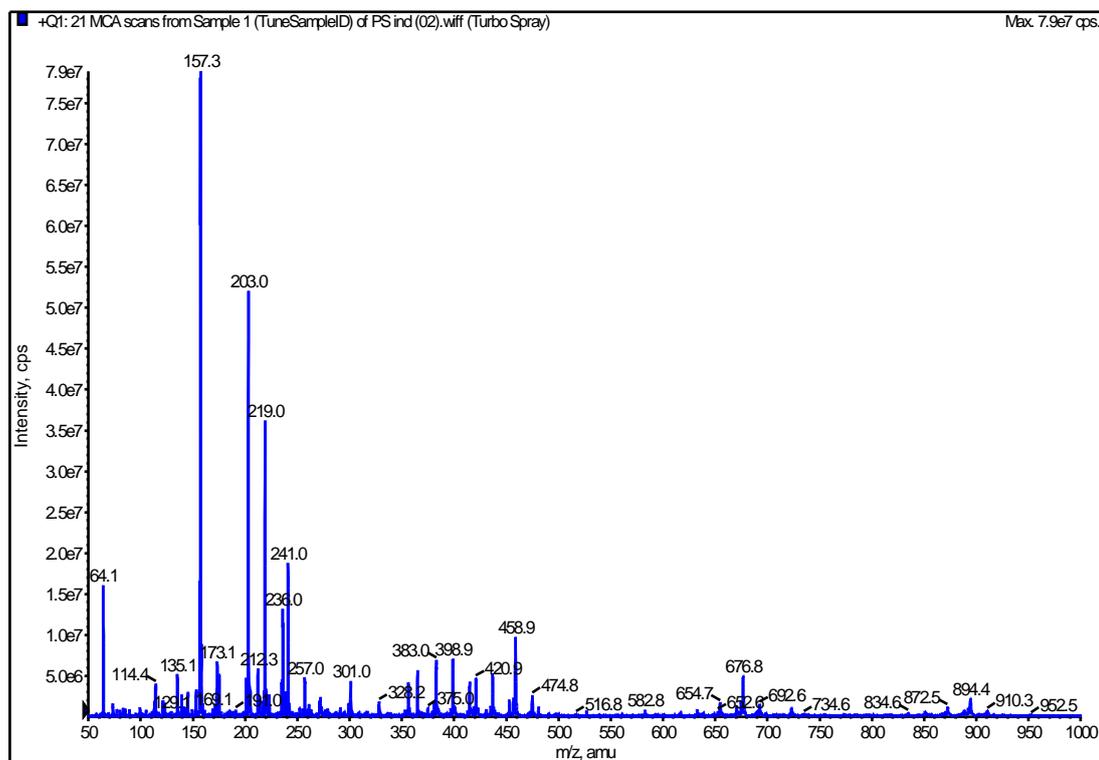
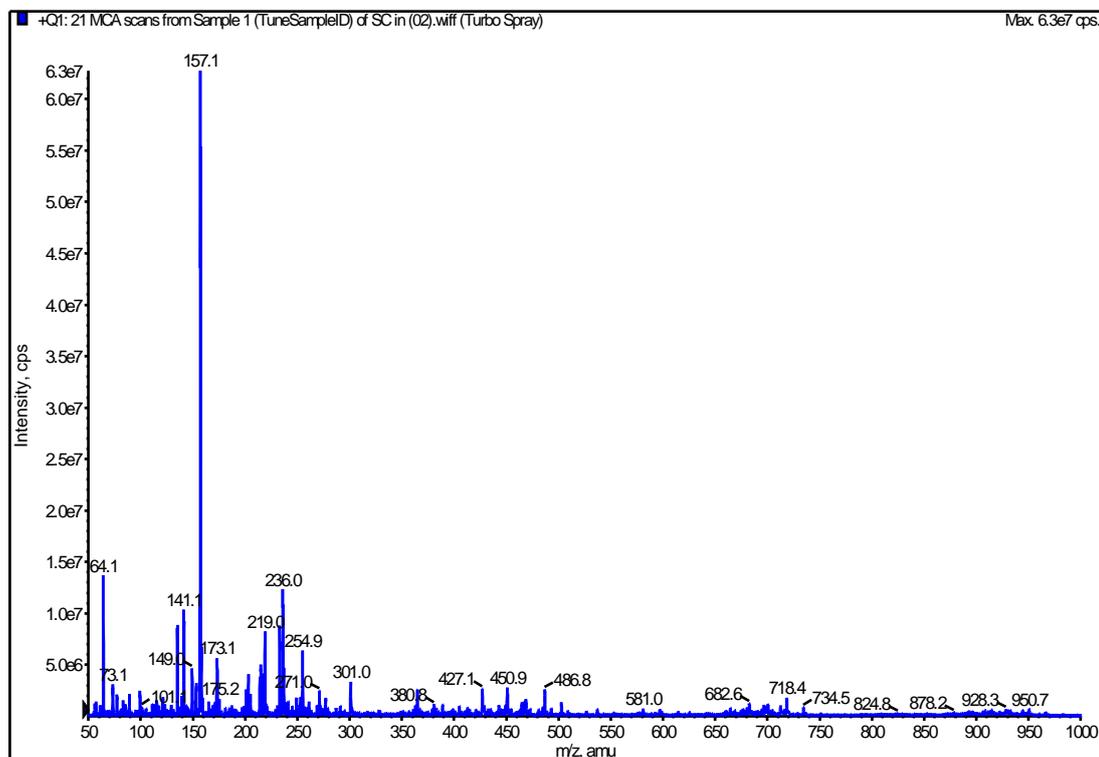
Efluente autoclavado



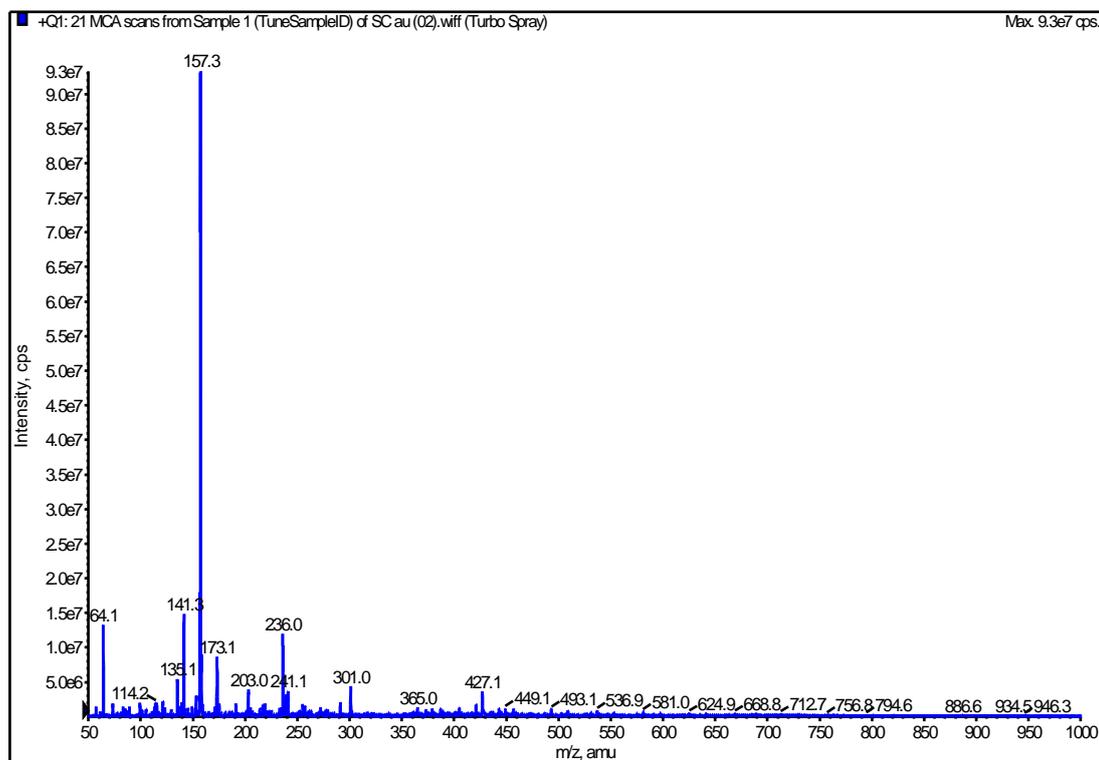
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



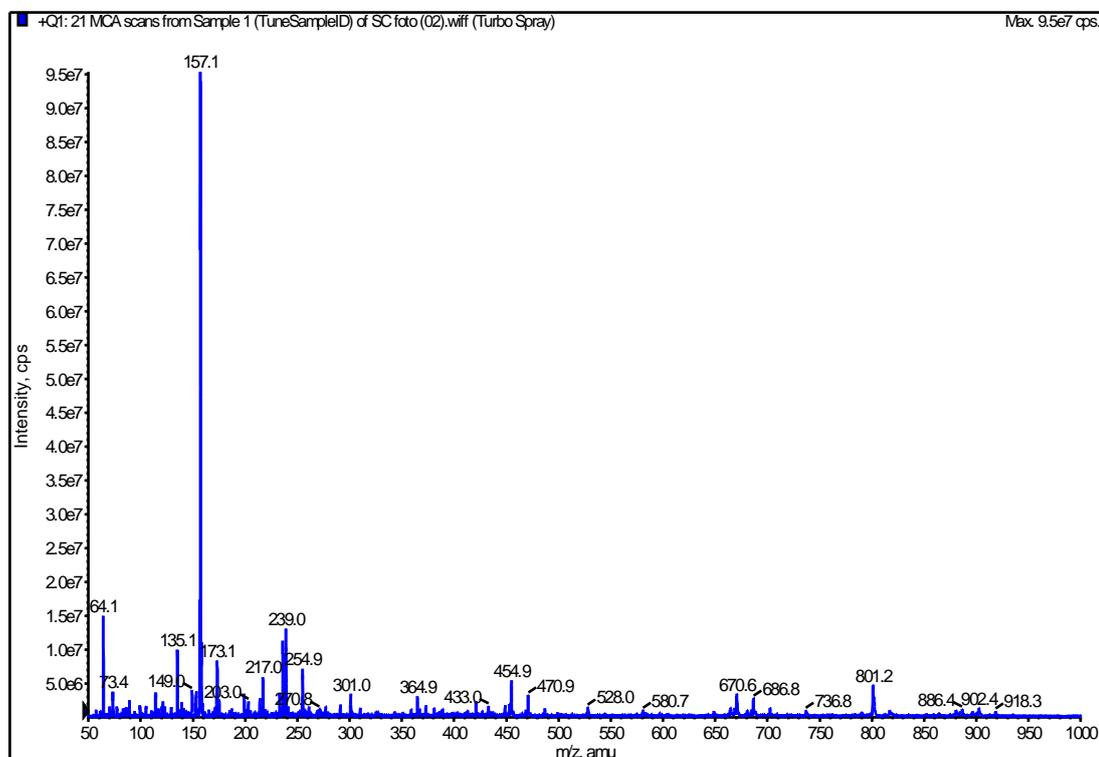
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Schizophyllum commune*Efluente *in natura*

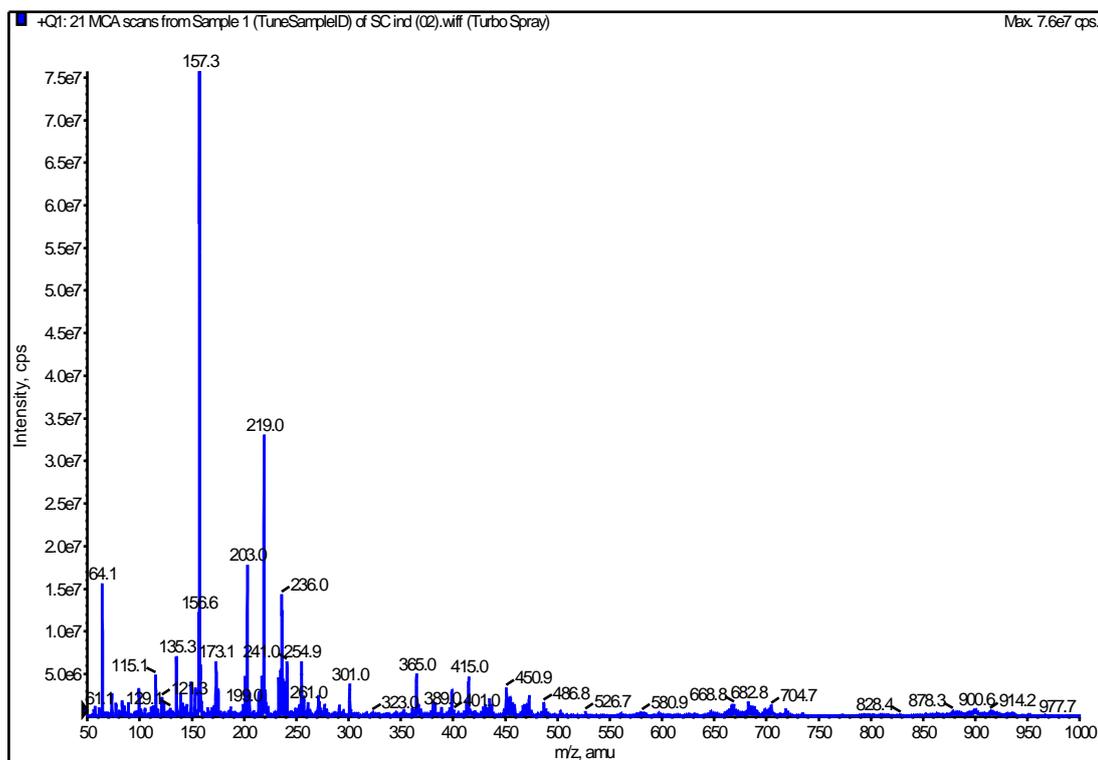
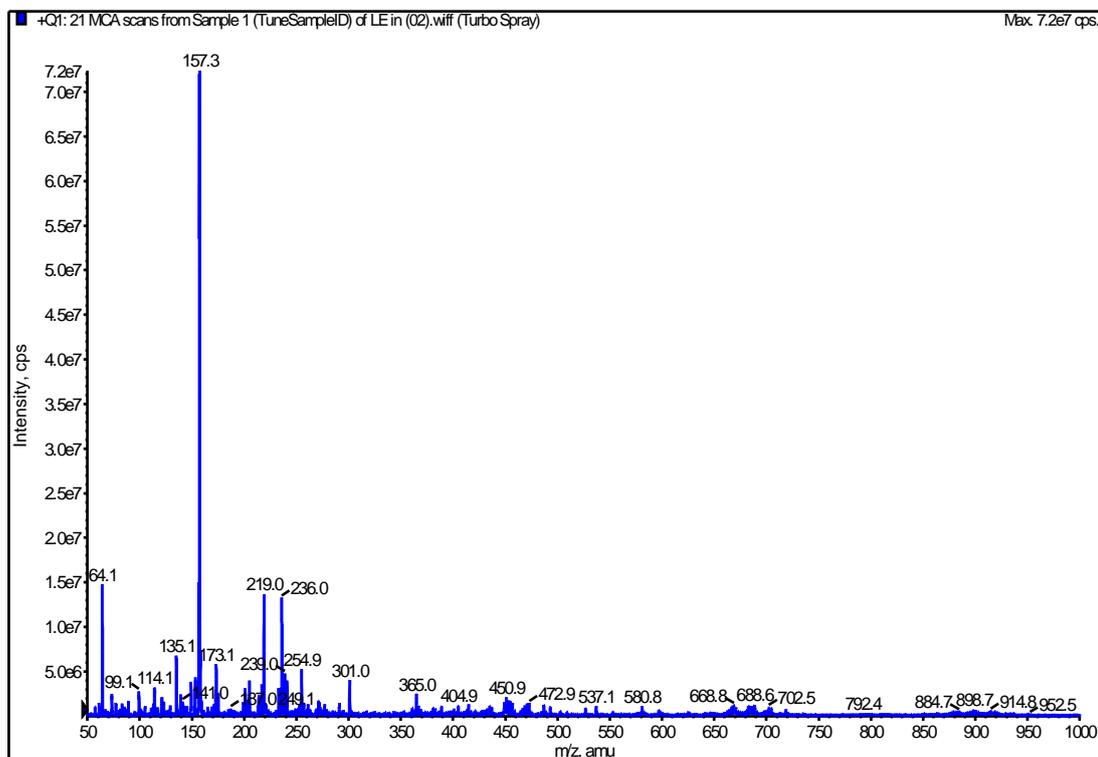
Efluente autoclavado



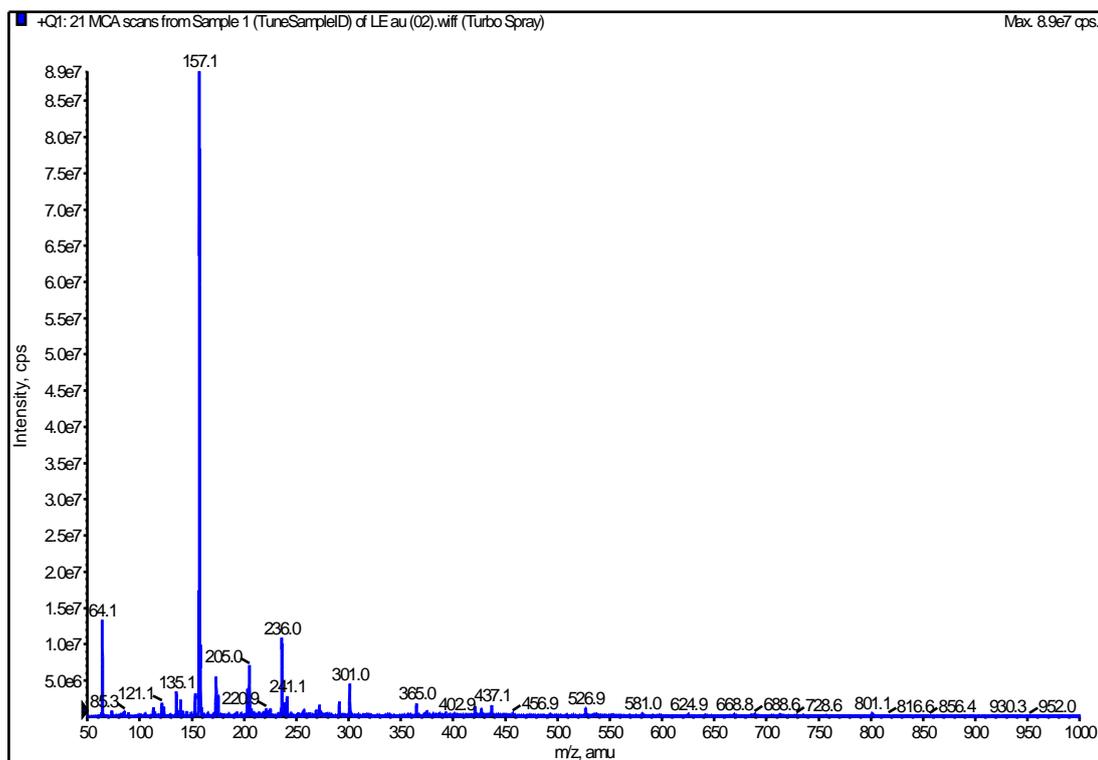
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



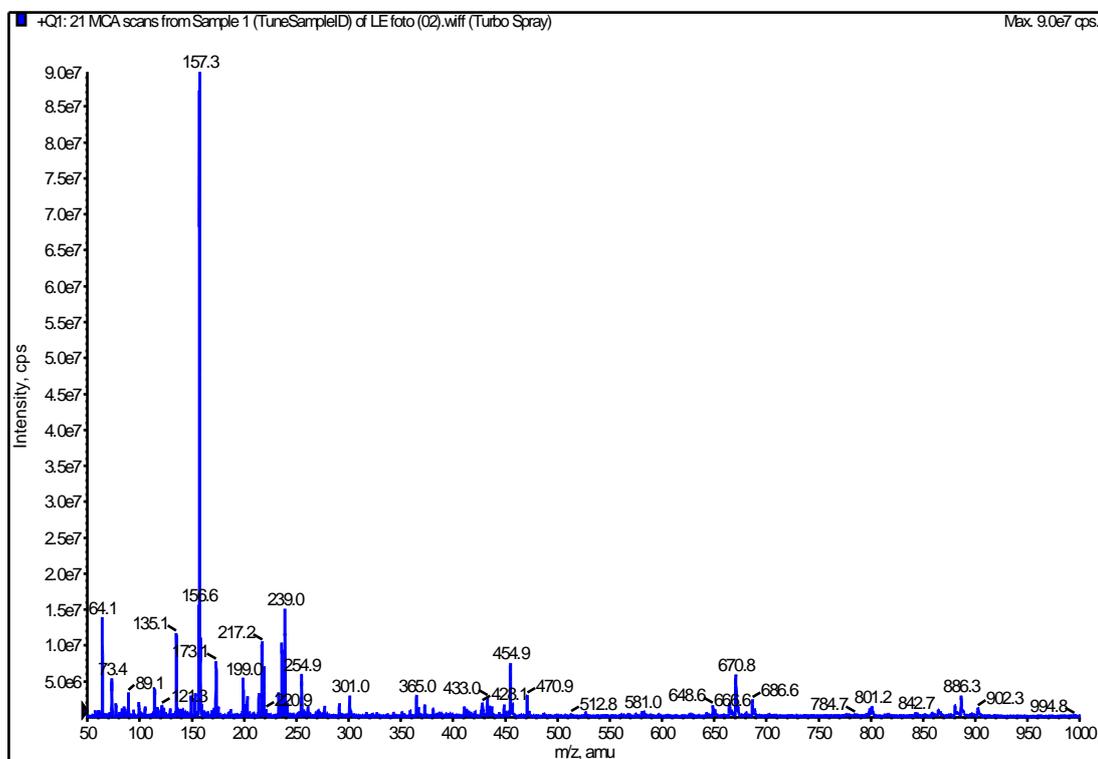
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Lentinus edodes*Efluente *in natura*

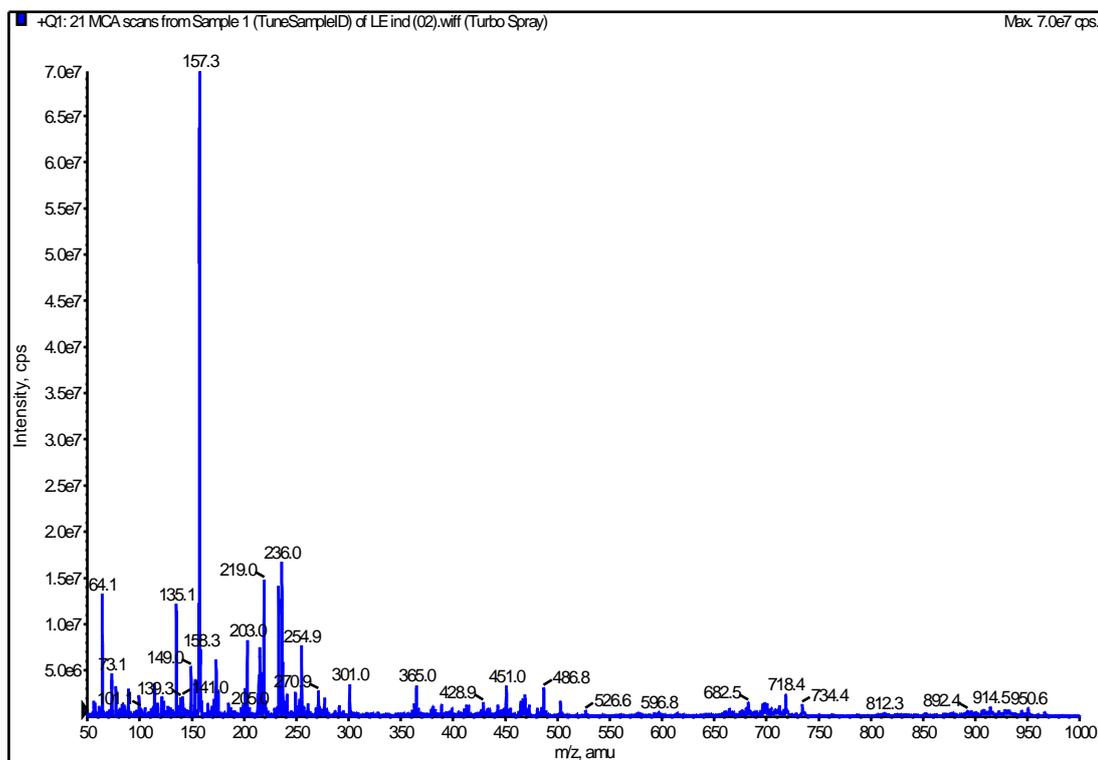
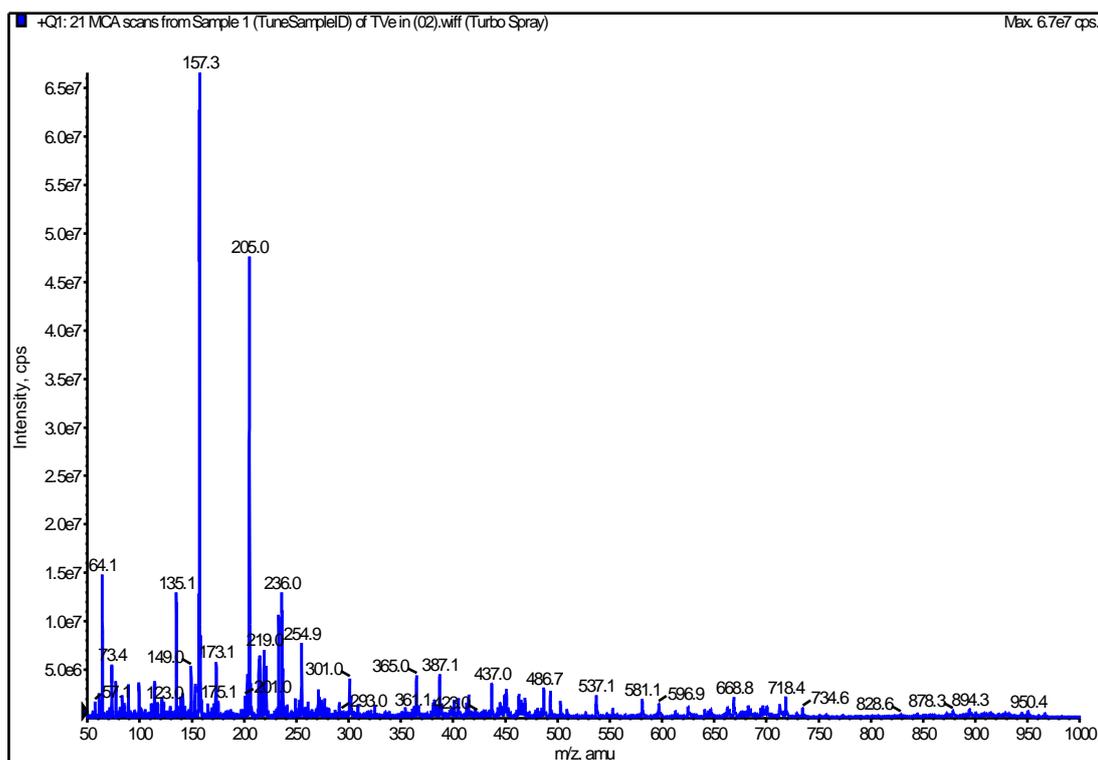
Efluente autoclavado



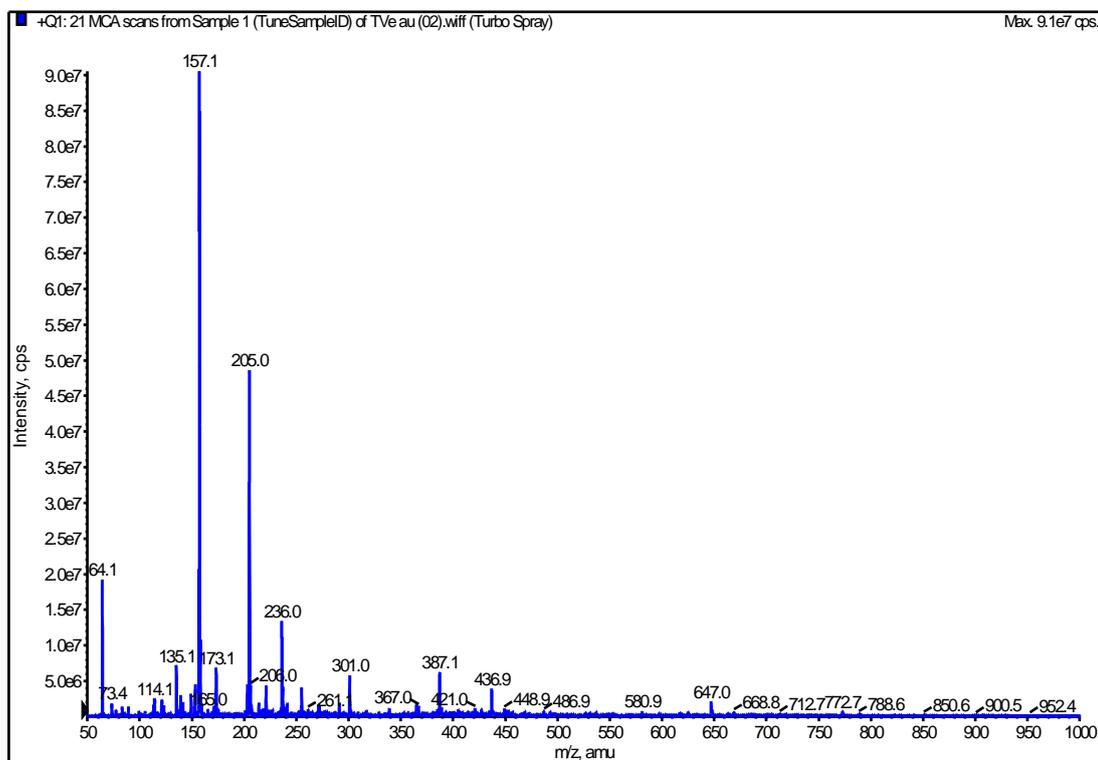
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



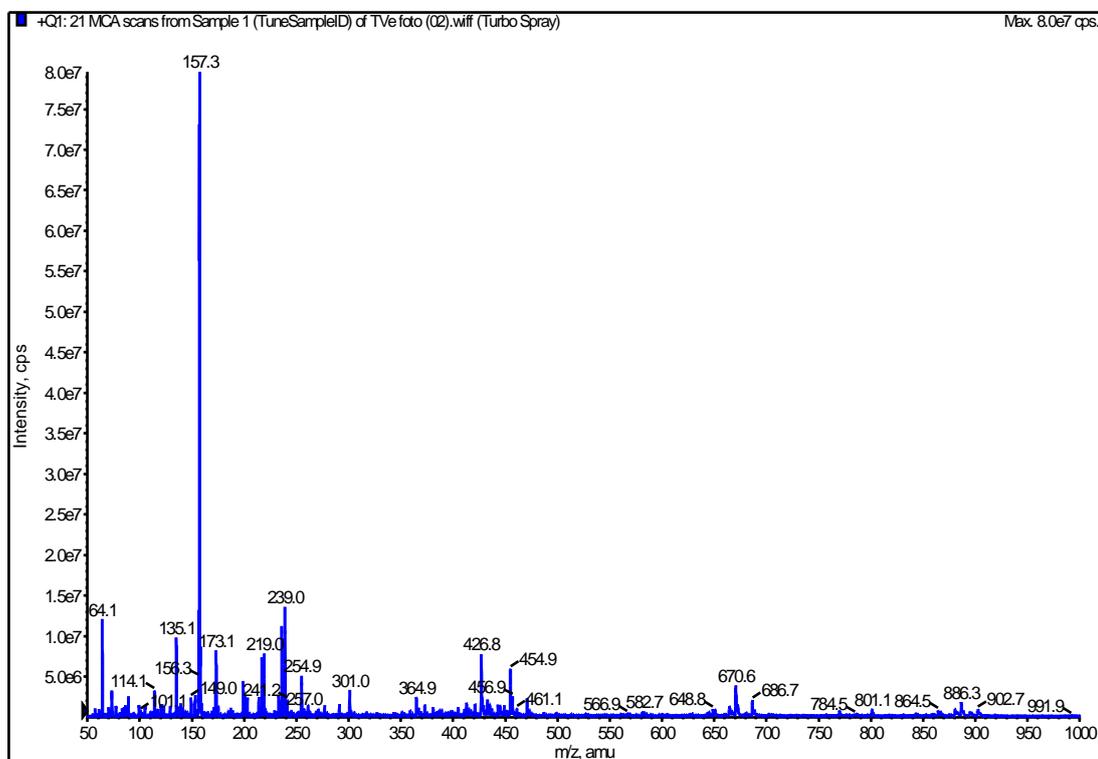
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Trametes versicolor*Efluente *in natura*

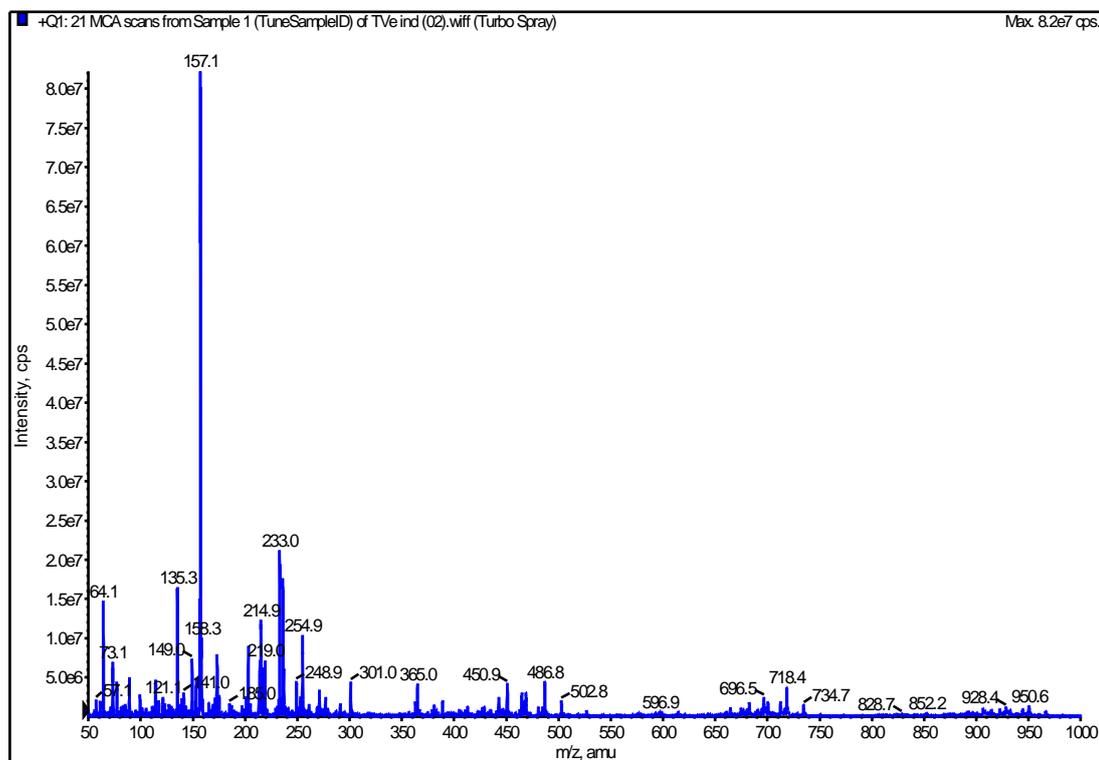
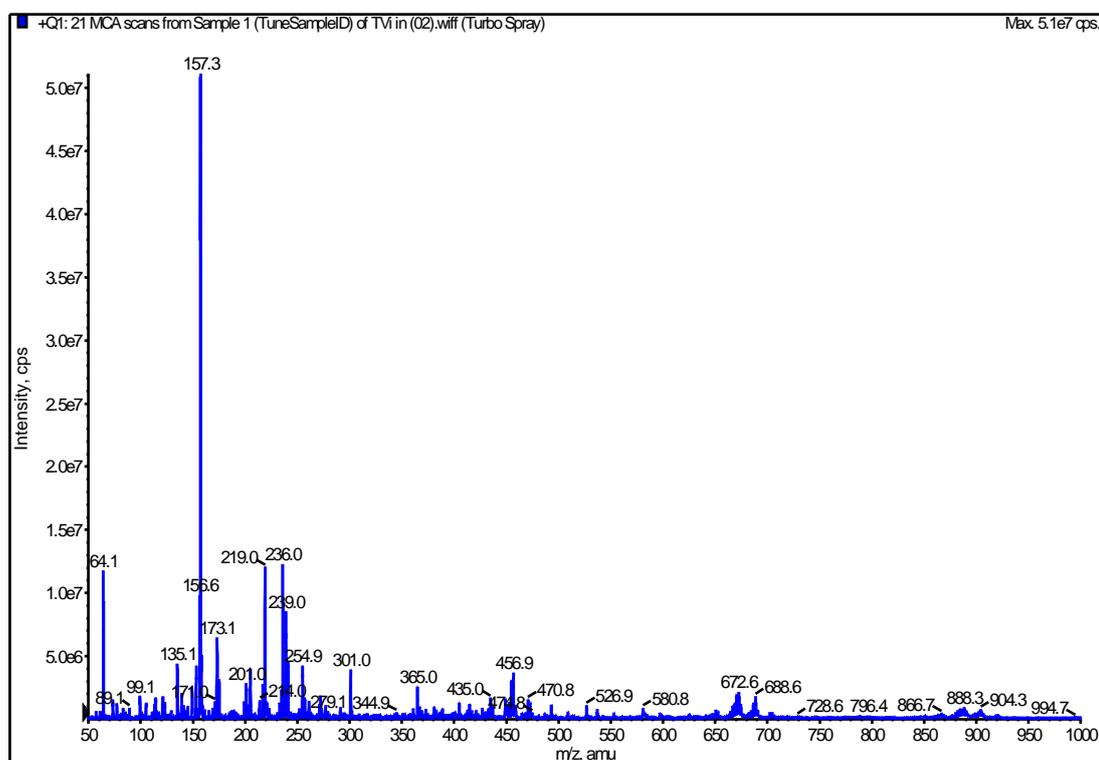
Efluente autoclavado



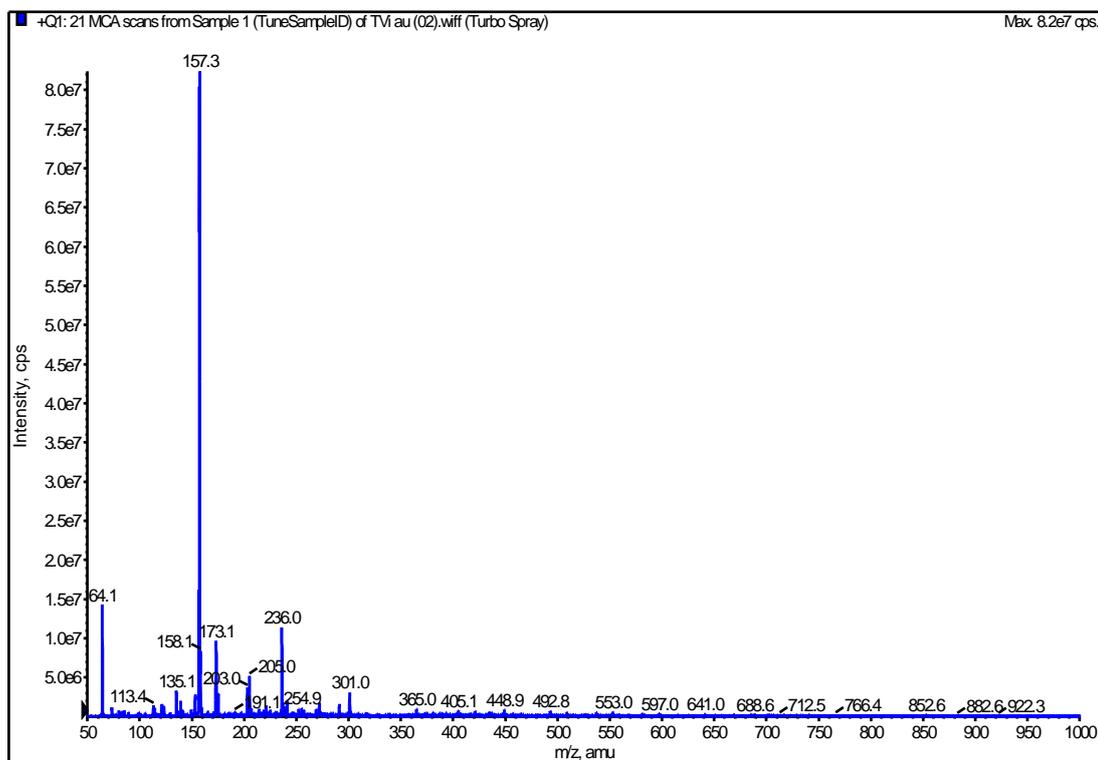
Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação



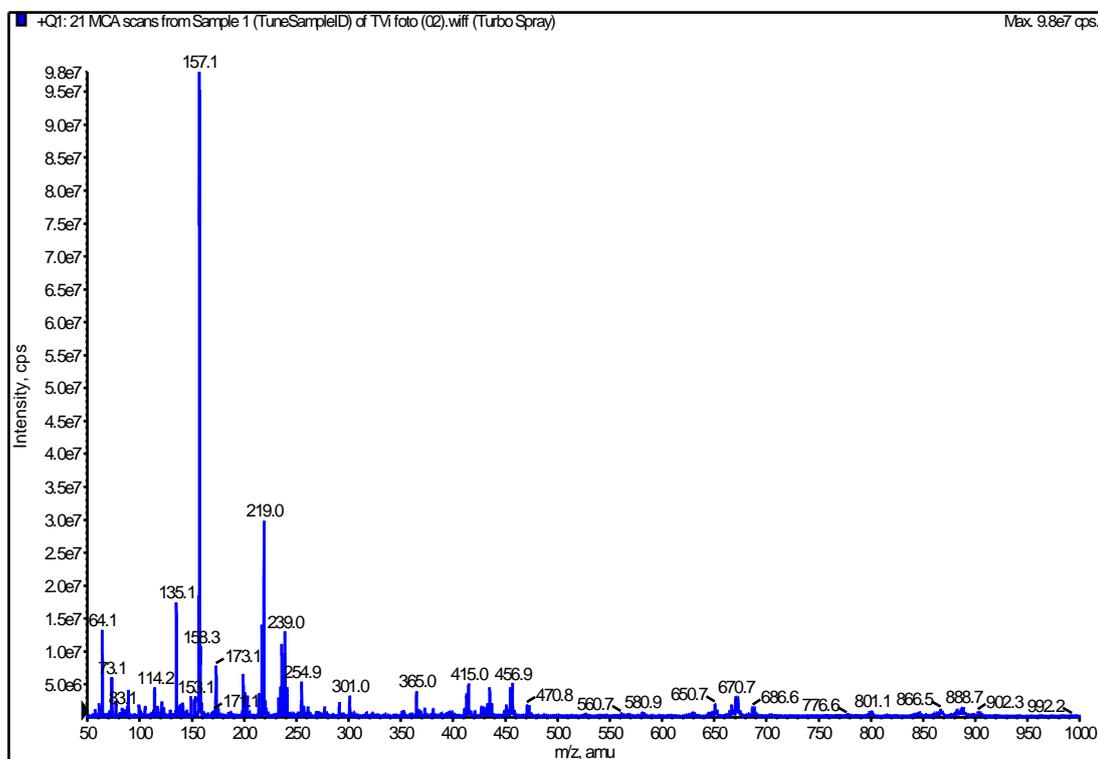
Efluente tratado com fungo com indutor em meio sólido

*Trametes villosa*Efluente *in natura*

Efluente autoclavado

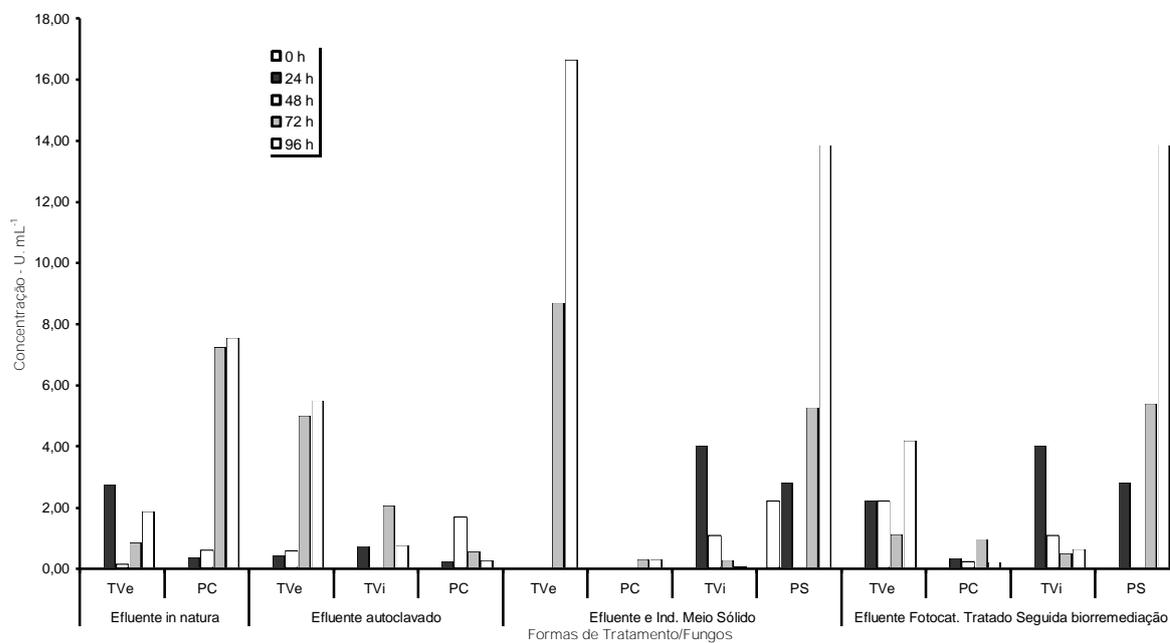


Efluente fotocataliticamente tratado com posterior biorremediação

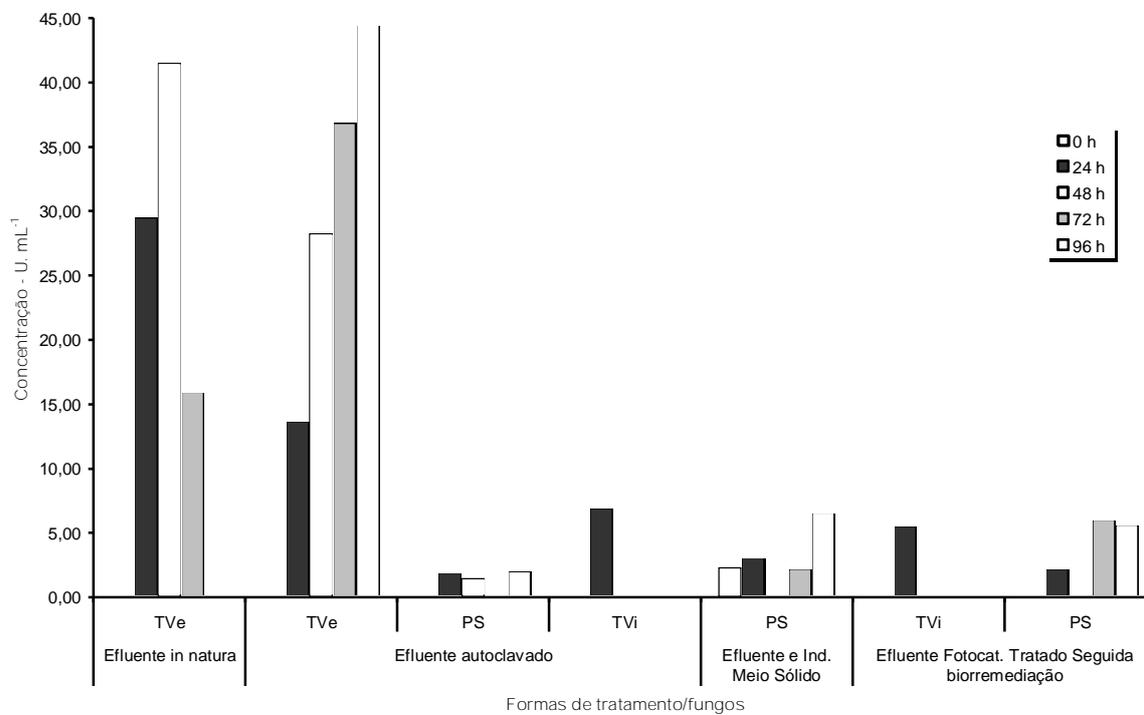


Concentração de Lacase

Amostra 1

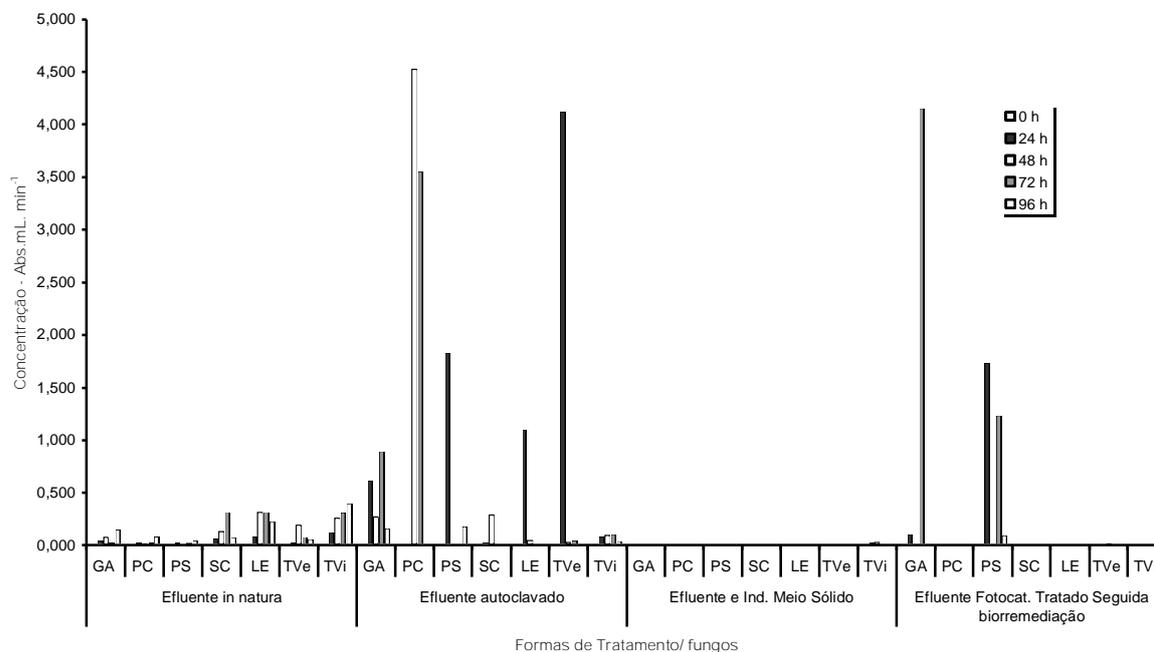


Amostra 5

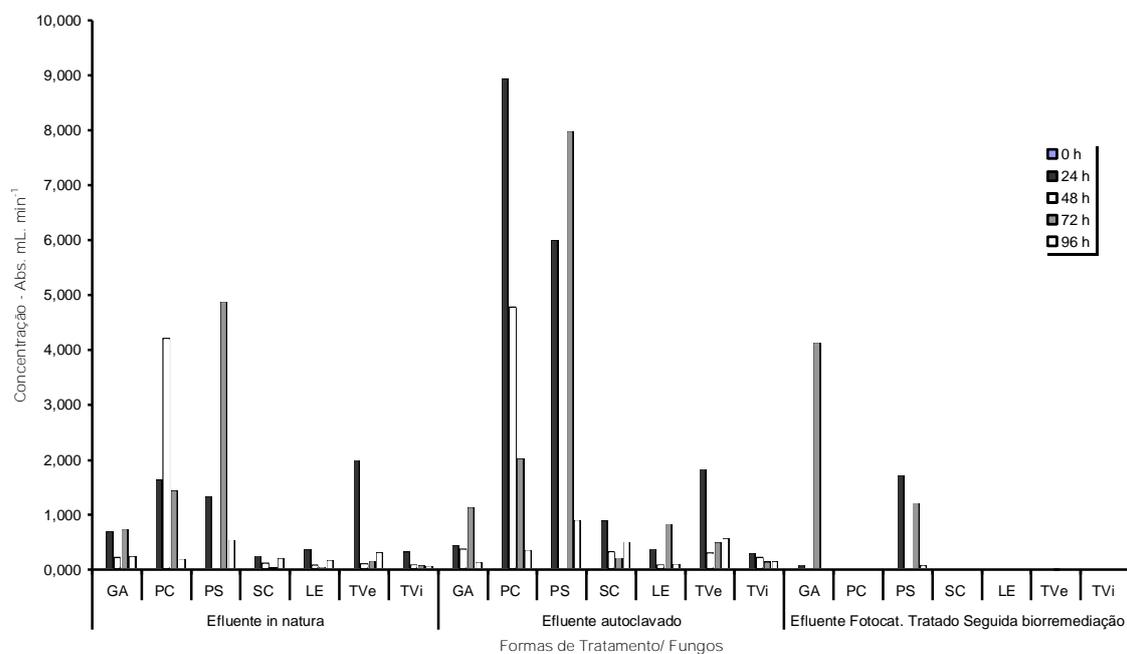


Concentração de MnP

Amostra 1



Amostra 5



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)