



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

BIODEGRADAÇÃO DO D-LIMONENO POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA CÍTRICA

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Fabiana André Falconi**, aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de agosto de 2004.

Campinas, 16 de agosto de 2004.



Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant
Presidente da Banca

Fabiana André Falconi

Farmacêutica-Bioquímica

Prof.^a. Dr.^a. Lúcia Regina Durrant

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas, 2004.

UNIDADE	FEA
Nº CHAMADA	
	UNICAMP
	F183b
V	EX
TOMBO	BCI 60958
PROC.	16-11-04
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	19-11-04
Nº CPD	

Bib id 332941

F183b Falconi, Fabiana André
Biodegradação do *D*-Limoneno por microrganismos isolados de efluente de indústria cítrica / Fabiana André Falconi. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Lúcia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Limoneno. 2.Microrganismos. 3.Laranja.
4.Biodegradação. I.Durrant, Lúcia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.



UNICAMP

DIRETORIA ACADÊMICA
AUTORIZAÇÃO DE CÓPIAS DE TESE A INTERESSADOS
PÓS-GRADUAÇÃO

FOLHAS

22

PROCESSO

017.07410/98

RUBRICA

Val

RA 952044 NOME DO ALUNO(A) FABIANA ANDRÉ FALCONI

CURSO CÓDIGO NÍVEL NOME
06 D CIÊNCIAS DE ALIMENTOSÁREA DE CONCENTRAÇÃO
CÓDIGO NOME

ORIENTADOR(A) LUCIA REGINA DURRANT DATA DA DEFESA 16/08/2004

TÍTULO DA TESE
BIODEGRAÇÃO DO D-LIMONENO POR MICROORGANISMOS ISOLADOS DE
EFFLUENTE DE INDÚSTRIA CÍTRICA

O aluno deverá assinalar um dos 3 itens abaixo

☐ Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a partir desta data, fornecer a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.☐ Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos desta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.☒ Solicito que a Universidade Estadual de Campinas consulte-me, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

ORIENTADOR

DATA

ASSINATURA

Lucia R. Durrant

ALUNO

DATA

ASSINATURA

Falconi

TERMO DE AUTORIZAÇÃO - TESEEu, FABIANA ANDRÉ FALCONI,Nacionalidade: BRASILEIRA, estado civil: SOLTEIRA,Profissão: PROFESSORA, residente e domiciliado na (endereço): RUA CARLOS DE CARVALHO, 3496 - APTO: 33, Cidade: CASCAVEL - PR,Estado: PR, portador do documento de identidade RG,número 21934413-9, na qualidade de titular dos direitos morais e patrimoniais de autor daOBRA (título) BIODEGRADAÇÃO DO D-LIMONENO POR MICROORGANISMOS ISOLADOS DE EFLUENTE DA INDÚSTRIA CÉTRICA;tese de (nível) DOCTORADO, apresentada a Universidade Estadual de Campinasem (data) 16/08/2004, com base no disposto na Lei Federal N. 9.160, de 1

Fevereiro de 1998:

1 - ☐ AUTORIZO a Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, a reproduzir, e/ou disponibilizar na rede mundial de computadores - Internet - e permitir a reprodução por meio eletrônico, da OBRA, a partir desta data e até que manifestação em sentido contrário de minha parte determine a cessação desta autorização.

2 - ☐ AUTORIZO, a partir de dois anos após esta data, a Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, a reproduzir, disponibilizar na rede mundial de computadores - Internet - e permitir a reprodução por meio eletrônico, da OBRA, até que manifestação contrária de minha parte determine a cessação desta autorização.

3 - ☒ CONSULTE-ME, dois anos após esta data, quanto a possibilidade de minha AUTORIZAÇÃO à Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, a reproduzir, disponibilizar na rede mundial de computadores - Internet - e permitir a reprodução por meio eletrônico, da OBRA.

Campinas, 02 de JULHO de 2004.Assinatura do Aluno: FalconiCiente do Orientador: Quica R. Durant

BANCA EXAMINADORA



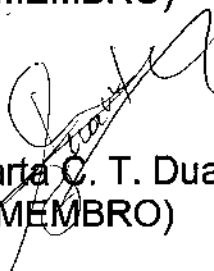
Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Durrant
(ORIENTADORA)



Dr^a Érika Cristina Pavarina
(MEMBRO)



Prof. Dr. Hamilton Roberto Fortes Bavutti
(MEMBRO)



Dr^a Marta C. T. Duarte
(MEMBRO)



Prof^a. Dr^a. Tânia Akiko Anazawa
(MEMBRO)

Dr^a Andréa Roberta Clemente
(SUPLENTE)

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(SUPLENTE)

**O sol nasce, o sol se põe,
mostrando que o tempo é apenas
a mudança de nós mesmos,
da mesma forma que os momentos
felizes e infelizes se sucedem,
mostrando que tudo passa
e tudo recomeça.
O que permanece é a esperança.**

À minha mãe ,

*Pelo incentivo e apoio constantes e pelo exemplo de força e coragem
que tenho recebido em todos momentos de minha vida,*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que me deu a liberdade, a inteligência e a força de lutar pela conquista de minhas realizações.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Durrant, pela orientação, dedicação e incentivo durante esta etapa.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

À Banca Examinadora, Dr^a Andréa Roberta Clemente, Dr^a Érika Cristina Pavarina, Dr. Hamilton Roberto Fortes Bavutti, Dr^a Marta C. T. Duarte, Dr. Ranulfo Monte Alegre e Dr^a. Tânia Akiko Anazawa, pelas valiosas correções.

Ao Cosme, pela competência e paciência.

Ao pessoal da Biblioteca, do Xérox, ao Marquinho e Marcão, pela disposição e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, em especial a Érika, Ani, Luciana, Rose e Hamilton.

Às colegas de Laboratório, Márcia e Andréa, que se tornaram grandes amigas e companheiras nos momentos difíceis.

Aos amigos de balada, em especial a Marcia e Alexandre, pelos momentos de descontração.

À minha família, em especial, minha avó, meu irmão, minha cunhada e minha sobrinha, pelo apoio constante.

A todos, cujos nomes não citei, mas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram nesta jornada.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Indústria de suco de laranja no Brasil.....	7
2.2 Óleos essenciais.....	8
2.3 Terpenos.....	10
2.3.1 Monoterpenos	10
2.3.1.1 <i>D</i> -limoneno.....	12
2.4 Degradação de monoterpenos por microrganismos.....	15
2.4.1 Degradação de monoterpenos por bactérias.....	16
2.4.2 Degradação de monoterpenos por fungos.....	18
2.4.2.1 Fungos Ligninolíticos.....	19
2.5 Enzimas responsáveis pela biodegradação.....	20
2.5.1 Enzimas extracelulares.....	20
2.5.1.1 Lignina Peroxidase.....	20
2.5.1.2 Manganês Peroxidase.....	22
2.5.1.3 Lacase.....	23
2.5.1.4 Peroxidase.....	24
2.5.2 Enzimas intracelulares.....	24
2.5.2.1 Catecol 1,2 dioxigenase.....	25
2.5.2.2 Catecol 2,3 dioxigenase.....	26
2.5.2.3 Protocatecol 3,4 dioxigenase	26
2.5.2.4 Aldeído e álcool dehidrogenase.....	27
2.6 Biossurfactantes.....	27
2.7 Tratamento de efluente na indústria de laranja.....	28
3 OBJETIVOS.....	33

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Coleta do efluente.....	39
4.2 Caracterização do efluente.....	39
4.2.1 Determinação do pH.....	39
4.2.2 Demanda Química de Oxigênio.....	40
4.2.3 Sólidos Totais.....	40
4.2.4 Sólidos Suspensos.....	41
4.2.5 Sólidos Dissolvidos.....	41
4.3 Microrganismos.....	41
4.4 Isolamento dos microrganismos.....	42
4.5 Pré-seleção.....	44
4.5.1 Condição de cultivo.....	44
4.5.2 Avaliação visual do crescimento.....	44
4.5.3 Determinação da porcentagem de degradação por CLAE.....	45
4.6 Seleção.....	45
4.6.1 Avaliação da concentração de <i>d</i> -limoneno.....	45
4.6.2 Avaliação do tempo de crescimento.....	46
4.7 Identificação.....	46
4.8 Crescimento dos microrganismos selecionados no efluente industrial.....	47
4.9 Efeito da toxicidade do <i>d</i>-limoneno aos microrganismos	47
4.9.1 Determinação do crescimento bacteriano.....	47
4.9.2 Determinação do crescimento fúngico.....	48
4.10 Determinações enzimáticas.....	48
4.10.1 Enzimas extracelulares.....	48
4.10.1.1 Lacase	48
4.10.1.2 Peroxidase.....	49
4.10.1.3 Lignina Peroxidase.....	49
4.10.1.4 Manganês Peroxidase.....	49
4.10.2 Enzimas intracelulares.....	49
4.10.2.1 Catecol 1,2 dioxigenase.....	50
4.10.2.2 Catecol 2,3 dioxigenase.....	50
4.10.2.3 Protocatecol 3,4 dioxigenase.....	50

4.10.2.4 Aldeído e álcool dehidrogenase.....	50
4.11 Determinação da produção de biossurfactantes.....	51
4.12 Determinação da degradação e/ou bioconversão do <i>d</i>-limoneno.....	51
4.12.1 Extração do <i>d</i> -limoneno.....	51
4.1.2.2 Análise cromatográfica.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Caracterização do efluente.....	55
5.2 Isolamento dos microrganismos.....	60
5.3 Pré-seleção dos microrganismos isolados.....	61
5.3.1 Avaliação visual do crescimento.....	61
5.3.2 Determinação da porcentagem de degradação por CLAE.....	63
5.4 Seleção dos microrganismos.....	67
5.4.1 Efeito da concentração de <i>d</i> -limoneno no crescimento microbiano.....	67
5.4.1.1 Degradação do <i>d</i> -limoneno.....	71
5.4.1.2 Atividades enzimáticas.....	65
5.4.2 Relação entre tempo e degradação do <i>d</i> -limoneno.....	76
5.4.2.1 Degradação do <i>d</i> -limoneno.....	76
5.4.2.2 Atividades enzimáticas.....	79
5.5 Efeito da toxicidade sobre os microrganismos selecionados.....	87
5.5.1 Determinação do crescimento fúngico.....	87
5.5.2 Determinação do crescimento bacteriano.....	90
5.6 Identificação dos microrganismos.....	96
5.7 Estudo do crescimento microbiano no efluente industrial.....	99
5.7.1 Degradação do <i>d</i> -limoneno.....	99
5.7.2 Atividades enzimáticas.....	102
5.7.3 Efeito da toxicidade do <i>d</i> -limoneno aos microrganismos.....	109
5.7.3.1 Determinação do crescimento fúngico.....	109
5.7.3.2 Determinação do crescimento bacteriano.....	109
6 CONCLUSÃO.....	115
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Subprodutos da laranja e rendimentos.....	8
Figura 2: Unidade de isopreno.....	10
Figura 3: Monoterpenos importantes.....	11
Figura 4: Obtenção de <i>d</i> -limoneno.....	13
Figura 5: Ciclo catalítico da lignina peroxidase.....	21
Figura 6: Ciclo catalítico da manganês peroxidase.....	23
Figura 7: Reação catalítica da lacase.....	24
Figura 8: Clivagem extradiol – via meta.....	26
Figura 9: Clivagem intradiol – via orto.....	27
Figura 10: Sistema de lodo ativado.....	30
Figura 11: Linha de tratamento de efluente da indústria cítrica	31
Figura 12: Isolamento dos microrganismos.....	43
Figura 13: Pré-seleção de bactérias, por crescimento visual.....	62
Figura 14: Microrganismos em placas de Petri contendo <i>d</i> -limoneno.....	63
Figura 15: Degradação do <i>d</i> -limoneno (%) pelas linhagens cultivadas em meio contendo diferentes concentrações de <i>d</i> -limoneno, estacionária.....	68
Figura 16: Degradação do <i>d</i> -limoneno (%) pelas linhagens cultivadas em meio contendo diferentes concentrações de <i>d</i> -limoneno, agitação.....	69
Figura 17: Atividade da enzima lacase pelas linhagens cultivadas em meio contendo diferentes concentrações de <i>d</i> -limoneno, estacionária e agitação....	72
Figura 18: Atividade da enzima peroxidase pelas linhagens cultivadas em meio contendo diferentes concentrações de <i>d</i> -limoneno, estacionário e agitação.....	73
Figura 19: Atividade das enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase pelas linhagens crescidas diferentes concentrações de <i>d</i> -limoneno, estacionário e agitação.....	74
Figura 20: Atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase pelas linhagens cultivadas em meio contendo diferentes concentrações de <i>d</i> -limoneno, estacionário e agitação.....	75

Figura 21: Degradação do <i>d</i> -limoneno (%) pelas linhagens crescidas em meio contendo <i>d</i> -limoneno, na concentração 3%, estacionário e com agitação.....	77
Figura 22: Degradação do <i>d</i> -limoneno (%) pelas linhagens crescidas em meio contendo <i>d</i> -limoneno, na concentração 5%, estacionário e com agitação.....	78
Figura 23: Atividade da enzima lacase pelas linhagens cultivadas em meio contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, estacionário e com agitação.....	80
Figura 24: Atividade da enzima lacase pelas linhagens cultivadas em meio contendo 5% de <i>d</i> -limoneno, estacionário e com agitação.....	81
Figura 25: Atividade da enzima peroxidase pelas linhagens cultivadas em meio contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, estacionário e com agitação.....	82
Figura 26: Atividade da enzima peroxidase pelas linhagens cultivadas em meio contendo 5% de <i>d</i> -limoneno, estacionário e com agitação.....	83
Figura 27: Atividade das enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase pelas linhagens cultivadas em meio contendo 3 e 5% de <i>d</i> -limoneno, estacionário e com agitação.....	84
Figura 28: Atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase pelas linhagens cultivadas em meio contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, estacionário e com agitação.....	85
Figura 29: Atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase pelas linhagens crescidas em meio contendo 5% de <i>d</i> -limoneno, estacionário e com agitação.....	86
Figura 30: Massa seca do fungo 898, crescido em meio contendo <i>d</i> -limoneno, estacionária e com agitação.....	88
Figura 31: Massa seca do fungo 898, crescido em meio contendo 3 e 5% <i>d</i> -limoneno, estacionária e com agitação.....	89
Figura 32: Crescimento da linhagem 0,1D, cultivada durante 10 dias em meio contendo <i>d</i> -limoneno, na concentração de 0 a 10%.....	91
Figura 33: Crescimento da linhagem LP-1 1, cultivada durante 10 dias em meio contendo <i>d</i> -limoneno, na concentração de 0 a 10%.....	92
Figura 34: Crescimento da linhagem LP-1 3, cultivada durante 10 dias em	

meio contendo <i>d</i> -limoneno, na concentração de 0 a 10%.....	93
Figura 35: Crescimento da linhagem SD-1 3, cultivada durante 10 dias em meio contendo <i>d</i> -limoneno, na concentração de 0 a 10%.....	94
Figura 36: Fungo 898 – observação macroscópica da colônia.....	98
Figura 37: Fungo 898 – observação dos aspectos microscópicos da colônia	98
Figura 38: Degradação do <i>d</i> -limoneno (%) pelas linhagens cultivadas em meio contendo o efluente industrial estéril e não estéril, contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, por 3 dias.....	100
Figura 39: Degradação do <i>d</i> -limoneno (%) pelas linhagens cultivadas em meio contendo o efluente industrial estéril e não estéril, contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, por 5 dias.....	101
Figura 40: Atividade da enzima lacase pelas linhagens cultivadas em meio efluente industrial, contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, por 3 dias.....	103
Figura 41: Atividade da enzima lacase pelas linhagens cultivadas em meio efluente industrial, contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, por 5 dias.....	103
Figura 42: Atividade da enzima peroxidase pelas linhagens cultivadas em meio efluente industrial, contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, por 3 dias.....	104
Figura 43: Atividade da enzima peroxidase pelas linhagens cultivadas em meio efluente industrial, contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, por 5 dias.....	105
Figura 44: Atividade de lignina peroxidase e manganês peroxidase pelas linhagens cultivadas em meio efluente industrial, contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, por 3 e 5 dias.....	106
Figura 45: Atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase pelas linhagens cultivadas em meio efluente industrial, contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, por 3 e 5 dias.....	107
Figura 46: Atividade da enzima catecol 2,3 dioxigenase pelas linhagens cultivadas em meio efluente industrial, contendo 3% de <i>d</i> -limoneno, por 3 e 5 dias.....	108
Figura 47: Produção de biomassa pelo fungo 898, crescido em efluente industrial contendo 3% de <i>d</i> -limoneno por 3 e 5 dias.....	109
Figura 48: Toxicidade das linhagens 0,1D e LP-1 3 ao <i>d</i> -limoneno, cultivadas por 10 dias em meio contendo efluente industrial Calha e 0 a 10% do	

monoterpeno.....	110
Figura 49: Toxicidade das linhagens 0,1D e LP-1 3 ao <i>d</i> -limoneno, cultivadas por 10 dias em meio contendo efluente industrial Água Preta e 0 a 10% do monoterpeno.....	111
Figura 50: Toxicidade das linhagens 0,1D e LP-1 3 ao <i>d</i> -limoneno, cultivadas por 10 dias em meio contendo efluente industrial Saída do Sedimento e 0 a 10% do monoterpeno.....	112
Figura 51: Toxicidade das linhagens 0,1D e LP-1 3 ao <i>d</i> -limoneno, cultivadas por 10 dias em meio contendo efluente industrial Lagoa de Polimento e 0 a 10% do monoterpeno.....	113

LISTA DE TABELAS

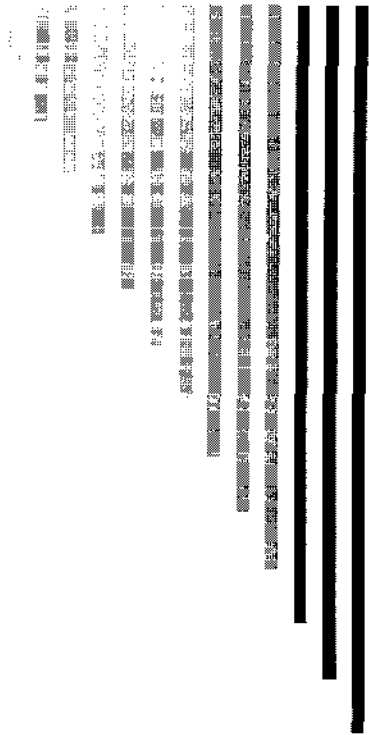
TABELA 1: Determinações de pH das amostras de efluente industrial coletadas nos meses de outubro e dezembro de 1999 e fevereiro de 2000 e 2001.....	55
TABELA 2: Determinação de sólidos suspensos, dissolvidos e totais das amostras de efluente industrial coletadas nos meses de outubro e dezembro de 1999 e fevereiro de 2000 e 2001.....	58
TABELA 3: Determinação de DQO das amostras de efluente industrial coletadas nos meses de outubro e dezembro de 1999 e fevereiro de 2000 e 2001.....	59
TABELA 4: Microrganismos isolados do efluente industrial e da ETE em 6 coletas realizadas entre dezembro de 1998 e fevereiro de 2001.....	60
TABELA 5: Microrganismos isolados de diferentes pontos da ETE nas 6 coletas realizadas entre dezembro de 1998 e fevereiro de 2001.....	61
TABELA 6: Degradação do <i>d</i> -limoneno (%) por 34 bactérias isoladas do efluente industrial da indústria de suco de laranja, sob 2 condições.....	64
TABELA 7: Degradação do <i>d</i> -limoneno (%) por 18 fungos, entre ligninolíticos e isolados do efluente da indústria de laranja.....	66
TABELA 8: Degradação do <i>d</i> -limoneno (%) por 3 leveduras isoladas do efluente industrial da indústria de suco de laranja, sob 2 condições.....	67
TABELA 9: Resultados dos testes de identificação bioquímica das linhagens 0,1D e LP-1 3.....	96

RESUMO

O uso crescente do *d*-limoneno e a escassez de informação sobre sua biodegradação geraram a necessidade de se estudar o destino ambiental dos mesmos, assim como, os processos biológicos efetivos para sua degradação. O objetivo deste trabalho foi encontrar microrganismos capazes de degradarem altas concentrações de *d*-limoneno quando presentes em efluente industrial. Para este estudo os microrganismos foram isolados do efluente de uma indústria de suco de laranja, através de isolamento por superfície. Além disso, foram utilizados os fungos ligninolíticos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, com comprovada atividade degradativa de compostos tóxicos. Os microrganismos foram pré-selecionados por crescimento visual e porcentagem de degradação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A seleção foi realizada através da avaliação do tempo de crescimento (1, 3, 5 e 7 dias) e efeito da concentração de *d*-limoneno (1, 3, 5 e 7%), utilizando-se determinação da atividade de enzimas intracelulares (Catecol 1,2 dioxigenase; Catecol 2,3 dioxigenase; Protocatecol 3,4 dioxigenase; Aldeído desidrogenase) e enzimas extracelulares (Lacase; Peroxidase; Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase), teste de toxicidade e porcentagem de degradação por CLAE. Após, os melhores microrganismos foram crescidos no efluente industrial contendo 3 e 5% de *d*-limoneno por 3 dias e, por fim, identificados. Ao todo foram estudados 576 microrganismos isolados, entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos e 56 fungos ligninolíticos. Foram pré-selecionados 5 microrganismos e, após seleção, somente 3 foram estudados no efluente industrial, sendo 2 bactérias e um fungo filamentoso. Os microrganismos apresentaram melhor crescimento em meio contendo 3% de *d*-limoneno, crescidos por 3 dias. Após estudo, as linhagens foram identificadas como sendo *Pseudomonas* sp.; *Enterobacter* sp. e *Fusarium* sp.

ABSTRACT

The continuous use of *d*-limonene and the shortage of information on its degradation have lead to the study of its environmental destination as well as of the biological processes responsible for degradation. The purpose of this work was to isolate microorganisms from industrial wastewater able to degrade high concentrations of *d*-limonene. The microorganisms isolated from wastewater samples collected at an orange juice industry together with the microorganisms belonging to the culture collection of the Microbial Systematic and Physiology Laboratory – FEA, UNICAMP, and previously known to degrade toxic aromatic compounds, were used through out this work. A pre-selection based on visual growth and also the degradation (%) of *d*-limonene, determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), following growth of the strains was carried out. The chosen strains were then grown for 1, 3 5 or 7 days in 1, 3, 5, or 7 % (v/v) of *d*-limonene. The intracellular enzymes catechol 1,2 dioxygenase, catechol 2,3 dioxygenase, protocatechol 3,4 dioxygenase and aldehyde deshydrogenase; the ligninolytic enzymes laccase, lignin-peroxidase, manganese-peroxidase and peroxidase; as well as the effect of the concentration of *d*-limonene on growth and the degradation of *d*-limonene following growth were determined. The microorganisms showing the best results were selected and cultivated in the *d*-limonene enriched (3 or 5 % v/v) wastewater from the orange juice industry. A total of 576 microorganisms were isolated and 56 ligninolytic fungi were used. Five strains were chosen following the pre-selection experiments, from which three were selected for growth in the enriched industrial effluent. Best growth was observed in the 3% *d*-limonene-enriched effluent, following three days of cultivation. These strain were identified as *Pseudomonas sp*, *Enterobacter sp* and *Fusarium sp*.



INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, seguido dos Estados Unidos, sendo que em 1996, o estado de São Paulo foi responsável por mais de 80% da produção do país. A grande produção de cítricos no Brasil colocou o país na posição de maior exportador mundial de suco concentrado, com uma participação de 71% do mercado internacional, sendo a responsável pelo funcionamento de diversas indústrias.

Da produção mundial de laranja, a maioria é utilizada na fabricação de suco concentrado. Entretanto, estas indústrias produzem também grande quantidade de subprodutos, como casca, semente, membrana e outros componentes, que podem se tornar matérias-primas para a fabricação de novos produtos.

O primeiro subproduto da indústria de cítricos foi o óleo de laranja e, hoje, se destaca como um dos principais produtos geradores de receitas às empresas do setor. O monoterpeno *d*-limoneno, principal componente do óleo da casca da laranja, tem aplicação em diversas indústrias, sendo também é utilizado como material na fabricação de resinas adesivas, solventes, garrafas plásticas. Além disso, seu uso comercial aumentou muito nos últimos anos pelo fato do *d*-limoneno ser excelente solvente industrial ou agente desengordurante, substituindo os clorofluorohidrocarbonos.

Apesar do número ilimitado de aplicações do *d*-limoneno, ele possui também ação antimicrobiana e, portanto, sua liberação para a linha de tratamento de efluentes industriais é prejudicial, uma vez que pode destruir a flora microbiana do processo.

O *d*-limoneno e os compostos resultantes de sua auto-oxidação possuem propriedades alergênicas podendo causar problemas às pessoas expostas a estes, tanto por contato direto com a pele como por inalação, quando presentes em altas concentrações nas linhas de tratamento de efluente.

O uso crescente do *d*-limoneno como matéria-prima por diversas indústrias, o conseqüente aumento da concentração deste composto nas estações de tratamento de efluentes (ETE) e a escassez de informação sobre a sua biodegradação geraram a necessidade de se estudar o destino ambiental dos mesmos, assim como, os processos biológicos efetivos para sua degradação.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Indústria de suco de laranja no Brasil

A primeira fábrica de suco de laranja concentrado foi implantada no Brasil, durante a II Guerra Mundial, para o fornecimento do mercado interno, seguindo os moldes norte-americanos. Somente na década de 60, a indústria brasileira de suco e outros subprodutos da laranja ganhou impulso, motivada pela forte geada que, em 1961, destruiu grande parte da citricultura dos Estados Unidos (LARANJA BRASIL, 2003). Em 1981, as exportações brasileiras de suco de laranja concentrado ultrapassaram 600 mil toneladas anuais (ABECITRUS, 2004).

Ainda hoje, Brasil e Flórida são as duas principais áreas fornecedoras de fruta para a produção de suco concentrado, principalmente a partir de laranja doce. No Brasil, a maior parte da produção brasileira de laranja destina-se à indústria do suco, que está concentrada no Estado de São Paulo, onde é a economia essencial de 204 municípios. Atualmente, a citricultura é uma das mais típicas atividades agroindustriais, com alto faturamento anual centralizado principalmente em suco concentrado e subprodutos. Somente na safra de 2003 foram exportadas 1.247.834 toneladas de suco de laranja concentrado (ABECITRUS, 2004; LARANJA BRASIL, 2003).

Apesar do suco concentrado e congelado ser o principal produto da laranja, as indústrias produzem ainda uma série de outros subprodutos, tais como, óleos essenciais, *d*-limoneno, terpenos e farelo de polpa cítrica. Esses subprodutos possuem diferentes aplicações no mercado interno e externo que incluem alimentação animal, fabricação de produtos químicos e solventes, aplicação em indústrias de tintas, cosméticos, etc. A Figura 1 mostra que o suco representa aproximadamente 45% do rendimento da laranja, mas muitos outros subprodutos são obtidos a partir da fruta (ABECITRUS, 2004).

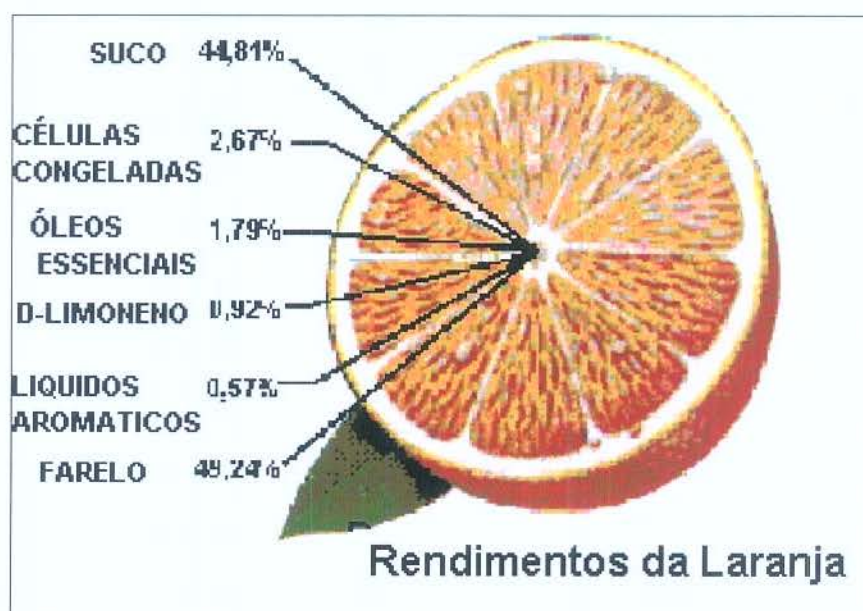


Figura 1: Subprodutos da laranja e seus respectivos rendimentos.

As células congeladas correspondem à polpa pasteurizada e congelada que pode ser utilizada em produtos como sucos, sucos concentrados, refrigerantes e outras bebidas. O farelo de polpa cítrica peletizado ou farelo de casca de laranja é obtido por meio de tratamento de resíduos sólidos e líquidos remanescentes da extração do suco. Este produto é usado como ração animal, principalmente na pecuária. Os óleos essenciais são retirados da casca das frutas cítricas e têm aplicação em várias indústrias, como cosmética, farmacêutica e alimentícia. Através da remoção de compostos oxidantes destes óleos, obtém-se o *d*-limoneno o qual pode ser utilizado, por exemplo, em solventes de resinas, borracha, pigmentos, tintas, fabricação de adesivos, etc. Outros subprodutos que também possuem aplicação no mercado externo e interno são pectina, fibra, flavonóides e limonino (ABECITRUS, 2004; BRADDOCK, 1995).

2.2 Óleo Essencial de Frutas Cítricas

Os óleos essenciais, tanto de frutas cítricas como outros, consistem de uma mistura de terpenos e sesquiterpenos, compostos oxigenados e resíduos não voláteis, sendo que o termo óleo implica que estas substâncias são insolúveis em água, mas solúveis em solventes polares (MARQUES, 1997).

O óleo essencial aromático é uma camada oleosa separada durante a coleta da essência aquosa cítrica, enquanto que o óleo da casca é espremido de glândulas presentes nesta durante a extração do suco, não entrando em contato direto com o mesmo, pois contém substâncias amargas (POTTER e HOTCHKISS, 1995). O óleo cítrico da casca é encontrado em sacos de forma oval, na porção colorida do flavedo, e age como barreira tóxica natural para entrada de microrganismos. Ele é composto, principalmente, de *d*-limoneno (mais de 90%) e outros mono e sesquiterpenos. Entretanto, os terpenos não contribuem muito para a fragrância do óleo essencial aromático, agindo mais como carregador dos compostos aromáticos (KIMBALL, 1991).

A recuperação do óleo cítrico da casca como subproduto para uso como matéria-prima por diversas indústrias, tais como, de perfume, de cosmético, farmacêutica, de inseticidas e têxteis, previne que este seja um grave poluente ambiental (MATTHEWS e BRADDOCK, 1987). A utilização dos monoterpenos, tais como, *d*-limoneno, α -pineno, β -pineno e linalool, em larga escala industrial, na tentativa de encontrar substitutos para solventes clorados e clorofluorocarbonos, é recente (MISRA e PAVLOSTATHIS, 1997; PAVLOSTATHIS e MISRA, 1999). Todavia, o aumento do uso industrial de monoterpenos e conseqüente aumento das concentrações destes compostos e de outros terpenos nos efluentes das indústrias cítricas, assim como das químicas e farmacêuticas, pode causar danos aos organismos que compõem o lodo ativado das estações de tratamento de efluentes, ocasionando problemas sérios ao funcionamento geral destas indústrias (CONNOR et al., 1993; KARLBERG; MAGNUSSON e NILSSON, 1994; MISRA; PAVLOSTATHIS e PERDUE, 1996; CHANG, KARLBERG e MAILBACH, 1997; MISRA e PAVLOSTATHIS, 1997; MUMTAZ et al., 1998; PAVLOSTATHIS e MISRA, 1999; VILA et al., 1999). No campo da ecotoxicidade, os efeitos dos compostos lipofílicos sobre os microrganismos têm recebido muita atenção, uma vez que estes organismos têm papel essencial na remoção de poluentes do meio ambiente e, portanto, a inibição na biodegradação, devido à insolubilidade em água e conseqüentemente menor biodisponibilidade, resulta em um aumento no período de remoção dos mesmos (SHIKKEMA, BONT e POOLMAN, 1995).

2.3 Terpenos

Os terpenos constituem a maior família de produtos naturais encontrados na natureza, sendo que, mais de 30000 diferentes monoterpenos já foram identificados (WERF; KEIJZER e SCHAT, 2000). São hidrocarbonetos insaturados derivados de unidades de isopreno e encontrados na maioria das plantas superiores (IKAN, 1990; WERF, OVERKAMP e BONT, 1998; WERF, SWARTS e BONT, 1999), sendo os óleos essenciais cítricos e de madeira as fontes mais abundantes de terpenos. Na figura 2, observa-se uma unidade de isopreno.

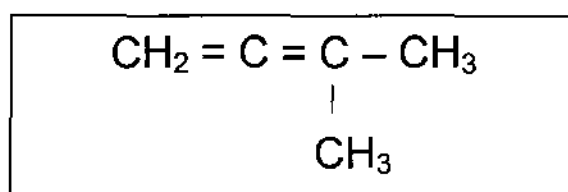


Figura 2: Unidade de isopreno.

Os terpenos possuem fortes odores mesmo em baixas concentrações, são insolúveis em água e considerados não agressivos aos metais e à maioria dos plásticos e dos polímeros, entretanto, são materiais inflamáveis (IKAN, 1990).

De acordo com o número de unidades de isopreno ligadas, os terpenos podem ser classificados em: monoterpenos ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$), sesquiterpenos ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$), diterpenos ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}$), triterpenos ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}$), tetraterpenos ($\text{C}_{40}\text{H}_{64}$) e politerpenos (C_5H_8)_n (IKAN, 1990; WERF, SWARTS e BONT, 1999).

2.3.1 Monoterpenos

Os monoterpenos constituem a classe mais simples de terpenos encontrados na natureza, sendo os maiores componentes dos óleos de plantas (WERF, KEIJZER e SCHAFT, 2000). São sintetizados a partir de duas unidades de isopreno através de diferentes processos. Os monoterpenos são, de preferência, produzidos por plantas que contêm ductos de resinas, sendo que a emissão destes compostos está associada à fotossíntese, uma vez que é estimulada pela luz, declina no escuro e é inibida na ausência de CO_2 no ar. As enzimas monoterpenos sintetases catalisam o passo final do difosfato geranil para vários monoterpenos e, através de diferentes processos de ciclização, ocorre a

formação destes compostos (FISCHBACH et al., 2000; BOON, BOON e MULDER, 2000).

Os monoterpenos são subdivididos em três grupos: acíclicos, monocíclicos e bicíclicos (IKAN, 1990; TRUDGILL, 1990; MISRA, PAVLOSTATHIS e PERDUE, 1996; WERF, KEIJZER e SCHAFT, 2000), sendo que os monoterpenos cíclicos são chamados de monoterpenóides. A Figura 3 mostra alguns monoterpenos bastante encontrados na natureza.

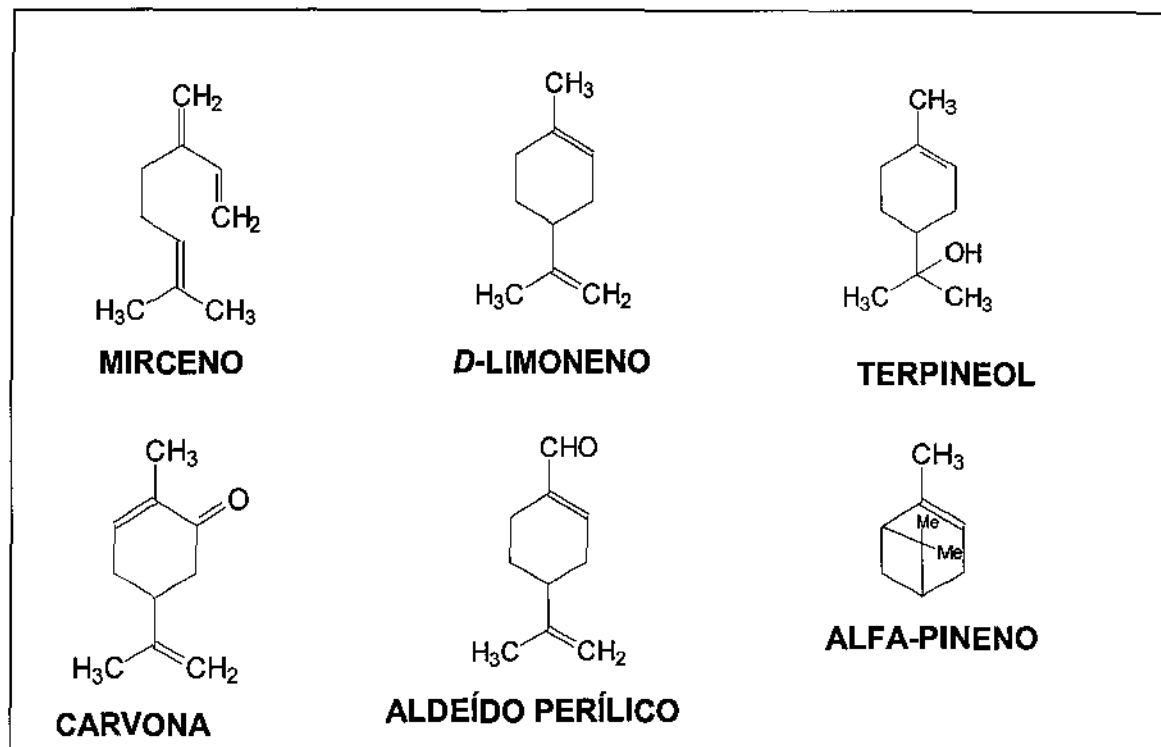


Figura 3: Alguns monoterpenos importantes encontrados na natureza: Mirceno (monoterpeno acíclico); D-limoneno (monoterpeno hidrocarbono); Terpineol (monoterpeno álcool); Carvona (monoterpeno acetona); Aldeído perílico (monoterpeno aldeído); α -pineno (monoterpeno bicíclico).

Tradicionalmente, os monoterpenos são muito usados como agentes flavorizantes na indústria de alimentos e de perfumes e alguns monoterpenos, que possuem valor medicinal, são usados na indústria farmacêutica. O efeito dos monoterpenóides no crescimento e atividade microbiana tem sido estudado, primariamente, para determinar o potencial destes compostos em prevenir o crescimento de microrganismos patogênicos na indústria de alimentos

(SHIKKEMA; BONT e POOLMAN, 1995; AMARAL et al., 1998; BARNHART et al., 1999; ONKEN e BERGER, 1999).

Recentemente, a biotransformação microbiana de monoterpenos em compostos de interesse comercial, tais como, α -terpinol, limoneno 1,2-diol e ácido perílico, e a degradação destes, quando presentes em efluentes industriais, tem recebido atenção. Entretanto, ainda é pequeno o conhecimento de como os monoterpenos afetam bactérias e fungos, mas sabe-se que estes compostos exercem propriedades antimicrobianas através do rompimento da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa (AMARAL et al., 1998; WARD; COURTNEY e LANGEHEIM, 1998).

2.3.1.1 *D*-limoneno

É um monoterpeno monocíclico encontrado em frutas cítricas e especiarias, vegetais e plantas, sendo componente de mais de 300 óleos essenciais em concentrações que variam de 95% (limão, laranja) a menos de 1% (palmorosa) (TAN e DAY, 1998; WERF, KEIJZER e SCHAFT, 2000; ADAMS, DEMYTTEAERE e KIMPE, 2003). Ao lado do α -pineno é o mais abundante terpeno na natureza (DEMYTTEAERE, BELLEGHEM e KIMPE, 2001). É um líquido insolúvel em água, de cor branca a amarelada, leve odor cítrico e bastante inflamável (BRADDOCK, TEMELLI e CADWALLADER, 1986).

A fonte primária de *d*-limoneno são os vapores da produção do suco cítrico (TAN e DAY, 1998). Estima-se que a produção anual de *d*-limoneno seja de 50000 ton/ano (DUETZ et al., 2001). Durante o processamento do suco, o *d*-limoneno extraído é levado para tanques de armazenamento e depois vendido para uso industrial. Quando liberado como resíduo é levado para aterros ou incinerado, dependendo das leis municipais, estaduais ou federais que controlam os aterros sanitários (MACHADO, 1997). Na Figura 4, observa-se o esquema de como se obtém o *d*-limoneno a partir da laranja "in natura".

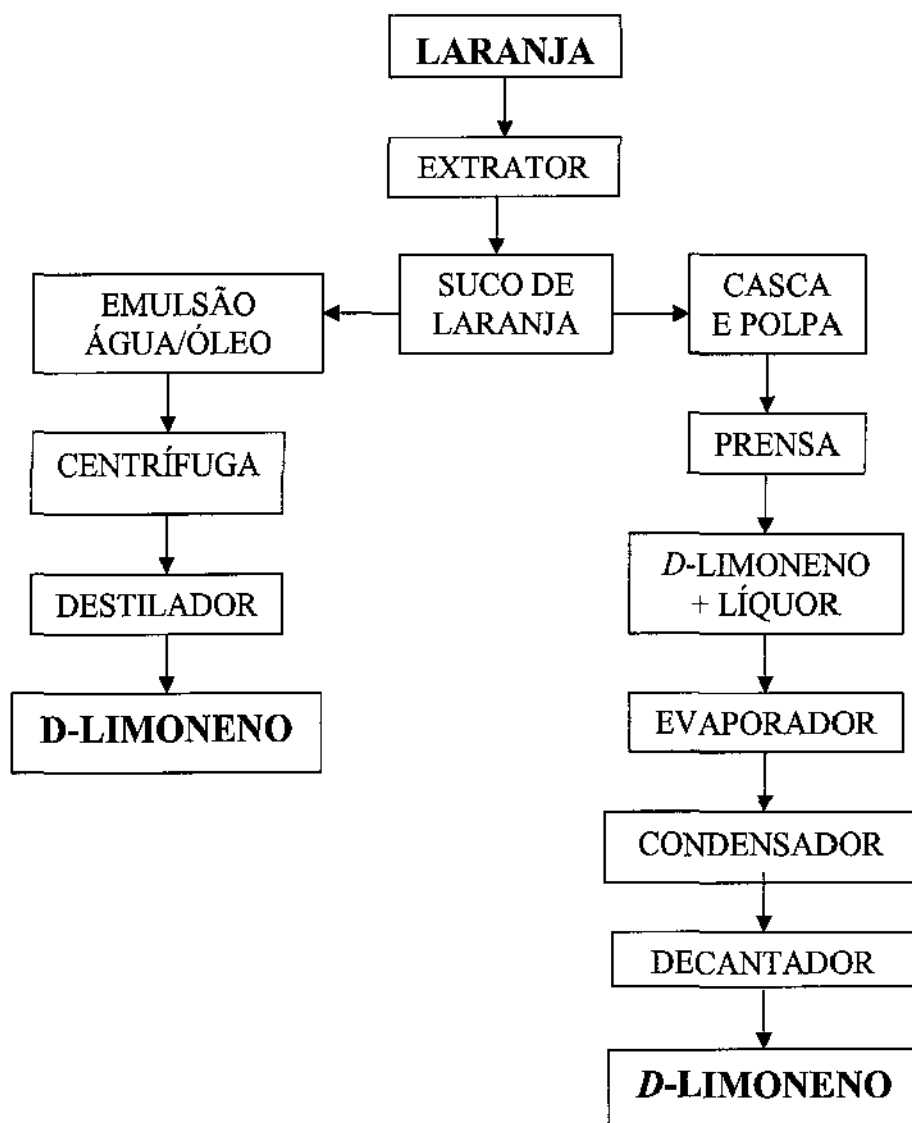


Figura 4: Esquema de obtenção do *d*-limoneno a partir da laranja “in natura”.

Durante a extração do suco ocorre a ruptura dos sacos de óleos presentes na casca e o óleo liberado é lavado, formando a emulsão óleo/água. Esta emulsão é centrifugada, separando a emulsão rica em óleo da fase aquosa. A emulsão é então destilada obtendo-se o *d*-limoneno. A casca e a polpa são levadas para fábrica de ração e uma pequena parte de *d*-limoneno é recuperada (KIMBALL, 1991).

Existem algumas questões recentes no que diz respeito à toxicidade do *d*-limoneno. Quando liberado no meio ambiente ele exerce efeito tóxico sobre microrganismos, insetos e plantas através da inibição da fosforilação oxidativa e mudanças da membrana celular, afetando a sua funcionalidade como barreira

seletiva e como matriz enzimática (URIBE e PEÑA, 1990; SHIKKEMA, BONT e POOLMAN, 1995). Este composto é usado como inibidor do crescimento fúngico, sendo também antimicrobiano, antiviral, antilarval e repelente de insetos (MATHEWS e BRADDOCK, 1987; CHASTAIN et al., 1996; THE ROD FAMILY TRUST, 1997; DELORME, CRISOFULLI e WARNER, 1998; PRATES et al., 1998). Segundo SANTOS et al. (1998), os óleos essenciais exibem propriedades tóxicas, repelentes e atrativas em numerosas espécies de insetos. Além disso, eles reduzem a fecundidade de vários insetos herbívoros. Em seu trabalho, o *d*-limoneno demonstrou grande ação inseticida, sendo tóxico ao inseto via penetração pela cutícula, sistema respiratório e aparelho digestivo.

Já existem trabalhos que demonstram que o *d*-limoneno pode causar vários danos para algumas espécies de ratos (ANDERSON e ANDERSON, 2000). Aparentemente, quando o *d*-limoneno é consumido por ratos, um de seus subprodutos (*cis-d*-limoneno-1,2-óxido) se liga à proteína alfa-2T-globulina, impedindo sua degradação. O acúmulo desta proteína no rim provoca danos a este órgão e câncer (DIETRICH e SWENBERG, 1991; HARD e WHYSNER, 1994). Esta ação não é observada em humanos, pois estes não sintetizam a proteína alfa-2T-globulina. Em seres humanos o *d*-limoneno é convertido em 2 metabólitos (*d*-limoneno 8,9-glicol e *d*-limoneno 1,2-glicol), os quais são eliminados pelo rim.

Para humanos o *d*-limoneno pode ser irritante para pele, olhos e membranas das mucosas do nariz e da garganta, podendo causar náuseas, vômitos, queimação abdominal, diarreia e dor de cabeça quando ingerido, além de irritar todos os tecidos, podendo também levar ao colapso circulatório (FALK, 1991, KARLBERG e DOOMSGOOSSENS, 1997; MACHADO, 1997; CHANG, KARLBERG e MAILBACH, 1997). A inalação pode causar tontura, taquicardia, dificuldades respiratórias, inconsciência e convulsão, sendo que o *d*-limoneno constitui-se em um veneno quando injetado por via intravenosa, sendo moderadamente tóxico por via intraperitoneal e menos tóxico quando ingerido (KARLBERG e DOOMSGOOSSENS, 1997; CHANG, KARLBERG e MAILBACH, 1997).

O *d*-limoneno é considerado geralmente seguro pelo Food and Drug Administration (FDA)-USA, mas trabalhadores de uma estação de tratamento de efluente municipal em Boston - MA, nos Estados Unidos, apresentaram sintomas, como, irritação do sistema respiratório e dor de cabeça, causados por exposição a um composto, o qual foi identificado como sendo *d*-limoneno. Por isso, foi sugerido que fossem determinadas concentrações limites de descarte deste composto para proteger a integridade dos trabalhadores das linhas de tratamento de efluentes, assim como, a sanidade da fauna e da flora presentes na costa marítima e nos rios ao redor de Boston (CONNOR et al., 1993).

2.4 Degradação dos monoterpenos por microrganismos

O *d*-limoneno é considerado pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) como sendo biodegradável, mas sua baixa solubilidade e alta volatilidade podem causar problemas quando presentes, em altas concentrações, nas Estações de Tratamento de Efluentes (CONNOR et al., 1993).

A degradação microbiana de monoterpenos sob condições tanto aeróbias como anaeróbias tem sido estudada (AMARAL et al., 1998). O estudo da biodegradação dos monoterpenos está voltado principalmente para os processos aeróbios, mas em sistemas naturais de solo, a redução por nitrato ou outros processos anaeróbios, tais como redução de sulfato e metanogênese, também podem ser importantes (MISRA e PAVLOSTATHIS, 1997; PAVLOSTATHIS e MISRA, 1999). Em altas concentrações, a toxicidade não específica aos microrganismos pode impedir a decomposição e mineralização, podendo inibir processos, como a nitrificação de solos (WARD, COURTENEY e LANGEHEIM, 1998; PAVLOSTATHIS e MISRA, 1999).

Vários microrganismos têm sido descritos como sendo capazes de utilizar o *d*-limoneno como única fonte de carbono e energia, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (MARS, GORISSEN e VAN DEN BELD, 2001).

Muitos trabalhos foram desenvolvidos nos últimos anos sobre biodegradação do *d*-limoneno, sendo que os primeiros dados são da década de 60 (DEMYTTNAERE, BELLEGHEM e KIMPE, 2001). Atualmente, está sendo muito estudada a bioconversão de *d*-limoneno para outros monoterpenos de valor mais

elevado, uma vez que este composto é relativamente barato e facilmente encontrado na natureza (ADAMS, DEMYTTENAERE e KIMPE, 2003) como, α -terpineol, limoneno-1,2-diol, ácido perílico e carvona, utilizados como compostos de aroma em alimentos e perfumes. Existem vários estudos sobre esta bioconversão utilizando muitos tipos de microrganismos, tais como, *Penicillium digitatum*, *Gladosporium* sp., *Pseudomonas incognita*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas gladioli*, *Pleurotus sapidus*, *Xanthomonas* sp. (CADWALLADER, BRADDOCK e PARISH, 1992; BRADDOCK e CADWALLADER, 1992; CHANG e ORIEL, 1994; SPEELMANS, BIJLSMA e EGGINK, 1998; TAN e DAY, 1998; ONKEN e BERGER, 1999; WELF, KEIJZER e SCHAFT, 2000; ADAMS, DEMYTTENAERE e KIMPE, 2003). Estes microrganismos, geralmente, utilizam uma das cinco vias para bioconversão do *d*-limoneno: 1) oxidação do substituinte metil para compostos perílicos; 2) oxidação alílica para *cis* e *trans*-carveol; 3) epoxidação da dupla ligação na unidade isopropenil para α -terpineol; 4) conversão da dupla ligação do anel para o correspondente diol; 5) formação de isopiperitenol.

Entretanto, nestes processos, a formação destes monoterpenos ocorre, geralmente, em quantidades insuficientes devido à toxicidade microbiana do *d*-limoneno (ONKEN e BERGER, 1999; ADAMS, DEMYTTENAERE e KIMPE, 2003). A deficiência nos sistemas de biotransformação do *d*-limoneno em produtos de valores mais elevados, em geral, se deve à volatilidade e à toxicidade dos terpenos aos microrganismos, dado pelo aumento na fluidez da membrana e perda de sua integridade. Entretanto, processos de adaptação podem decrescer a fluidez da membrana em bactérias pelo aumento de ácidos graxos saturados na membrana fosfolipídica (SPEELMANS, BIJLSMA e EGGINK, 1998; CHATTERJEE e BHATTACHARYYA, 2001).

2.4.1 Degradação de monoterpenos por bactérias

Na última década, algumas linhagens bacterianas resistentes ao *d*-limoneno, foram descobertas e caracterizadas. Estas linhagens, tais como, *Pseudomonas putida*, podem adaptar suas membranas, tornando-se mais resistentes ao acúmulo de terpenóides tóxicos (SPEELMANS, BIJLSMA e EGGINK, 1998). KOH *et al.* (2003), em seu trabalho, conseguiram isolar do meio ambiente, bactérias capazes de crescer em carvona e limoneno como única fonte

de carbono e energia. A maioria das bactérias era Gram-positiva, sendo que 7 linhagens eram da classe *Proteobacteria*. Em outro trabalho, *P.putida* foi capaz de converter o limoneno em ácido perílico, quando cultivada em meio de cultura contendo glicerol, amônia e limoneno (MARS, GORISSEN e VAN DEN BELD, 2001). CHATTERJEE e BHATTACHARYYA (2001), utilizando 3 fungos e 15 bactérias, também observaram que *P. putida* foi capaz de oxidar o *d*-limoneno e convertê-lo em álcool perílico e p-1-mentano 6,8-diol. Entretanto, a degradação dos produtos pela bactéria não foi observada neste trabalho. *P. aeruginosa* também foi capaz de converter 95% do *d*-limoneno presente no meio em α -terpineol e carvona em trabalho realizado por ACOSTA et al. (1996).

Outros trabalhos realizados por vários pesquisadores demonstraram a habilidade de certas bactérias, como *Pseudomonas*, em degradar totalmente o *d*-limoneno. Segundo MISRA e PAVLOSTATHIS (1997), microrganismos presentes no solo são capazes de degradar prontamente monoterpenos, como α -pineno, limoneno e γ -terpineno.

A degradação de α -pineno por *Pseudomonas* forma inicialmente *d*-limoneno, carveol, álcool perílico e aldeído perílico, seguida de uma clivagem do anel e formação de metabólitos ácidos que podem ser degradados por β -oxidação (COLOCOSI, SAQIB e LEAK, 1996; SAVITHIRZ et al., 1998).

Em trabalhos com outros microrganismos, a bactéria Gram-positiva, *Rhodococcus erythropolis*, foi capaz de crescer utilizando o *d*-limoneno como única fonte de carbono e energia. Este microrganismo produziu a enzima limoneno-1,2-epóxido hidrolase capaz de transformar o *d*-limoneno, pois converte o limoneno 1,2-epóxido em limoneno-1,2-diol (WERF, OVERKAMP e BONT, 1998; WERF, KEIJZER e SCHAFT, 2000).

DUETZ et al. (2001), utilizando uma linhagem degradadora de tolueno, *Rhodococcus opacus*, demonstraram que esta bactéria foi capaz de converter o *d*-limoneno em trans-carveol, em culturas onde o tolueno foi utilizado como fonte de carbono.

2.4.2 Degradação de monoterpenos por fungos

Segundo ONKEN e BERGER (1999), o *d*-limoneno é tóxico para os fungos porque aumenta a fluidez das membranas fúngicas, levando a uma permeabilidade inespecífica da membrana e a perda de sua integridade. Isto causa um decréscimo do peso seco e uma inativação do metabolismo fúngico.

Os fungos filamentosos e leveduras, tais como *Hormonema* sp., *Trichosporon* sp., *Candida parapsilosis*, *Arxula adensorivorans*, foram capazes de utilizar o *d*-limoneno produzindo como produtos da biotransformação a isopiperitenona, ácido perílico, α -terpineol e álcool perílico (VAN DYK, VAN RENSBURG e MOLELEKI, 1998). Estes autores estudaram a biotransformação de limoneno por fungos e leveduras e observaram que os melhores resultados foram obtidos por *Hormonema* sp, quando o *d*-limoneno era adicionado a cada 12 horas ao meio de cultura. No mesmo trabalho, os autores também observaram que após 24 horas da adição do monoterpeno houve um decréscimo das células viáveis assim como um decréscimo da formação dos produtos. Entretanto, não ficou esclarecido se a morte celular era devido à toxicidade do composto ou dos subprodutos formados. Outro fungo capaz de utilizar o *d*-limoneno produzindo o ácido perílico é o *Fusarium verticilloides* (OLIVEIRA & STRAPASSON, 2000).

O estudo de TAN e DAY (1998) mostra que o fungo *Penicillium digitatum* foi capaz de transformar o *d*-limoneno em α -terpineol, onde o O₂ acelerou esta bioconversão. Em outro trabalho utilizando esporos de *P. digitatum*, estes foram capazes de crescer em meio contendo *d*-limoneno como única fonte de carbono e convertê-lo em α -terpineol (DEMYTTENAERE, BELLEGHEM e KIMPE, 2001). Em outra pesquisa, ADAMS, DEMYTTENAERE e KIMPE (2003), utilizando linhagens de *P. digitatum* isoladas de mandarim, obtiveram a conversão de *d*-limoneno em α -terpineol.

Os estudos sobre biodegradação de monoterpenos mostram que tanto fungos como bactérias são responsáveis por transformações aeróbias destes compostos, tais como, hidroxilação na posição alílica, oxidações de álcoois e compostos carbonis, ruptura dos anéis carboxílicos e clivagens das ligações carbono-carbono (MISRA, PAVLOSTATHIS e PERDUE, 1996). Algumas destas

ligações estão presentes na lignina, como ligação carbono-carbono e os fungos ligninolíticos são capazes de clivá-las. Além disso, o sistema enzimático destes fungos apresenta uma série de reações de oxidação e redução capazes de degradar compostos aromáticos (BARR e AUST, 1994; MONTIES, 1994).

FISCHER et al. (1995) estudaram a habilidade do fungo de degradação branca *Ceriporiopsis subvermispora* de reduzir o conteúdo das resinas da madeira e este foi capaz de reduzi-las em 40%. As espécies de *Ophiostoma*, fungos comuns encontrados em árvores coníferas, não danificam estruturalmente a madeira como os fungos ligninolíticos, mas agem sobre seus componentes não estruturais como as resinas ácidas, as quais são ricas em terpenos (WANG et al., 1995).

2.4.2.1 Fungos Ligninolíticos e seus sistemas enzimáticos

Os fungos responsáveis pela degradação da madeira podem ser divididos em 3 classes: fungos de degradação branca, fungos de degradação marrom e fungos de degradação marrom, sendo a mais importante esta última, uma vez que são altamente ligninolíticos. Alguns fungos de degradação branca são: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus sajor-caju*, *Phlebia radiata*, *Bjerkandera adusta* (HATAKKA, 1994).

O sistema ligninolítico extracelular dos fungos de degradação branca tem encontrado significantes aplicações na área biotecnológica, graças ao sistema enzimático altamente oxidativo e não específico produzido pelos mesmos (COLLINS e DOBSON, 1995). O sistema enzimático destes fungos os torna capazes de metabolizar não só a lignina e seus subprodutos (MANZANARES, FAJARDO e MARTIN, 1995), mas uma grande variedade de poluentes como compostos fenólicos e compostos policíclicos aromáticos, azocorantes, defensivos agrícolas, bifenil policlorados (PCB) e outros, podendo ser então usados no tratamento de efluentes industriais e resíduos sólidos, contribuindo para a diminuição da poluição ambiental (BABITSKAYA, 1994; ARORA, 1995; GOLOVLEVA e LEONT'EVSKII, 1998; RODRIGUEZ, PICKARD e VAZQUEZ-DUHALT, 1999; ZHANG, KNAPP e TAPLEY, 1999). Além disso, estes fungos são capazes de suportar altas concentrações de poluentes tóxicos, ao contrário das

bactérias (BORJA et al., 1993). As principais enzimas produzidas por eles são: lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase.

2.5 Enzimas responsáveis pela biodegradação

As enzimas microbianas são utilizadas na degradação dos poluentes (MARS, GORISSEN e VAN DEN BELD, 1999). A destoxificação pode resultar na completa mineralização do poluente ou em decomposição parcial associada com a perda da atividade biológica. Muitas enzimas estão envolvidas neste mecanismo, protegendo as células das substâncias que lhes seriam tóxicas e/ou permitindo a utilização destes compostos como fonte de carbono e energia (BALAN, 2001).

No caso dos monoterpenos, ainda hoje, pouco é conhecido sobre o seu metabolismo, especialmente, sobre as enzimas envolvidas nas vias de degradação (WERF, KEIJZER e SCHAFT, 2000).

2.5.1 Enzimas extracelulares

São enzimas produzidas pelos microrganismos e liberadas para o meio circundante, em geral, para degradação de moléculas complexas que não podem ser transportadas para o interior da célula (TORTORA, FUNKE e CASE, 2000). Várias destas enzimas não são completamente específicas ao substrato, como é o caso das enzimas ligninolíticas que podem atuar sobre uma série de compostos tóxicos (COLLINS e DOBSON, 1995; BARR e AUST, 1994).

2.5.1.1 Lignina Peroxidase (LiP; EC 1.11.1.7)

Esta enzima constitui o maior componente do sistema de degradação do fungo *Phanerochaete chrysosporium* (DE JONG, FIELD e BONT, 1994; JOHJIMA et al., 1999). Sua produção tem sido muito estudada devido ao seu uso potencial no controle da poluição ambiental (MACEDO, GOTTSCHALK e BOM, 1999). É uma glicoproteína que contém Fe^{+3} como grupo prostético, e requer H_2O_2 para sua atividade catalítica (HATAKKA, 1994; REDDY e D'SOUZA, 1994).

A LiP catalisa a oxidação de vários compostos aromáticos através da remoção de um elétron, com subsequente formação de radicais catiônicos tipo aril, os quais são decompostos espontaneamente dando origem a uma variedade de produtos finais (HATAKKA, 1994; MANIMEKALAI e SWAMINATHAN, 1998;

JOHJIMA *et al.*, 1999). A LiP oxida substratos fenólicos para radicais fenoxilas, e catalisa a clivagem oxidativa de β -O-4, C α -C β e outras ligações presentes na lignina e em compostos modelos de lignina (PÉREZ *et al.*, 1997).

Durante o ciclo catalítico da LiP, o Fe^{+3} contido no grupamento heme da enzima passa por vários estados de oxidação (Figura 5). O primeiro passo compreende a oxidação do Fe (III) da enzima nativa para Fe (IV), gerando o composto I. Através da redução do composto I, é formado o composto II, que ainda contém Fe (IV). O agente redutor pode ser um substrato como álcool veratrílico ou H_2O_2 . Finalmente, uma etapa de redução, via um elétron, retorna a enzima ao seu estado nativo, completando o ciclo catalítico (BARR e AUST, 1994; DE JONG, FIELD e BONT, 1994).

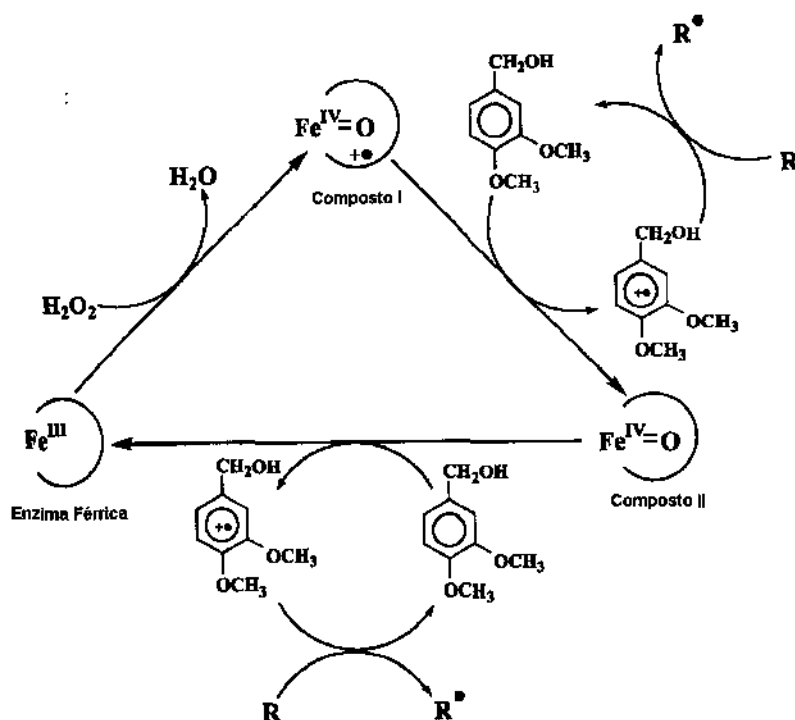


Figura 5: Ciclo catalítico da enzima lignina peroxidase. R representa o substrato enzimático na forma reduzida e $\text{R}^\bullet$ representa o substrato na forma oxidada (CAMERON; TIMOFEEVSKI e AUST, 2000).

Diferentemente da MnP e da lacase, a LiP é a única enzima com capacidade de oxidar compostos não fenólicos metabolizados com alto potencial oxi-redução. A LiP catalisa reações em meio fortemente ácido (pH 2-3), sendo

que não existe muita variação no seu modo de ação entre os diferentes fungos (KERSTEN et al., 1990).

2.5.1.2 Peroxidase dependente de manganês (MnP; EC 1.11.1.7)

É uma glicoproteína com Fe^{+3} como grupo prostético, sendo a principal enzima envolvida no branqueamento de polpa kraft e na descoloração de efluentes da indústria papaleira (DE JONG, FIELD e BONT, 1994; ZHANG, KNAPP e TAPLEY, 1999).

A MnP é cataliticamente dependente de H_2O_2 e de Mn^{2+} , onde Mn(II) é oxidado para Mn(III) , e comporta-se como um mediador de baixa massa molar que pode se difundir para regiões distantes na molécula de lignina e iniciar o processo de oxidação. Esta enzima pode agir sobre os compostos modelos de lignina, fenóis simples e aminas, oxidando-os (SAYADI e ELLOUZ, 1995; D'ANNIBALE et al., 1996; EGGERT, TEMP e ERIKSSON, 1996; PÉREZ et al., 1997; KAPICH, JENSEN e KAMMEL, 1999).

Durante o ciclo catalítico da MnP, o Mn(II) atua como doador de elétrons para gerar o composto II (Figura 6). O mesmo Mn(II) participa da conversão do composto II na enzima nativa. Os íons Mn(III) gerados são estabilizados por quelação com ácidos orgânicos, tais como, lactato, citrato ou malonato. O Mn(III) quelado atua como mediador redox difusível para catalisar a oxidação, via um elétron, de compostos fenólicos, gerando radicais fenoxila. (DE JONG, FIELD e BONT, 1994).

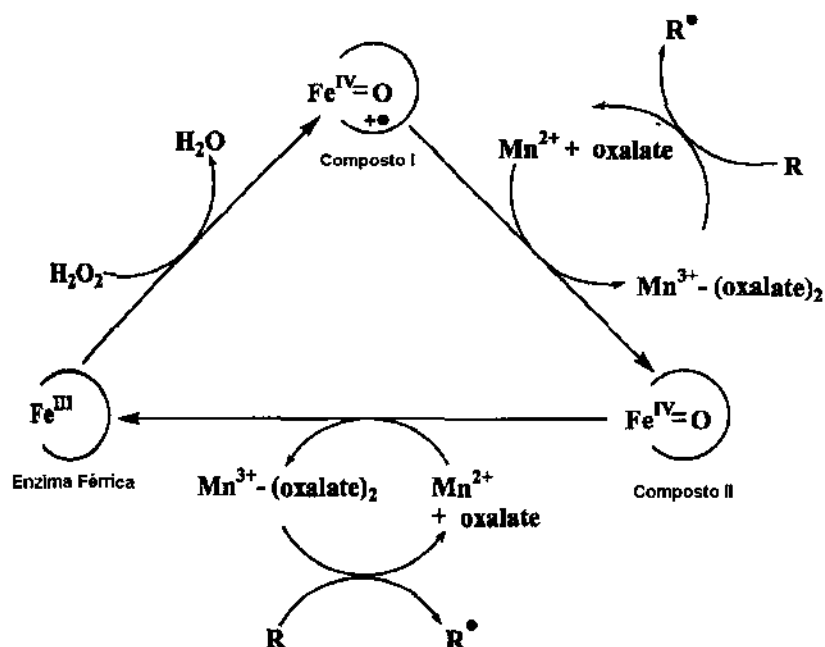


Figura 6: Ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase. R representa o substrato enzimático na forma reduzida e $\text{R}^\bullet$ representa o substrato na forma oxidada (CAMERON; TIMOFEEVSKI e AUST, 2000).

2.5.1.3 Lacase (Benzenodiol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)

É uma fenoloxidase com ampla especificidade de substratos, sendo uma enzima produzida por quase todos os fungos de degradação branca (EVANS et al., 1991; DE JONG, FIELD e BONT, 1994; TUOR, WINTERHALTER e FIECHTER, 1995). A lacase utiliza o O_2 para oxidar anéis fenólicos formando radicais fenoxilas (Figura 7). Sob certas condições, esta enzima pode oxidar compostos não fenólicos e clivar anéis fenólicos contendo grupos volumosos (HATAKKA, 1994). Esta enzima está envolvida na degradação da lignina e na destoxificação de compostos fenólicos, bem como na remoção de Cl^- de compostos clorofenólicos (BARBOSA, DEKKER e HARDY, 1996). A especificidade da enzima ao substrato oxidado depende da origem da lacase. Assim, lacases de diferentes fungos podem oxidar diferentes substratos (RINGLING e VAN ALFEN, 1993).

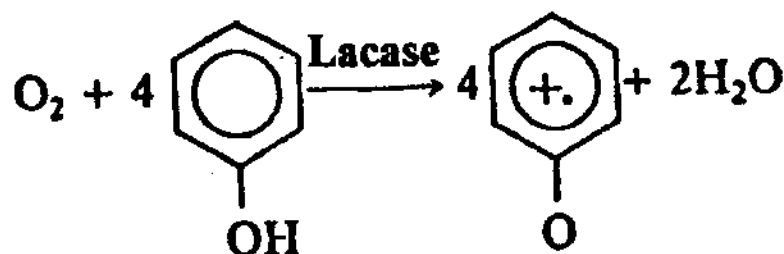


Figura 7: Representação de uma reação catalisada por lacase (SZKLARZ et al., 1989).

Até 1995, acreditava-se que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* não produzia lacase, e, conseqüentemente, esta enzima recebeu pouca atenção. Entretanto, estudos realizados após este período mostraram que a lacase pode ser muito importante na degradação da lignina e de compostos modelos de lignina (SRINIVASAN et al., 1995; EGGERT, TEMP e ERIKSSON, 1996) e a incapacidade de demonstrar a produção de lacase por *P. chrysosporium* foi devido ao uso de condições de cultura não favoráveis à sua produção (SRINIVASAN et al., 1995).

Segundo REGALADO et al. (1999), a produção de lacase por *Fusarium proliferatum* gerou oxigênio ativo envolvido no processo de mineralização. Embora não se sabe ao certo o papel da lacase na degradação da lignina, sabe-se que esta enzima é capaz de oxidar grupos fenólicos.

2.5.1.4 Peroxidase

São enzimas que contêm heme e requerem peróxido de hidrogênio para atuar sobre os substratos modelo de lignina (AITKEN, VENKATADRI e IRVINE, 1989). Podem ser dependentes de manganês presente no meio e desempenham papel importante na degradação da lignina, diminuindo a concentração de peróxido no meio, evitando assim a toxicidade para a célula (SZKLARZ et al., 1989).

2.5.2 Enzimas intracelulares

São enzimas produzidas pelos microrganismos e que atuam no interior das células (TORTORA, FUNKE e CASE, 2000). Uma vez que os terpenos são

compostos lipofílicos, eles podem difundir-se livremente através da membrana celular, podendo ser degradados por enzimas intracelulares (WERF, KEIJZER e SCHAFT, 1999).

Muitos são os estudos sobre linhagens microbianas capazes de utilizar o *d*-limoneno como fonte de carbono e energia. Entretanto, estes trabalhos, em geral, são incompletos não esclarecendo quais as rotas de degradação, suas enzimas e compostos intermediários (DUETZ *et al.*, 2001). Todavia, sabe-se que na degradação dos monoterpenos, as principais enzimas intracelulares envolvidas são as oxigenases.

Estudando-se o efeito de 2 terpenos (limoneno e carvona) na degradação de uma mistura comercial de PCBs por *Pseudomonas stutzeri* isolada do solo contendo estes compostos, conclui-se que ambos os monoterpenos tem a capacidade de induzir dioxigenases que exercem efeito na biodegradação de PCBs, quando glicerol e xilose são usadas como fontes de carbono (TANDLICH, BREZNÁ e DERCOVÁ, 2001).

As catecóis dioxigenase catalisam a clivagem oxidativa de substratos catecóis, utilizando ferro mononuclear como cofator para catalisar a clivagem intradiol ou extradiol (BUGG, 2001). A dioxigenase responsável pela catálise extradiol, é a catecol 2,3 dioxigenase (DAGLEY, 1975), enquanto que a catálise intradiol é realizada pela catecol 1,2 dioxigenase.

2.5.2.1 Catecol 1,2 dioxigenase (EC 1.13.11.1; pyrocatechase)

Esta enzima é capaz de degradar compostos altamente resistentes no meio ambiente, como os catecóis clorados. Em estudo utilizando a bactéria *Rhodococcus* sp, KIM *et al.* (2002) observaram que o *d*-limoneno foi capaz de induzir a produção da enzima catecol 1,2 dioxigenase. Outro estudo demonstrou que esta enzima também pode ser produzida por *Pseudomonas* sp (LIPTHAY *et al.*, 1999).

Catecol 1,2 dioxigenase contém ferro (III) como grupo prostético e pertence às enzimas que realizam clivagem intradiol. Muitas espécies bacterianas apresentam subunidades α e β não idênticas (α β -Fe³⁺)_n; já outras, possuem

polipeptídeo simples ($\alpha\alpha\text{-Fe}^{3+}$)_n, apresentando pouco ou nenhuma atividade aos clorocatecóis (BUGG, 2001).

2.5.2.2 Catecol 2,3 dioxigenase (EC 1.13.11.2; catechol:oxygen 2,3 oxidoreductase)

Catecol 2,3 dioxigenase pertencem às enzimas de clivagem extradiol. Consiste de quatro subunidades idênticas de 32 KDa e contém um íon ferro [Fe(II)] catalítico por subunidade (POLISSI e HARAYMA, 1993).

Na Figura 8, observa-se que a reação enzimática ocorre por um mecanismo bi-uni ordenado: primeiro ocorre a ligação do catecol a uma enzima, seguindo o dioxigênio para formar um complexo ternário, então, o anel aromático é clivado para produzir o semialdeído 2-hidroximucônico, o qual possui coloração amarela (BUGG, 2001; HANN, SOLENBERG e BALTZ, 1991).

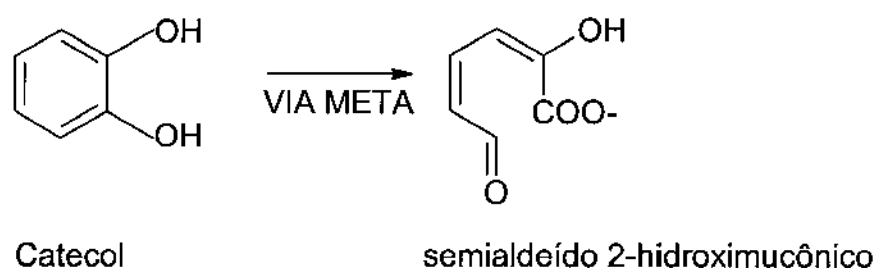


Figura 8: Clivagem extradiol – via meta

2.5.2.3 Protocatecol 3,4-dioxigenase (EC 1.13.11.3: Protocatechuato – oxyn 3,4-oxireductase)

Protocatecol 3,4 dioxigenase contém Fe (III) como grupo prostético e números iguais de subunidades α e β que formam diferentes estruturas quartenárias de $(\alpha\beta)$ _n, onde n varia de 3 a 12 (HARAYMA e KOH, 1992). Esta enzima realiza clivagem intradiol (Figura 9), atacando seu substrato por clivagem do anel aromático entre os grupos hidroxil, produzindo 2 grupos carbonil com a abertura do anel (FINKLE, 1971).

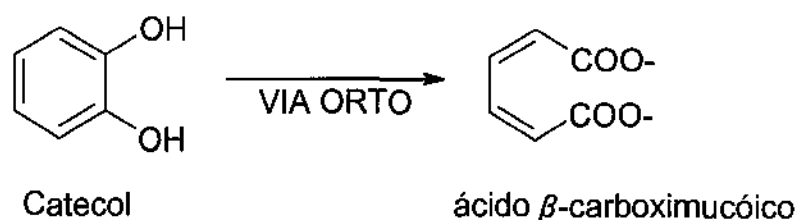


Figura 9: Clivagem intradiol – via orto

2.5.2.4 Aldeído e álcool desidrogenase

Esta enzima é uma nicotinoproteína e não apresenta especificidade de substrato. A álcool desidrogenase catalisa a conversão do substrato cetona para o álcool correspondente, enquanto que a aldeído desidrogenase catalisa a conversão do aldeído para o ácido correspondente (WERF, KEIJZER e SCHAFT, 2000).

As desidrogenases têm a capacidade, na presença de NAD^+ , de oxidar uma variedade de terpenos aldeídos e cetonas (GRIFFITHS et al., 1987). O estudo de WERF, SWARTS e BONT (1999) mostrou que ela é capaz de converter o limoneno 1,2 diol em 1 hidroxí-2-oxolimoneno.

PAPPAS et al., (2003), em seu trabalho, mostraram que a atividade da enzima aldeído desidrogenase pode ser induzida por hidrocarboneto aromático policíclico, especialmente pelo composto benzo[a]pireno.

Em outro trabalho, o álcool perílico foi rapidamente metabolizado em ratos para ácido perílico. A oxidação de álcool para ácido perílico envolve aldeído perílico como intermediário. Aldeído perílico pode ser oxidado por aldeído desidrogenase para ácido perílico e reduzido por álcool desidrogenase para álcool perílico (BOON, BOON e MULDER, 2000).

2.6 Biosurfactantes

Os biosurfactantes são definidos como uma molécula de superfície ativa produzida por células vivas. Os surfactantes são substâncias que apresentam ambas regiões: hidrofílica e hidrofóbica. Por isso, eles se acumulam na interface e mediam entre as fases de diferentes polaridades, tais como, água/óleo ou óleo/água, agindo como agente umectante. Este processo é baseado na

capacidade do surfactante de reduzir a tensão superficial e a energia requerida para formar emulsões (FIECHTER, 1992).

Muitos são os organismos que produzem surfactantes, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. O princípio fisiológico dos surfactantes é permitir o crescimento dos microrganismos nos substratos imiscíveis em água, pela redução da tensão superficial, tornando o substrato mais viável à degradação e ao metabolismo (FIECHTER, 1992).

A baixa solubilidade dos hidrocarbonos, como é o caso do *d*-limoneno, em água torna essencial para os microrganismos incorporarem estes substratos por contato direto ou por pseudosolubilização antes que seu crescimento possa ocorrer. Muitos microrganismos que degradam hidrocarbonos produzem agentes emulsificantes extracelulares (CARVALHO, MARCHI e DURRANT, 1998).

Quando estimulados, os microrganismos que produzem biosurfactantes podem auxiliar na biorremediação de solos contaminados por óleos, de contaminantes hidrocarbonos no meio ambiente e podem estimular a biodegradação de óleos e gorduras presentes em efluentes produzidos por várias indústrias alimentícias (CARVALHO, MARCHI e DURRANT, 1998). A presença de surfactantes já foi observada em microrganismos tais como *Pseudomonas* (IQBAL, KHALLID e MALIK, 1995).

2.7 Tratamento de efluente na indústria de laranja

Nas últimas décadas, uma grande variedade de compostos, chamados xenobióticos, foi introduzida no meio ambiente. Estes compostos são geralmente resistentes à biodegradação. Os efluentes industriais contêm grande concentração de compostos orgânicos recalcitrantes, que podem ser tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos. Estes efluentes são, na maioria das vezes, tratados por processos físico-químicos e descartados nas plantas de tratamento de efluentes municipais. Os microrganismos exercem um papel importante no tratamento de efluentes, pois são capazes de degradar muitos dos compostos recalcitrantes (HARDMAN, 1987).

O grau de poluição depende do tipo e da quantidade dos poluentes liberados no meio ambiente. No processamento de frutas cítricas, muitos produtos liberados durante o processamento são de baixo valor e, geralmente, devem ser

removidos. Estes materiais podem ser classificados como sólidos, líquidos, gasosos ou efluentes perigosos. O efluente líquido ou aquoso é o primeiro que sai do processamento de frutas e pode ser constituído de 4 contaminantes: sólidos suspensos (polpa da fruta), orgânicos solúveis (açúcar e álcool), inorgânicos solúveis (soda cáustica) e orgânicos voláteis (*d*-limoneno do óleo da casca) (KIMBALL, 1991; HEERDEN et al., 2002).

Um dos métodos mais utilizados para tratamento destes efluentes é o tratamento aeróbio. Neste tratamento é importante monitorar a concentração de *d*-limoneno, uma vez que este pode afetar a atividade aeróbia dos microrganismos. Portanto, os efluentes de lagoas aeradas devem apresentar no máximo 0,005% de *d*-limoneno. Outro método para tratamento dos efluentes cítricos é o anaeróbio, mas não é uma prática comum, devido ao grande efeito tóxico do óleo da casca sobre as bactérias anaeróbias (KIMBALL, 1991).

Na indústria de suco de laranja, o processo mais utilizado no tratamento de efluente é o lodo ativado, que consiste, essencialmente, de um tratamento aeróbio que oxida matéria orgânica em CO₂, H₂O e NH₄ e nova biomassa celular. Através dele, o efluente é misturado, agitado e separado por meio de decantação. O lodo ativado recircula ao tanque de aeração ou é descartado para o tanque de lodos (Figura 10). O processo pode ser considerado similar a uma autodepuração, com a diferença de que os organismos responsáveis pela depuração se encontram em quantidade imensa, concentrados em um espaço reduzido. Por meio da aeração artificial consegue-se introduzir oxigênio, em quantidade suficiente para a sobrevivência dos microrganismos, apesar de sua aglomeração, devido à pequena área. Em pesquisa realizada pela Agência de Proteção Ambiental, pode constatar-se que 90% da massa do *d*-limoneno que entra na linha de tratamento de efluente é degradado em outros compostos por ação dos microrganismos (ALVAREZ et al., 1999).

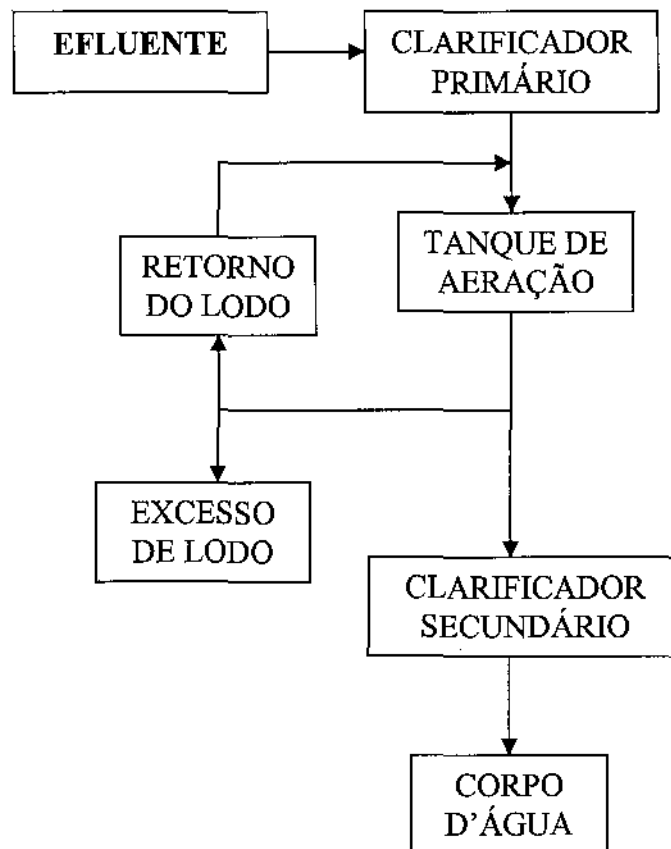


Figura 10: Sistema Convencional de Lodo Ativado.

O fluxograma geral da linha de tratamento de efluente da fábrica onde foi retirado o efluente utilizado neste estudo, está representado na Figura 11. A calha correspondente ao local onde se concentra toda a água que sai da fábrica (lavagem de equipamentos, de matérias-primas, do chão da fábrica), se junta aos outros resíduos da indústria, inclusive aos da fábrica de ração, formando o que se chama de água preta, que seria o clarificador primário. Antes do efluente entrar na lagoa de aeração, onde ocorre a biodegradação propriamente dita, o pH é corrigido com NaOH, uma vez que o pH do efluente cítrico gera em torno de 3,5 e as bactérias sobrevivem em pH neutro. Na saída do decantador (lagoa de aeração) ocorre o tratamento aeróbio com a degradação da matéria orgânica. Por fim, na Lagoa de Polimento (clarificador secundário) ocorre a decantação dos sólidos residuais e o efluente já tratado é destinado ao rio ou para outro corpo d'água.

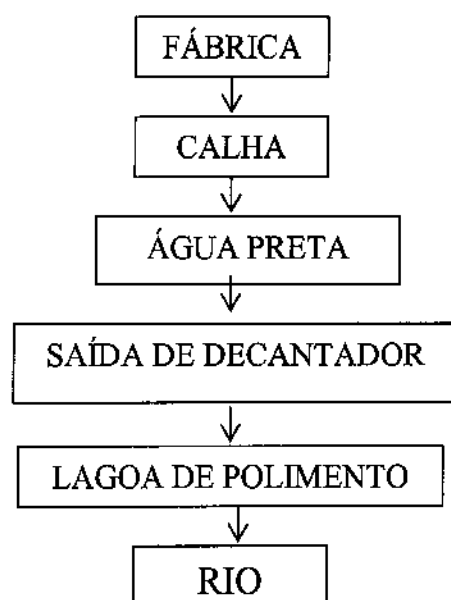
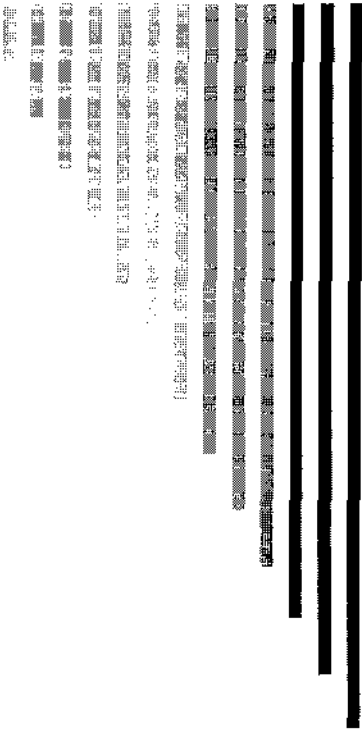


Figura 11: Fluxograma geral da linha de tratamento de efluentes da indústria cítrica.

OBJETIVOS

- Isolar microrganismos a partir de efluentes produzidos pela indústria cítrica;
- Selecionar microrganismos isolados através da capacidade de degradar *d*-limoneno;
- Verificar a capacidade dos fungos ligninolíticos de degradar *d*-limoneno e selecionar as melhores linhagens;
- Determinar a capacidade das linhagens selecionadas de degradar o *d*-limoneno quando presente em altas concentrações;
- Determinar a eficiência das linhagens selecionadas no tratamento do efluente da indústria cítrica;
- Identificar as linhagens selecionadas capazes de degradarem as mais altas concentrações de *d*-limoneno.



MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do efluente

O efluente utilizado neste trabalho foi coletado de uma indústria que fabrica suco de laranja e ração com os subprodutos da mesma, situada na cidade de Araras, estado de São Paulo, cujo sistema de tratamento de efluentes é o lodo ativado. A coleta do efluente foi realizada durante o período de safra, quando a laranja é processada a suco, geralmente, durante os meses de junho a fevereiro. Foram realizadas no total 6 coletas do efluente para isolamento dos microrganismos em 4 diferentes pontos do processo de tratamento de efluente: Calha (C); Água Preta (AP); Saída do Decantador (SD) e Lagoa de Polimento (LP). As amostras foram coletadas em frascos de plásticos (polietileno), devidamente lavados e esterilizados, sendo estes abertos somente no momento da coleta. Após a coleta, os frascos foram transportados imediatamente ao Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (UNICAMP) em caixas de isopor, sendo que o plaqueamento para o isolamento dos microrganismos foi realizado no mesmo dia.

4.2. Caracterização do efluente da indústria cítrica

A caracterização foi realizada periodicamente, uma vez que é importante para o conhecimento do tipo de microrganismo existente no meio e sua composição varia de acordo com a qualidade da laranja processada. Os parâmetros analisados foram: *pH*, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais, sólidos suspensos, sólidos dissolvidos. A maioria dos métodos utilizados na caracterização do efluente foi retirada dos Métodos Padrão para Análise de Água e Águas Residuárias aceitos pela "American Public Health Association" (APHA), "American Water Works Association" (AWWA) e "Water Environmental Federation" (WEF), (APHA / AWWA / WEF, 1995) também descritos no manual de procedimentos do espectrofotômetro DR/2010 – HACH.

4.2.1. Determinação de *pH*

Foi utilizado o método potenciométrico, utilizando-se pHmetro Micronal B374. Os efluentes cítricos apresentam *pH* em torno de 3,5. É importante conhecer o valor do *pH*, pois os microrganismos aeróbios usados em lagoas

aeradas, geralmente, crescem em valores próximos da neutralidade, sendo sensíveis à acidez (KIMBALL, 1991).

4.2.2. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

É a quantidade de oxigênio necessária para oxidar quimicamente a matéria orgânica. Este teste utiliza o dicromato de potássio em ácido sulfúrico concentrado fervente, na presença de um catalisador de prata, que atua como poderoso agente oxidante. A determinação foi feita utilizando-se o espectrofotômetro DR/2010 da HACH. Uma alíquota de 1,00mL das amostras foi colocada em frascos HACH previamente adicionados de: 0,04 a 0,05g de HgSO_4 ; 2,50mL de uma solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{AgSO}_4$; 0,30mL de H_2O destilada e 0,50mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Para facilitar a leitura 1,00mL de água destilada foi acrescentado a cada frasco e esta mistura foi colocada em um reator, à temperatura constante de 140°C. Após 2 horas nesta temperatura, os frascos foram retirados e a leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 620nm.

4.2.3. Sólidos totais

“Sólidos totais” é o termo aplicado ao material residual do cadinho de porcelana após a evaporação de uma amostra e sua subsequente secagem a uma temperatura conhecida e controlada. Os sólidos totais incluem os “sólidos suspensos”, ou seja, a porção dos sólidos totais retidos por um filtro e os “sólidos dissolvidos”, ou seja, a porção que passa através do filtro. A determinação de “sólidos totais” foi realizada utilizando-se um volume conhecido de amostra homogeneizada que foi pesado e colocado em um cadinho previamente tarado. A amostra foi evaporada até secar em chapa térmica. Após, a amostra permaneceu por uma hora em estufa a 100°C. O cadinho foi resfriado em dessecador a temperatura ambiente e pesado em balança (APHA / AWWA / WEF, 1995). O cálculo foi realizado do seguinte modo:

Sólidos totais = $\frac{(A-B) \times 1000}{V}$, onde:

V

A = peso do resíduo seco + cadinho (mg)

B = peso do cadinho (mg)

V = volume da amostra

4.2.4. Sólidos suspensos

A amostra homogeneizada foi filtrada em papel de filtro, previamente pesado, e lavada 3 vezes sucessivas com água grau Milli Q. O filtro foi secado em estufa a 103-105°C por 24 horas. Após, o filtro foi resfriado em dessecador a temperatura ambiente e pesado até obtenção do peso constante. Após pesagem, por diferença de peso foi calculado o total de sólidos suspensos, utilizando-se o cálculo (APHA / AWWA / WEF, 1995):

Sólidos totais = $\frac{(A-B) \times 1000}{V}$, onde:

V

A = peso do resíduo seco + filtro (mg)

B = peso do filtro (mg)

V = volume da amostra

4.2.5. Sólidos Dissolvidos

A amostra filtrada em 4.2.4 foi evaporada até secar em cadinho de porcelana previamente pesado. Após, os cadinhos foram colocados em estufa a 100°C, retirados e resfriados em dessecador até temperatura ambiente. A pesagem foi realizada até obtenção do peso constante e por diferença de peso foi calculado o total de sólidos dissolvidos (APHA / AWWA / WEF, 1995), utilizando-se o cálculo:

Sólidos totais = $\frac{(A-B) \times 1000}{V}$, onde:

V

A = peso do resíduo seco + cadinho (mg)

B = peso do cadinho (mg)

V = volume da amostra

4.3. Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram isolados de amostras de efluente da indústria de suco de laranja (Calha) e da própria lagoa de tratamento de efluente (Água Preta, Saída do Decantador e Lagoa de Polimento), conforme descrito no item 4.4. Também foram utilizados fungos ligninolíticos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana

da FEA/UNICAMP com comprovada atividade degradativa de poluentes, tais como, fenóis, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, azocorantes e outros compostos aromáticos.

4.4. Isolamento dos microrganismos

Os microrganismos presentes no efluente e na lagoa de tratamento foram isolados por plaqueamento em meio PCA (Plate Count Agar). O efluente foi inoculado por plaqueamento em superfície nas seguintes diluições: 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} , conforme ilustrado na Figura 12. As placas foram incubadas a temperatura de 30 e 37°C. A escolha dos microrganismos foi realizada de acordo com as características morfológicas das colônias (cor, tamanho e forma), sendo que colônias com características morfológicas semelhantes e crescidas na mesma placa foram desprezadas. Após crescimento, os fungos filamentosos foram diferenciados das bactérias e leveduras pelas características macroscópicas das colônias. Para os demais microrganismos, foi realizada a Coloração de Gram para identificar a estrutura morfológica dos mesmos, separando-os em leveduras e bactérias dos tipos cocos Gram-negativos, cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos e bacilos Gram-positivos. Os microrganismos isolados foram repicados em tubos de ensaio contendo meio NA (Nutrient Agar), quando se tratava de bactéria e meio PDA (Potato Dextrose Agar), quando se tratava de fungo filamentoso ou levedura. Após isolamento, estes microrganismos foram pré-selecionados quanto à sua capacidade de crescer em meio contendo *d*-limoneno como única fonte de carbono e as melhores linhagens foram selecionadas quanto à sua capacidade de degradar o monoterpeneo.

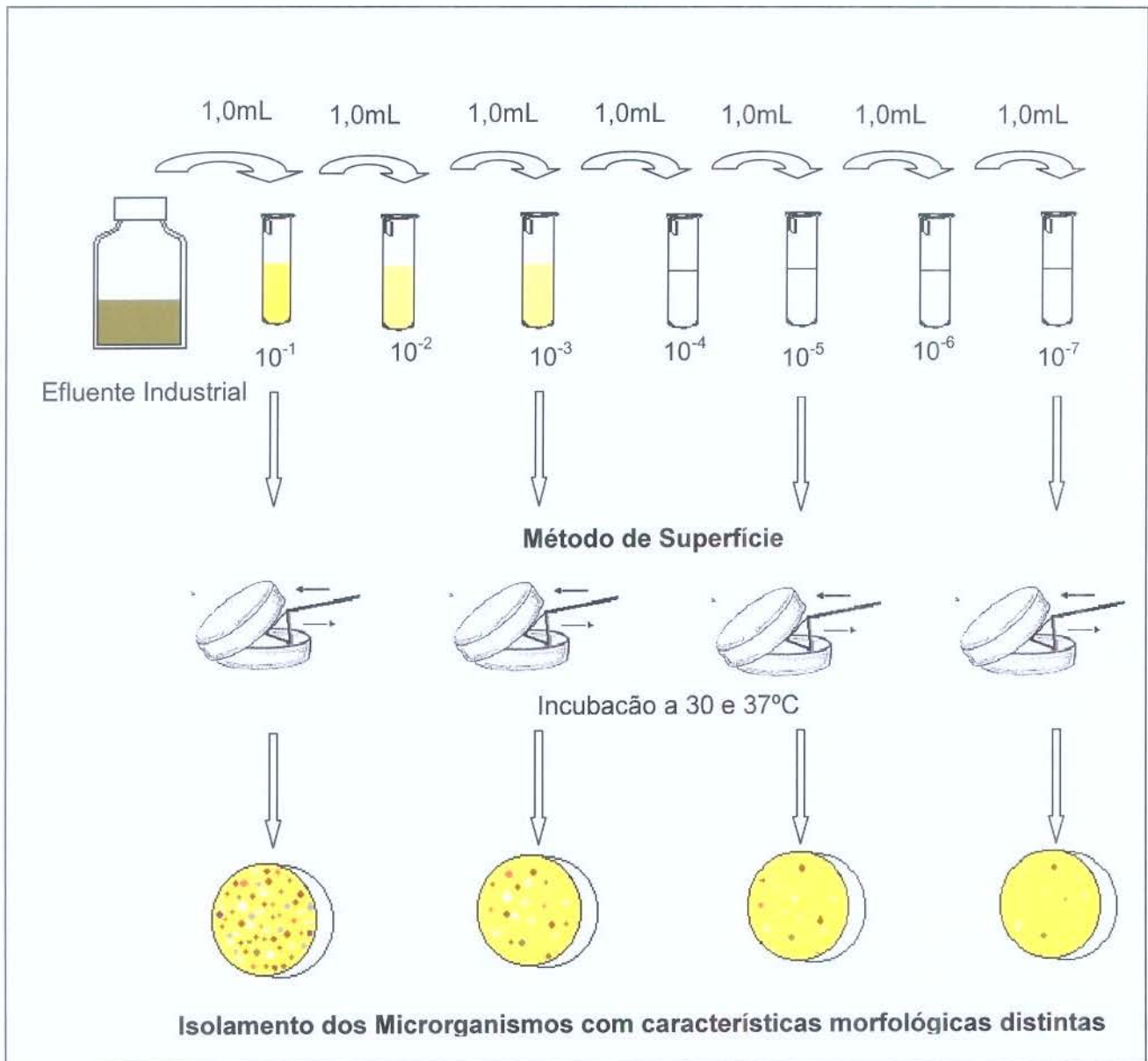


Figura 12: Metodologia de isolamento dos microrganismos a partir do efluente industrial.

4.5. Pré-seleção dos microrganismos

4.5.1 Condição de cultivo

Esta primeira etapa da pré-seleção dos microrganismos foi feita utilizando-se meio enriquecido de sais minerais e *d*-limoneno como única fonte de carbono, contendo (por litro): 0,5g de fosfato de amônia dibásico; 0,8g de fosfato de potássio monobásico; 0,3g de sulfato de magnésio; 4,0mg de sulfato de zinco; 5,0mg de sulfato de manganês; 0,1g de cloreto de cálcio; 0,2g de extrato de levedura; 2,0mg de cloreto de cobalto e 1,0mg de sulfato de ferro hexahidratado. Após esterilização, foram adicionados 0,5mL de solução de tiamina (concentração 10mg/mL), esterilizada por filtração. No caso das bactérias, a pré-seleção foi realizada inoculando-se uma alçada de células em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de sais minerais a pH 7,0 e o *d*-limoneno, na concentração de 5,0%. Para pré-seleção dos fungos, tanto isolados do efluente industrial, como fungos ligninolíticos, foram utilizados frascos Erlenmeyer (125mL) contendo 20mL do meio de sais a pH 5,0 e o *d*-limoneno, também na concentração de 5,0%, inoculados com 5 quadrados de 1,0cm x 1,0cm de ágar-micélio, retirados de placas contendo meio de extrato de malte com crescimento micelial total. Os tubos de ensaio e os Erlenmeyer foram incubados na temperatura de crescimento (30 e 37°C) que foi utilizada para o isolamento de cada microrganismo e aqueles que apresentaram um bom crescimento visual foram selecionados e testados no tratamento de efluente da indústria de suco de laranja. Como controle abiótico, foram utilizados frascos Erlenmeyers e tubos de ensaio contendo o meio de sais minerais e o de *d*-limoneno na concentração de 5,0%, sem inóculo.

4.5.2 Avaliação visual do crescimento

Esta primeira pré-seleção foi feita apenas por avaliação visual, sendo que os microrganismos que apresentaram um bom crescimento foram selecionados e utilizados na segunda pré-seleção. O crescimento foi observado pela turbidez do meio de cultura e a emulsificação do *d*-limoneno, que se encontra na parte superior do meio, uma vez que este é imiscível em água. O crescimento foi observado da seguinte maneira, segundo ASTM (1990) e PAVARINA (2002):

- = ausência de crescimento;

+ = pouco crescimento, pouca turvação e não emulsificação do *d*-limoneno;

++ = moderado crescimento, turvação e pouca emulsificação do *d*-limoneno;

+++ = ótimo crescimento, bastante turvação e emulsificação do *d*-limoneno.

4.5.3. Determinação da porcentagem de degradação do *d*-limoneno por CLAE

Os microrganismos pré-selecionados de acordo com os resultados obtidos no item 4.5.2 foram crescidos novamente conforme descrito no item 4.5.1 e após o período de incubação, foi determinada a porcentagem de degradação do monoterpeno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os microrganismos que apresentaram maiores porcentagens de degradação do monoterpeno foram selecionados para os próximos estudos, segundo itens 4.6.1 e 4.6.2.

4.6. Seleção dos microrganismos

A seleção foi feita através do crescimento dos microrganismos pré-selecionados em meio de sais minerais contendo o *d*-limoneno em diferentes concentrações, diferentes dias de crescimento e diferentes condições de cultivo. Foram selecionados os microrganismos capazes de crescerem em menor período de tempo utilizando a maior concentração de *d*-limoneno como fonte de carbono.

4.6.1. Avaliação do crescimento em diferentes concentrações de *d*-limoneno

O crescimento dos microrganismos foi realizado em meio contendo sais minerais e o *d*-limoneno nas seguintes concentrações (v/v) 1, 3, 5 e 7 % por 5 dias, nas condições de cultivo estacionária e sob agitação, em shaker a 150 rpm. Os microrganismos foram incubados na temperatura utilizada no isolamento. Após o crescimento, as amostras foram centrifugadas, filtradas de acordo com o item 4.10.1 e com o caldo obtido foram determinadas as atividades enzimáticas e a produção de biosurfactante, conforme descrito nos itens 4.10 e 4.11. Foi determinada também a porcentagem de degradação do *d*-limoneno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), descrita conforme item 4.12.

4.6.2. Avaliação do tempo de crescimento na degradação do *d*-limoneno

Os microrganismos foram crescidos em meio contendo sais minerais e o *d*-limoneno como fonte de carbono, na concentração (v/v) selecionada em 4.6.1 (3 e 5%) por 1, 3, 5 e 7 dias, sob condições estacionária e com agitação, em shaker a 150 rpm. Os microrganismos foram incubados na temperatura utilizada no isolamento. Após o crescimento foram determinadas as atividades enzimáticas, a produção de biosurfactantes e a porcentagem de degradação do *d*-limoneno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme metodologias descritas nos itens 4.10; 4.11; 4.12.

4.7. Identificação

Foram identificados os gêneros dos 3 melhores microrganismos capazes de degradar altas concentrações do *d*-limoneno, selecionados nos itens 4.6.1 e 4.6.2.

As bactérias foram identificadas através da morfologia (cocos ou bacilos), coloração diferencial (Gram-positivas e Gram-negativas) e testes bioquímicos. A série bioquímica foi efetuada de acordo com o *Bergey's Manual*, para microrganismo Gram-negativo, utilizando-se os seguintes testes: produção das enzimas catalase e oxidase; teste do KOH (hidróxido de potássio); utilização do citrato; teste do ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranósideo); fermentação de açúcares (glicose, lactose, sacarose); produção de gás; produção de H₂S (sulfeto de hidrogênio); hidrólise da esculina; teste de Vermelho de Metila / Voges-Proskauer; produção de Indol; teste do OF (oxidação/ fermentação); hidrólise da gelatina; teste de motilidade; hidrólise da uréia; redução do nitrato; fermentação do sorbitol; crescimento em placas contendo os meios: *Pseudomonas* Agar F (PAF), Agar Mac Conkey (MC), Agar Salmonella Shigella (SSA) e Agar Eosina Azul de Metileno (EMB).

O fungo foi identificado através de morfologia macroscópica da colônia crescida em placa e observação microscópica do corpo de frutificação durante os estágios sexuais ou assexuais do seu ciclo de vida. Para observação microscópica foi utilizada a técnica de microcultivo, que consiste em cultivar o microrganismo num meio em que o mesmo esteja adaptado, sob lamínulas de vidro. Após crescimento esta lamínula foi retirada cuidadosamente para que não ocorresse a

destruição das estruturas de reprodução do fungo. A lamínula foi colocada sobre uma gota de lactofenol azul de algodão, depositada numa lâmina de microscópio e as estruturas do microrganismo foram observadas ao microscópio óptico no aumento de 40X.

4.8 Crescimento dos microrganismos selecionados no efluente industrial

Os microrganismos selecionados e identificados foram inoculados no efluente obtido da indústria de suco de laranja. Foi adicionado o *d*-limoneno ao efluente industrial, na concentração selecionada nos experimentos anteriores (3%). Foram utilizados frascos Erlenmeyers de 125mL, previamente esterilizados, contendo 20mL de efluente previamente esterilizados e sem prévia esterilização. Após inoculação, os frascos foram incubados na temperatura de crescimento que foi utilizada para o isolamento de cada microrganismo, por 3 e 5 dias. Os efluentes utilizados foram coletados dos mesmos locais daqueles utilizados para o isolamento dos microrganismos.

O controle abiótico foi feito utilizando frascos contendo efluente industrial, sem inóculo, nas mesmas condições de cultivo das amostras.

4.9 Efeito da toxicidade do *d*-limoneno aos microrganismos selecionados

4.9.1. Determinação do crescimento bacteriano

Este estudo foi realizado através da medida de turbidez do meio de cultura. As linhagens foram crescidas em meio contendo caldo LB (Luria Betani - Bactotripton, extrato de levedura, NaCl) sem o monoterpeno e com concentrações de *d*-limoneno de 1,0 a 10,0% (v/v), por 10 dias. O crescimento foi determinado, diariamente, através da medida da turbidez em espectrofotômetro, a 550nm, através da comparação com o controle abiótico. A concentração em que os microrganismos obtiveram o máximo crescimento foi determinado através da curva utilizando absorbância x concentração (CHANG e ORIEL, 1994).

4.9.2. Determinação do crescimento fúngico

O efeito do *d*-limoneno sobre o crescimento dos fungos e produção de sua biomassa foi estudado por determinação da massa micelial seca produzida por cada microrganismo. Os fungos foram incubados em Erlenmeyers contendo meio de sais minerais e o *d*-limoneno, nas diferentes concentrações e tempos de crescimento em estudo e após o período de incubação foram filtrados através de lã de vidro previamente pesada. As lãs de vidro foram colocadas em estufa a 100°C por 24 horas, pesadas e por diferença de peso foi calculada a massa seca para cada fungo.

Para cada microrganismo foi feito um controle, contendo meio de sais e inóculo, sem a adição de fonte de carbono, para se calcular o crescimento total de cada microrganismo.

4.10 Determinações enzimáticas

A atividade das enzimas descritas abaixo foi determinada para o conhecimento do sistema enzimático utilizado por cada linhagem.

4.10.1 Enzimas extracelulares

Após crescimento dos microrganismos, as culturas foram centrifugadas a 27670 x g durante 15 minutos (5°C) e no sobrenadante foram determinadas as seguintes atividades enzimáticas, a partir do cálculo da diferença de absorbâncias, medidas em espectrofotômetro:

4.10.1.1 Lacase

A atividade da lacase foi determinada através da oxidação da siringaldazina (0,1%) como substrato enzimático, segundo HERRERA (1995). A mistura da reação continha 0,6 mL de sobrenadante; 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 mol.L⁻¹ (pH 5,0); 0,1 mL de siringaldazina (0,1% em etanol); 0,1 mL de água destilada.

A oxidação de siringaldazina até sua forma quinona foi acompanhada durante 10 minutos a 525 nm.

4.10.1.2 Peroxidase

A atividade de peroxidase foi determinada, na presença de H_2O_2 , através da oxidação da siringaldazina (0,1%) como substrato enzimático até a forma quinona, segundo HERRERA (1995) sendo monitorada a 525nm. A mistura da reação continha 0,6 mL de sobrenadante; 0,2 mL de tampão citrato-fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 5,0); 0,1 mL de siringaldazina (0,1% em etanol); 0,1 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$.

4.10.1.3 Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade da lignina peroxidase foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico (TIEN e KIRK, 1983). A mistura da reação continha 0,6 mL do sobrenadante; 0,2 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$; 0,2 mL de álcool veratrílico $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em tampão tartarato de sódio $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 3,0).

A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância à 310 nm.

4.10.1.4 Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade da MnP foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol, na presença de manganês e H_2O_2 (KUMAKARA et al., 1984). A mistura da reação continha 0,5 mL do sobrenadante; 0,1 mL de lactato de sódio $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$; 0,05 mL de MnSO_4 $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$; 0,2 mL de albumina bovina 0,5%; 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%; 0,05 de H_2O_2 em tampão succinato de sódio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 4,5).

A mistura foi incubada a 30°C por 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 N. A absorbância foi lida em 610 nm.

4.10.2 Extração e determinação de enzimas intracelulares

A partir das células, obtidas após centrifugação, foi realizada a extração das enzimas intracelulares de acordo com o método de BALAJEE e MAHADEVAN (1987), descrito abaixo:

- O extrato celular foi lavado duas vezes, com tampão fosfato 0,025M, pH 7,0, a $27670 \times g$ durante 10 minutos a 5°C ;

- Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o extrato celular ressuscitado no mesmo tampão e homogeneizado com bastão de vidro (macerando o extrato com o tampão);
- Após maceração, o mesmo foi sonificado em Sonifer 250 Branson, durante 5 minutos;
- A amostra foi, então, centrifugada a 35541 x g durante 60 minutos a 5°C; e o sobrenadante resultante foi utilizado para determinação das enzimas intracelulares.

4.10.2.1 Catecol 1,2 dioxigenase

Esta atividade foi determinada utilizando-se o catecol como substrato enzimático, a 290nm. A mistura da reação continha 1mL de catecol, 0,2mL de EDTA (etilenodiaminotetraacetato), 0,8mL de tampão fosfato (pH 7,5) e 1mL do extrato celular (HEGEMAN, 1966).

4.10.2.2 Catecol 2,3 dioxigenase

A atividade foi determinada pela medida da quantidade de produto formado a partir da quebra do catecol, a 375nm. A mistura da reação continha 1,0mL de catecol, 1,0mL de tampão fosfato (pH 7,5) e 1,0mL do extrato celular (BAGGI *et. al.*, 1987).

4.10.2.3 Protocatecol 3,4 dioxigenase

A atividade foi determinada de acordo com o método de FUJISAWA e HAYAISHI (1968) modificado, sendo monitorada a 290nm. A mistura de reação continha 1,0mL de ácido protocatecóico, 1mL de tampão tris-acetato (pH 7,5) e 1,0mL de extrato celular.

4.10.2.4 Aldeído e álcool desidrogenase

Foram determinadas espectrofotometricamente através da formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida (NADH) observado pelo aumento da absorbância a 340nm, a 30°C, na presença de extrato de células, de um tampão, de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e do substrato. A reação inicia-se com a adição do substrato, óxido de α -pineno, pois este substrato é convertido enzimaticamente para um aldeído, que é o substrato da reação

(GRIFFITHS et al., 1987). A mistura da reação continha 0,9mL de tampão fosfato (pH 7,8); 0,1mL de extrato celular, 2μL de óxido de α-pineno e 1μL de NAD⁺ 2M.

4.11 Determinação da produção de biosurfactante

Após centrifugação a 27670 x g, 15 minutos, 5°C, a produção de biosurfactantes foi determinada, utilizando o sobrenadante, através da agitação vigorosa dos tubos contendo 3,5mL da amostra e 2,0mL de hidrocarboneto tolueno em agitador (Vortex). Após uma hora, a densidade óptica da emulsão óleo em água foi medida a 610nm (JOHNSON et al., 1992). A camada da emulsão água em óleo foi determinada após 24 horas, através da medida do tamanho da coluna formada expressa em centímetros (COOPER e GOLDENBERG, 1987).

4.12 Determinação da degradação e/ou bioconversão do *d*-limoneno por microrganismos selecionados

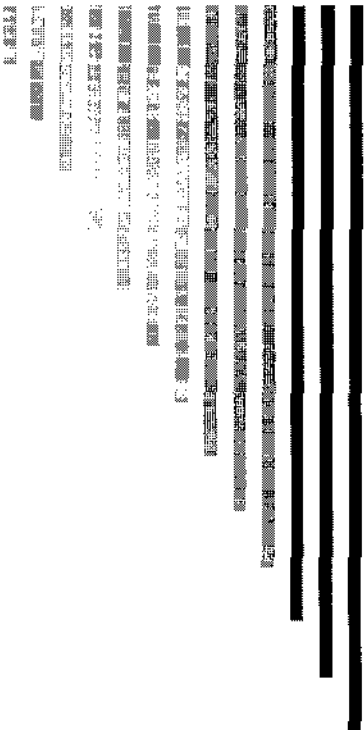
4.12.1 Extração do *d*-limoneno

O *d*-limoneno foi extraído por 3 vezes, utilizando-se 10 mL de éter etílico. A fração etérea foi evaporada em rota-evaporador e ressuspensa em 20mL de éter etílico (CHANG e ORIEL, 1994, modificado). As amostras foram filtradas em membranas Millipore (0,22μm) e injetadas no cromatógrafo.

4.12.2 Análise cromatográfica

A porcentagem de degradação e/ou bioconversão do *d*-limoneno foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando-se cromatógrafo marca Shimadzu, coluna de fase reversa, Zorbax C18, com dimensões de 15cm x 4,5mm d.e. O volume da amostra injetado foi de 20μL. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (70:30; v/v) e a detecção foi realizada em detector ultravioleta, a 210nm (CHANG e ORIEL, 1994).

O cálculo de degradação do *d*-limoneno foi determinado através da comparação da porcentagem em área do volume do controle com a porcentagem em área das amostras, sendo o controle obtido através da incubação dos meios de cultura, sem inóculo, nas mesmas condições das amostras.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do efluente

Foram realizadas 4 caracterizações do efluente coletado em uma indústria de suco de laranja em diferentes pontos de sua estação de tratamento de efluente. A caracterização foi realizada durante o período de safra da laranja, uma vez que sua qualidade se modifica de acordo com a época do ano, modificando, assim, a composição do efluente aquoso. Para caracterizar o efluente, 5 parâmetros foram monitorados regularmente: pH, sólidos suspensos, sólidos dissolvidos, sólidos totais e DQO.

Na Tabela 1, observam-se os resultados obtidos das determinações de pH do efluente industrial, nos diferentes pontos de coleta. O pH de uma amostra nos indica inúmeros fatores que podem estar associados ao crescimento de microrganismos, como: números de metabólitos, atividade microbiana, presença de substratos, etc. Este parâmetro deve ser monitorado, pois as bactérias aeróbias crescem melhor em pH neutro, sendo, em geral, sensíveis à acidez e o pH da laranja é ácido (KIMBALL, 1991). No primeiro ponto da estação de tratamento de efluente que corresponde à Calha, o efluente vem diretamente da fábrica de suco de laranja, não ocorrendo ainda neste ponto a mistura com qualquer outro produto, seja com efluente da fábrica de ração, seja com os microrganismos da lagoa de aeração. Portanto, o pH é mais ácido, uma vez que o pH normal da laranja encontra-se, geralmente, entre 3,0 e 4,0 (KIMBALL, 1991).

Tabela 1: Determinações de pH das amostras de efluente industrial coletadas nos meses de outubro e dezembro de 1999, fevereiro de 2000 e fevereiro de 2001.

Amostras	Período			
	Out./1999	Dez./1999	Fev./2000	Fev./2001
C	5,84	6,79	-	3,72
AP	12,03	6,61	5,84	6,99
SD	7,62	7,75	8,20	7,94
LP	7,30	7,70	7,84	7,75

C = calha; AP = água preta; SD = saída do sedimento; LP = lagoa de polimento

HEERDEN et al. (2002), em seu trabalho sobre efluente da indústria cítrica, encontraram o valor de pH igual a 4,1, no mesmo ponto que corresponde à calha. No ponto água preta (AP) ocorre a mistura entre o efluente da indústria de suco de laranja e o da fábrica de ração, por isso, o pH é, em geral, mais alto que a amostra retirada da calha (C). No ponto saída do decantador (SD), que corresponde à Lagoa de Aeração, o pH é mais alto, próximo da neutralidade, porque antes do efluente passar para esta fase ocorre sua neutralização com a adição de hidróxido de sódio. Na última fase do tratamento do efluente, na lagoa de polimento (LP), o pH continua em torno da neutralidade, o que é ideal, pois a partir deste ponto o efluente é descartado para o rio.

Através dos resultados da Tabela 1, pode-se notar ainda uma diferença entre os resultados obtidos nas 4 caracterizações realizadas. Esta diferença deve-se a mudanças sazonais que se refletem na qualidade e no tipo da laranja. Isto pode ser observado, principalmente, no ponto calha e água preta. No ponto calha, o maior pH ocorreu no mês de dezembro de 1999 (pH 6,79) e o menor em fevereiro de 2001 (pH 3,79), provavelmente, porque a qualidade da laranja utilizada nos 2 anos foi diferente. O mesmo se observa no ponto AP, onde o valor do pH variou bastante com o período e com o ano da coleta, sendo o maior valor encontrado em Outubro de 1999 (pH 12,03) e o menor em fevereiro de 2000 (pH 5,84). Isto se deve, provavelmente, ao efluente vindo da fábrica de ração, em sua maioria, resíduo da casca da laranja. Ao contrário, nos pontos SD e LP, os valores de pH não se modificaram em função da época da coleta. Os resultados obtidos são explicados pelo fato de que o pH do efluente é corrigido antes da entrada da Lagoa de Aeração que, no tratamento aeróbio da indústria em estudo, corresponde à etapa anterior aos pontos SD e LP. Em fevereiro de 2000, não foi determinado o pH no ponto Calha, pois a indústria não estava em funcionamento.

Outro parâmetro importante a ser determinado no tratamento aeróbio é a quantidade de sólidos solúveis, suspensos e totais. Na estação de tratamento de efluente da indústria de suco de laranja, os sólidos suspensos correspondem à polpa da laranja, enquanto que os sólidos dissolvidos ou solúveis podem ser divididos em orgânicos (açúcar e álcool) e inorgânicos (soda cáustica). Os sólidos

totais seriam a mistura dos sólidos suspensos e sólidos dissolvidos (KIMBALL, 1991). No tratamento de efluente a quantidade de sólidos deve ser monitorada, principalmente, a de solúveis, pois estes se aderem à membrana celular das bactérias, tornando-as mais densas que o efluente. Com isto, elas se sedimentam e são removidas junto com o excesso de lodo, deixando de exercer o seu papel na biodegradação da matéria orgânica, afetando, assim, a clarificação do lodo (KIMBALL, 1991).

Na Tabela 2, encontram-se os resultados obtidos das determinações de sólidos suspensos, dissolvidos e totais nos diferentes pontos da estação de tratamento de efluente. O ponto calha apresentou a menor quantidade de sólidos, pois corresponde somente ao resíduo da laranja e à água de lavagem da fábrica. A quantidade de sólidos totais encontrada foi a mesma em todas as determinações realizadas, nos diferentes meses e anos. No ponto AP, se junta o resíduo da fábrica de ração, por isso, a quantidade de sólidos totais aumentou. A maior quantidade de sólidos foi determinada no ponto SD, ou seja, na Lagoa de aeração, pois neste ponto além da matéria orgânica também existe uma grande quantidade de microrganismos, uma vez que corresponde ao local da biodegradação do resíduo industrial. O ponto com menor concentração de sólidos foi a lagoa de polimento (LP), onde ocorre a última decantação do efluente, isto é, os sólidos totais e microrganismos decantam para o fundo da lagoa, antes de serem descartados para algum "corpo d'água".

Tabela 2: Determinação de Sólidos Suspensos, Dissolvidos e Totais das amostras de efluente industrial coletadas nos meses de outubro e dezembro de 1999, fevereiro de 2000 e fevereiro de 2001.

Amostras	Sólidos Suspensos (mg.L⁻¹)	Sólidos Solúveis (mg.L⁻¹)	Sólidos Totais (mg.L⁻¹)
Outubro/ 1999			
C	57	57	140
AP	75	56	130
SD	210	120	330
LP	56	67	120
Dezembro/1999			
C	21	120	140
AP	54	82	100
SD	310	200	490
LP	120	42	170
Fevereiro/2000			
C	-	-	-
AP	62	500	570
SD	100	490	590
LP	130	540	680
Fevereiro/2001			
C	82	54	140
AP	90	240	340
SD	110	104	210
LP	150	110	250

C = calha; AP = água preta; SD = saída do sedimento; LP = lagoa de polimento

O acompanhamento da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) é uma das análises mais importantes para se determinar a eficiência do sistema de tratamento adequado. Embora, os valores de DBO determinem a quantidade de oxigênio necessária para degradação do efluente, a análise consome muito tempo, em torno de 5 dias. Um método mais rápido, mas indireto, para estimar a

DBO é a Demanda Química de Oxigênio (DQO) que é determinada em, aproximadamente, 3 horas (KIMBALL, 1991).

A Tabela 3 mostra os resultados da determinação de DQO nos quatro pontos da estação de tratamento estudado. De acordo com a Tabela, observa-se que na amostra coletada na Calha (C), a quantidade de matéria orgânica foi baixa, portanto a quantidade de oxigênio gasta para degradá-la também foi pequena. A maior quantidade de DQO foi encontrada no ponto AP, no mês de dezembro de 1999. Isto ocorreu porque as amostras foram coletadas no início do tratamento do efluente e como os microrganismos ainda não atuaram sobre esta, a quantidade de matéria orgânica é maior do que a do final do tratamento e, por isso, a DQO foi alta. No ponto SD, a quantidade de DQO ainda é alta, porque nesta fase os microrganismos estão em plena atividade e a quantidade de oxigênio gasta também é alta. Já nas amostras coletadas na lagoa de polimento, a DQO foi menor, porque esta é a última etapa do tratamento do efluente e a água deve estar livre de matéria orgânica para ser despejada no Rio. Como nesta fase, o crescimento e metabolismo das bactérias são baixos, a DQO determinada também foi baixa.

TABELA 3: Determinação de DQO ($\text{mg.L}^{-1}\text{O}_2$) das amostras de efluente industrial coletadas nos meses de outubro e dezembro de 1999, fevereiro de 2000 e fevereiro de 2001.

Amostras	Período			
	Out./1999	Dez./1999	Fev./2000	Fev./2001
C	578	2080	-	330
AP	6175	7750	2920	2450
SD	4100	3000	3500	1900
LP	430	1460	780	360

C = calha; AP = água preta; SD = saída do sedimento; LP = lagoa de polimento

5.2 Isolamento dos microrganismos

No tratamento de efluente, microrganismos aeróbios são capazes de degradar a matéria orgânica sem produção de odores desagradáveis. Por esta razão, lagoas aeradas são usadas para induzir o crescimento de microrganismos aeróbios, ao invés dos anaeróbios (KIMBALL, 1991, AMARAL et al., 1998). Neste trabalho, microrganismos aeróbios foram isolados do efluente industrial e da Estação de Tratamento de Efluente (ETE), por esgotamento em placa, utilizando-se o método de superfície. Uma vez que, o total de bactérias aeróbias contidas no lodo pode chegar a 10^8 UFC/mL (KIMBALL, 1991), o isolamento de todas elas tornaria este estudo inviável, por isso, a escolha dos microrganismos em placa foi feita de acordo com o item 4.4.

A Tabela 4 indica o número de microrganismos isolados em 6 coletas realizadas ao longo do estudo. Observa-se que foram isolados 572 microrganismos com características morfológicas diferentes, entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos, com maior predomínio de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas do que de fungos.

Tabela 4: Microrganismos isolados do efluente industrial e da ETE em 6 coletas realizadas entre Dezembro de 1998 e Fevereiro de 2001.

Período/ ano	Microrganismos			
	Bactérias	Leveduras	Fungos Filamentosos	TOTAL
Dezembro/1998	86	2	6	94
Agosto/ 1999	97	6	3	106
Outubro/ 1999	87	1	2	90
Dezembro/1999	80	3	9	92
Fevereiro/2000	88	6	1	95
Fevereiro/2001	85	4	6	95
TOTAL	523	22	27	572

Neste trabalho a quantidade de fungos filamentosos isolados foi pequena e isto, provavelmente, ocorreu devido às condições de pH. Segundo, KIMBALL (1991), o lodo ativado não favorece o crescimento de fungos, pois o pH, em geral, é neutro (6,0-8,0), embora alguns fungos filamentosos possam ser isolados.

A Tabela 5 mostra o número de microrganismos isolados nos diferentes pontos do tratamento do efluente industrial. Através dos resultados nota-se que a maior quantidade de microrganismos foi isolada no ponto saída do sedimento, que representa a Lagoa de Aeração, onde realmente há a maior concentração de microrganismos, principalmente bactérias que atuam na degradação do efluente. No ponto calha, foi isolada a menor quantidade de microrganismos, sendo que os presentes neste ponto, em geral, correspondem aos que estavam presentes na laranja "in natura".

Tabela 5: Linhagens de microrganismos isoladas do efluente industrial e dos diferentes pontos da ETE nas 6 coletas realizadas entre Dezembro de 1998 e Fevereiro 2001.

MO isolados	Pontos do ETE			
	C	AP	SD	LP
Bactérias	69	115	231	108
Leveduras	2	8	4	8
Fungos filamentosos	6	15	3	3
TOTAL	77	138	238	119

C = calha; AP = água preta; SD = saída do sedimento; LP = lagoa de polimento

5.3 Pré-seleção dos microrganismos isolados

5.3.1 Avaliação visual do crescimento microbiano

Nesta primeira etapa, foram estudados os 572 microrganismos isolados do efluente industrial e da ETE e os 56 fungos ligninolíticos já existentes na coleção de cultura do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, num total de 628 microrganismos. A pré-seleção foi feita apenas por avaliação visual do crescimento, isto é, os microrganismos incubados em meio de cultura contendo *d*-

limoneno como única fonte de carbono, foram pré-selecionados pela capacidade de crescerem neste meio, conforme descrito no item 4.5.2.

A Figura 13 exemplifica o teste de avaliação do crescimento dos microrganismos em meio contendo sais minerais mais *d*-limoneno. Na Figura 13-A, observa-se o tubo controle que contém somente o meio de cultura e o *d*-limoneno na parte superior. As Figuras 13-B e 13-C mostram que o crescimento microbiano conferiu turbidez ao meio de cultura e que o *d*-limoneno foi utilizado havendo emulsificação do mesmo.

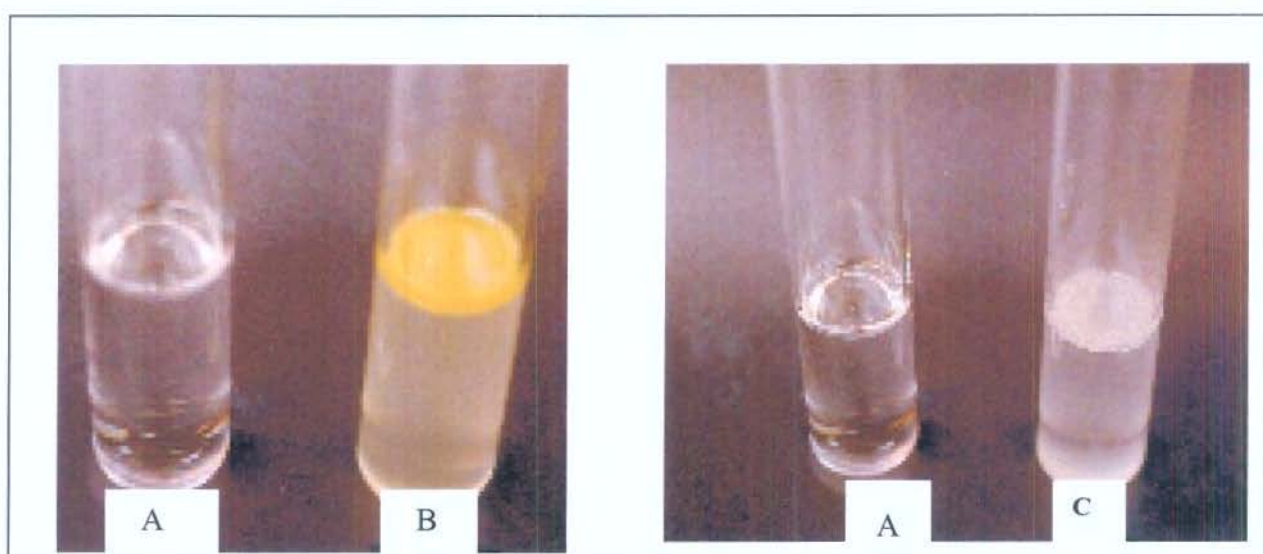


Figura 13: Pré-seleção de bactérias, por crescimento visual, em tubos de ensaio contendo meio de sais minerais e *d*-limoneno, na concentração 5,0% como única fonte de carbono. A = controle; B e C = crescimento de duas linhagens bacterianas.

Posteriormente, tanto fungos como bactérias foram crescidos em placas de Petri contendo meio de sais minerais e o *d*-limoneno como fonte de carbono. Alguns microrganismos apresentaram um halo transparente em volta da colônia, possivelmente formado pela degradação do *d*-limoneno. Na Figura 14, pode-se observar o crescimento de uma bactéria (14-A) e de um fungo filamentoso (14-B) e seus halos de degradação.

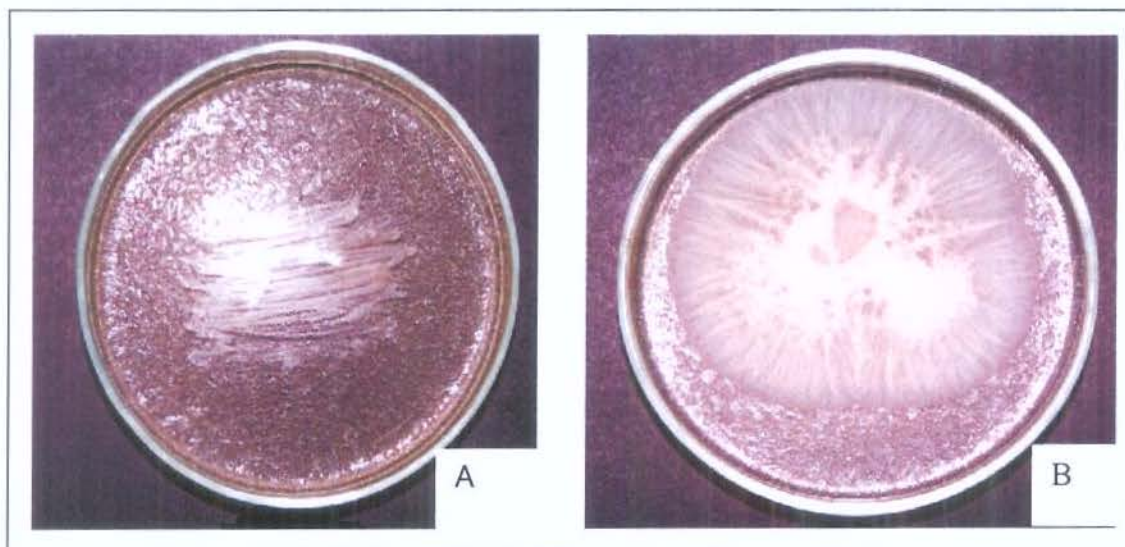


Figura 14: Microrganismos crescidos em placas de Petri, contendo meio de sais minerais e o *d*-limoneno como única fonte de carbono, na concentração de 5%. A = Bactéria; B = fungo filamentoso.

Nesta primeira etapa, foram pré-selecionados 34 bactérias, 18 fungos e 3 leveduras, em um total de 55 microrganismos que foram estudados na etapa posterior, a seguir.

5.5.2 Determinação da porcentagem de degradação do *d*-limoneno por CLAE

Na segunda etapa, os 55 microrganismos pré-selecionados na primeira etapa foram inoculados conforme item 4.5.3.

Na Tabela 6, observa-se a degradação do *d*-limoneno (%) pelas 34 bactérias isoladas do efluente industrial da indústria de suco de laranja, quando cultivadas em meio de cultura contendo 5% de *d*-limoneno.

Tabela 6: Degradação do *d*-limoneno (%) por 34 bactérias isoladas do efluente industrial da indústria de suco de laranja, sob diferentes condições de crescimento, estacionária e com agitação.

Bactérias	% de Degradação do <i>d</i> -limoneno	
	Condição estacionária	Condição agitada (150rpm)
25	8,25	0,0
28B	15,2	0,0
29	0,0	0,0
30	11,5	0,0
36B	0,0	5,42
A 0,1	10,64	0,0
0,1C	30,77	0,0
0,1D	51,0	0,0
AP-1 1	21,10	0,0
AP-1 2	21,88	0,0
AP-1 3	9,54	0,0
AP-1 4	22,30	0,0
AP-1 5	38,46	0,0
AP-1 17	0,0	0,0
C-1 4	4,30	0,0
C-1 5	9,23	18,90
C-1 5 1	22,12	0,0
C-1 8	20,83	22,34
D2	10,45	0,0
LP-1 1	79,80	44,50
LP-1 3	52,46	5,94
LP-1 4	17,18	0,0
LP-1 5	15,50	22,30
LP-1 6	17,70	28,22
LP-1 9	23,10	0,0
LP-3 2	0,0	0,0
LP-3 3	19,90	0,0
SD-1 2	26,53	0,0
SD-1 3	13,87	74,45
SD-1 4	16,89	0,0
SD-1 5	12,54	0,0
SD-3 11	0,0	0,0
SD-3 17	0,0	0,0
SDO I2	27,10	18,27

Os resultados obtidos, na Tabela 6, demonstraram que na condição com agitação somente as bactérias 36B, C-1 5, C-1 8, LP-1 1, LP-1 3; LP-1 5, LP-1 6, SD-1 3 e SDO 12 foram capazes de degradar o *d*-limoneno. Quando crescidas em condição estacionária, praticamente, todas as bactérias degradaram o *d*-limoneno, com exceção das linhagens 29, 36B, AP-1 17, LP-3 2, SD-3 11 e SD-3 17. As bactérias que apresentaram maior porcentagem de degradação, quando crescidas na condição estacionária foram 0,1D (51%), LP-1 1 ($\approx$ 80%) e LP-1 3 (52%) e na condição sob agitação foram LP-1 1 (44,50%) e SD-1 3 (74,5%). A linhagem LP-1 1 foi o único microrganismo que apresentou a maior taxa de degradação nas 2 condições avaliadas, estacionária (80%) e sob agitação (45%).

Pode-se observar que as bactérias apresentaram melhor crescimento, sob condição estacionária. Ainda existe controvérsia em porque algumas bactérias crescem melhor em condição estacionária, enquanto outras em condição sob agitação. Entretanto, neste trabalho, o crescimento em condição estacionária ocorreu, provavelmente, devido ao maior contato do monoterpeno com a parede do microrganismo nesta condição do que na sob agitação. Isto pode ser comprovado, uma vez que as bactérias que degradaram maior porcentagem de *d*-limoneno são Gram-negativas. Como o *d*-limoneno é um composto lipossolúvel, quando em contato com a parede de lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas, tende a dissolver os lipídeos e penetrar na célula, sendo possível, assim, sua biodegradação pelos microrganismos. Já na condição sob agitação, este contato seria dificultado e, assim, sua penetração para o interior da célula. Este resultado, para uma aplicação industrial, é vantajoso, pois a agitação aumenta o custo do tratamento de efluente.

A Tabela 7 mostra os dados de porcentagem de degradação obtidos para os fungos filamentosos crescidos em meio contendo 5% de *d*-limoneno. De acordo com a Tabela 7, observa-se que a maior porcentagem de degradação do *d*-limoneno como fonte de carbono foi obtida pela linhagem 898, tanto na condição estacionária (36%) como sob agitação (36%). Os demais fungos também foram capazes de utilizar o *d*-limoneno como fonte de carbono, em ambas condições estudadas, porém em menor porcentagem. Somente os fungos 837 e LP-5 1 não foram capazes de degradar o *d*-limoneno sob condição estacionária. Quando

crescidos sob agitação todos os fungos foram hábeis para degradar o monoterpeno, com exceção para os fungos 020, 490 preta, L-6 3 e LP-3 5. De modo geral, os fungos foram capazes de degradar menor porcentagem do monoterpeno quando comparados com as bactérias.

Tabela 7: Degradação do *d*-limoneno (%) por 18 fungos filamentosos, entre os ligninolíticos e os isolados do efluente industrial da indústria de suco de laranja, sob diferentes condições de crescimento, estacionária e com agitação.

Fungos	% de degradação do <i>d</i> -limoneno	
	Condição estacionária	Condição agitada (150 rpm)
020	19,84	0,0
390	5,84	14,83
490 PRETA	21,04	0,0
490 VERDE	24,13	14,71
837	0,0	10,16
898	35,95	36,12
AP-1 3	10,61	26,06
AP-3 1	24,17	17,08
AP-5 1	18,42	25,25
AP-5 1	13,39	22,75
Creme 3	23,78	10,66
Fungo 1	13,31	25,70
L-4 1	19,94	10,38
L-6 3	13,10	0,0
Laranja 2	19,76	20,05
LP-3 3	13,28	21,58
LP-3 5	7,10	0,0
LP-5 1	0,0	22,56

A Tabela 8 mostra que as leveduras, isoladas do efluente industrial, utilizaram uma pequena porcentagem de *d*-limoneno quando cultivadas em meio

contendo 5% do monoterpene. Os resultados foram semelhantes, em torno de 15%, na condição estacionária para todas leveduras. Na condição agitada, nenhuma das leveduras estudadas foi capaz de degradar o monoterpene.

Tabela 8: Degradação do *d*-limoneno (%) por 3 leveduras isoladas do efluente industrial da indústria de suco de laranja, sob diferentes condições de crescimento, estacionária e com agitação.

Leveduras	% de degradação do <i>d</i> -limoneno	
	Condição estacionária	Condição com agitação
56	17,98	0,0
Branca 1	14,86	0,0
Geo	15,74	0,0

Com base nos melhores resultados obtidos da porcentagem de degradação do *d*-limoneno, foram escolhidos na 2ª etapa 5 microrganismos, sendo 4 bactérias (0,1D; LP-1 1; LP-1 3; SD-1 3) e um fungo (898).

A melhor degradação do *d*-limoneno pelas bactérias do que pelos fungos pode ter ocorrido devido à constituição da parede celular destes microrganismos. Enquanto a parede das bactérias Gram-negativas é constituída de lipopolissacarídeos, o que facilitaria a entrada do monoterpene, pela dissolução dos lipídeos presentes, os fungos apresentam quitina em sua parede celular e o *d*-limoneno não penetra com a mesma facilidade.

5.4 Seleção dos microrganismos

5.4.1 Efeito da concentração de *d*-limoneno no crescimento microbiano

Os microrganismos pré-selecionados foram testados quanto à sua capacidade de degradar diferentes concentrações de *d*-limoneno, quando crescidos em meio de sais minerais contendo o monoterpene como principal fonte de carbono. A capacidade de degradar o monoterpene foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e os sistemas enzimáticos por espectrofotometria.

5.4.1.1 Degradação do *d*-limoneno

A Figura 15 ilustra a porcentagem de degradação do *d*-limoneno pelas 5 linhagens pré-selecionadas, crescidas durante 5 dias em meio contendo sais minerais e o monoterpeno como fonte de carbono, em diferentes concentrações, sob condição estacionária. Analisando-se a figura, nota-se que as linhagens 0,1D e 898 apresentaram as maiores porcentagens de degradação do *d*-limoneno, quando crescidas na concentração de 3% do monoterpeno, com valores iguais a 85 e 82%, respectivamente. As menores porcentagens de degradação foram atribuídas à bactéria LP-1 3, na concentração de 5% (0%) e ao fungo 898, na concentração 1% (0%).

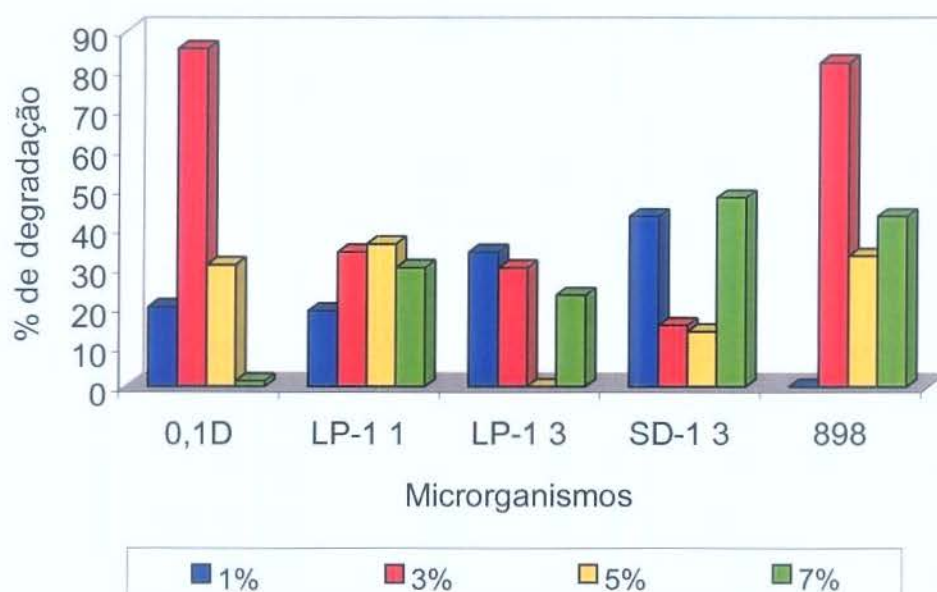


Figura 15: Degradação do *d*-limoneno (%) pelas linhagens selecionadas crescidas em meio de cultura contendo sais minerais e o *d*-limoneno como única fonte de carbono, em diferentes concentrações. Condição estacionária.

Analisando-se a Figura 16, que mostra a porcentagem de degradação do *d*-limoneno, na condição agitada, observa-se que os melhores resultados foram obtidos quando os microrganismos foram crescidos em concentrações mais altas do monoterpeno. Na concentração 1%, não foi observado o crescimento de nenhuma das linhagens estudadas. As maiores porcentagens de degradação foram obtidas pela linhagem SD-1 3, quando crescida em 5% de *d*-limoneno (87%) e a linhagem 898 em 3% do monoterpeno (80%).

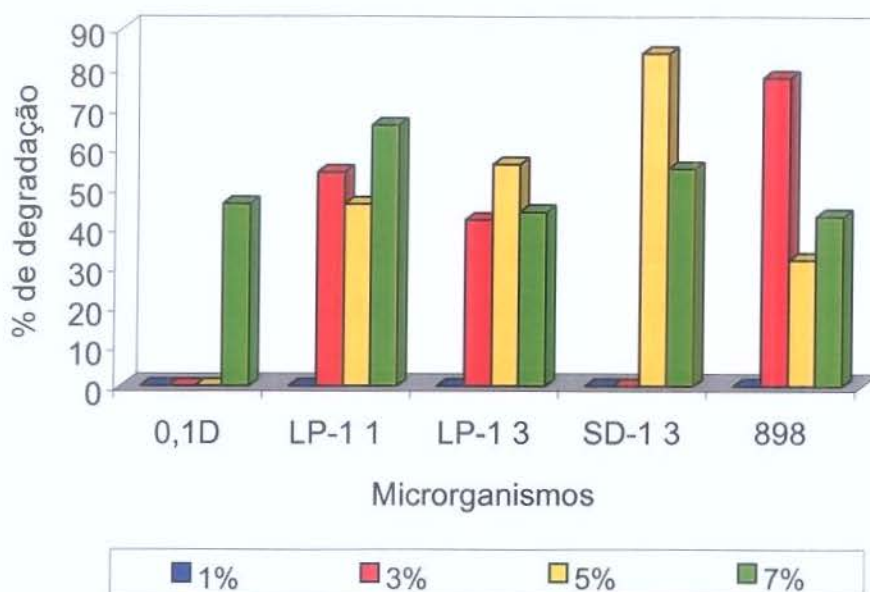


Figura 16: Degradação do *d*-limoneno (%) pelas linhagens selecionadas crescidas em meio de cultura contendo sais minerais e o *d*-limoneno como única fonte de carbono, em diferentes concentrações. Condição sob agitação.

Comparando-se os dados obtidos na condição estacionária e sob agitação, de modo geral, verifica-se que os melhores resultados foram obtidos quando os microrganismos cresceram em meio contendo concentração de 3% de *d*-limoneno, seguida das concentrações 5 e 7% do monoterpeno. Quando utilizado 1%, as linhagens não apresentaram crescimento satisfatório em nenhuma das condições estudadas.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os de outros autores que demonstraram que muitos microrganismos são capazes de degradar e/ou transformar do *d*-limoneno, quando crescidos em meio contendo concentrações do monoterpeno, que variam de 2 a 5%. MARS, GORISSEN e VAN DEN BELD (2001), estudando a biotransformação de *d*-limoneno para ácido perílico por *Pseudomonas* sp., observaram que a bactéria foi capaz de crescer em concentração de 2,4%, do monoterpeno, utilizando o composto como única fonte de carbono e energia. A bioconversão de *d*-limoneno por *Pseudomonas putida* também foi estudada em meio de sais minerais contendo 5% do monoterpeno e observou-se que a bactéria Gram-negativa foi capaz de converter 30% do composto em ácido perílico (SPEELMANS, BIJLSMA e EGGINK, 1998). TAN e

DAY (1998) encontraram em seu trabalho que a conversão do *d*-limoneno para α -terpineol por *Penicillium digitatum* aumenta com o aumento da concentração do monoterpeno, até atingir a concentração de 4%. A partir daí, não foram observadas mudanças na produção de α -terpineol.

Entretanto, outros autores estudando a bioconversão e/ou biodegradação do *d*-limoneno não obtiveram resultados tão satisfatórios quanto estes, utilizando concentrações elevadas do monoterpeno. Em um trabalho com *Pseudomonas aeruginosa*, CHATTERJEE e BHATTACHARYYA (2001) estudaram o efeito da concentração do *d*-limoneno sobre o microrganismo e observaram que a máxima conversão do monoterpeno para álcool perílico foi obtida a 0,2%. Utilizando-se concentração de *d*-limoneno de 0,5%, o rendimento do produto diminuiu. ACOSTA et al. (1996) observaram a presença de α -terpineol e carvona em meio de cultivo, quando a bactéria foi crescida em meio de sais minerais e somente 0,25% de *d*-limoneno. MAZAS e RUIZ (1995) também verificaram que cepas de *P. aeruginosa* foram capazes de converter o *d*-limoneno em compostos aromáticos, quando crescidas em meio de sais minerais contendo 0,25% de *d*-limoneno, em condição estacionária.

Isto demonstra que os resultados deste estudo são satisfatórios, pois os microrganismos cresceram em altas concentrações do *d*-limoneno. Apesar da concentração máxima do *d*-limoneno em Estações de Tratamento de Efluente (ETE) de indústria cítrica ser de 0,005% (KIMBAL, 1991), é comum ocorrerem problemas na Linha de Processamento do suco de laranja, aumentando consideravelmente a concentração do monoterpeno no lodo ativado. O aumento da concentração pode acarretar problemas no funcionamento geral da indústria, uma vez que, o *d*-limoneno pode eliminar os microrganismos responsáveis pelo processo de biodegradação nas ETEs. Por isso, microrganismos capazes de crescer em altas concentrações de *d*-limoneno (como os encontrados neste estudo) e degradá-los e/ou convertê-los para compostos menos tóxicos, é muito importante na solução de problemas para indústria de suco de laranja.

5.4.1.2 Atividades enzimáticas

Foram analisadas, para os microrganismos selecionados, a atividade de enzimas extracelulares (Lacase, Peroxidase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase) e intracelulares (Catecol 1,2 dioxigenase, Catecol 2,3 dioxigenase e Protocatecol 3,4 dioxigenase). As enzimas intracelulares foram determinadas somente para as bactérias, uma vez que, não existem trabalhos que indiquem a produção destas enzimas por fungos. Da mesma maneira, as enzimas extracelulares LiP e MnP só foram determinadas para o fungo 898, uma vez que são mais verificadas em fungos do que em bactérias.

A Figura 17 mostra os resultados obtidos para atividade de lacase para os 5 microrganismos estudados, nas condições estacionária e agitada. Pela figura, verifica-se que a produção de lacase foi semelhante para todas bactérias em todas as concentrações estudadas, nas duas condições de cultivo, com a maioria dos valores entre 2,0 e 2,5 U/L. Porém, a máxima atividade enzimática foi produzida pela linhagem 0,1D (2,7 U/L), seguida da linhagem LP-1 3 (2,6 U/L), ambas na concentração 5% e LP-1 3 (2,5 U/L), na concentração 1%, quando crescidas sob condição estacionária. As menores atividades de lacase foram produzidas pelo fungo 898 em todas concentrações estudadas

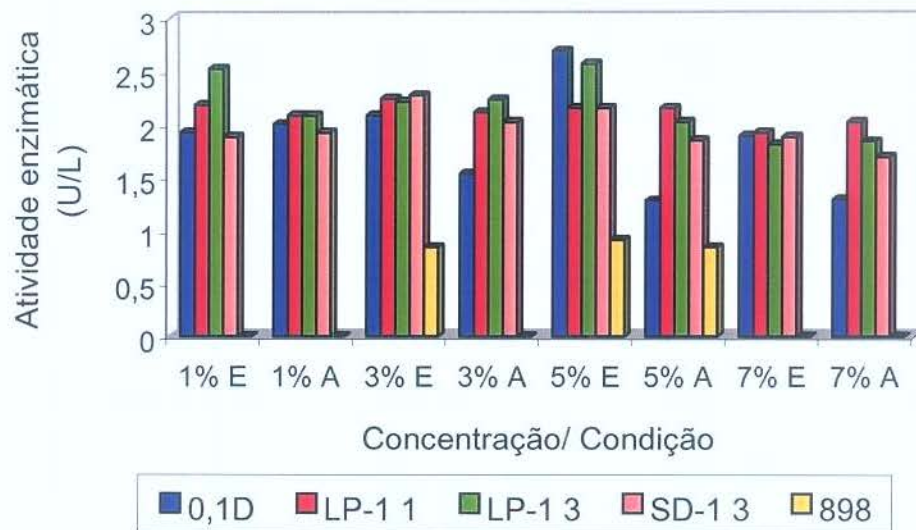


Figura 17: Atividade da enzima lacase pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; LP-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em diferentes concentrações de *d*-limoneno. (E) - cultivo estacionário; (A) - cultivo agitado.

Ao contrário da enzima lacase, a peroxidase não foi produzida de maneira semelhante por todas as linhagens (Figura 18). As maiores atividades enzimáticas foram produzidas pelas linhagens LP-1 1, na concentração de 5% em condição estacionária (3,4U/L); SD-1 3, em 7% de fonte de carbono sob condição estacionária (3,2U/L) e 0,1D, crescida em 3% de *d*-limoneno sob condição estacionária (3,0U/L) e 5% sob agitação (3,0U/L). As menores atividades de lacase foram observadas nos sobrenadantes, quando utilizada a concentração de 1% de *d*-limoneno nas duas condições avaliadas, com valores em torno de 1,5U/L. O fungo 898 também produziu pouca atividade de peroxidase, como a de lacase.

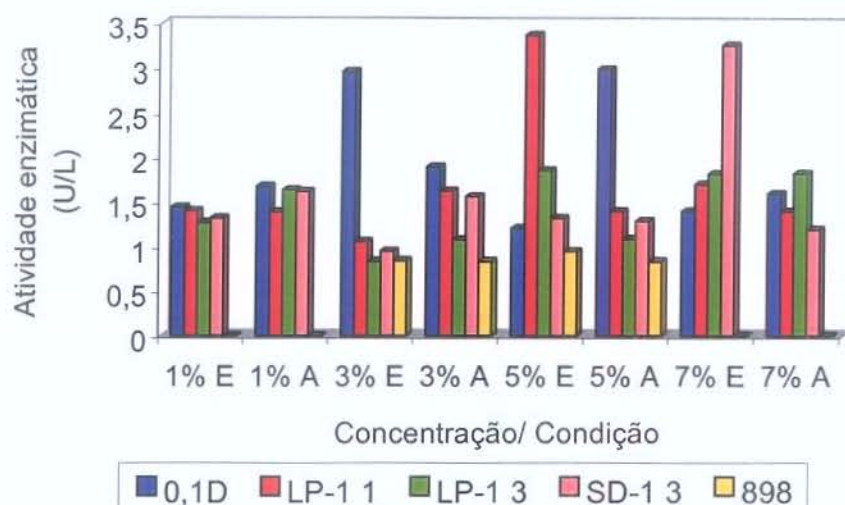


Gráfico 18: Atividade da enzima Peroxidase pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; LP-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em diferentes concentrações de *d*-limoneno. (E) - cultivo estacionário; (A) - cultivo agitado.

A Figura 19 mostra os resultados de atividade das enzimas LiP e MnP pelo fungo 898. Observa-se que a produção da enzima LiP foi muito baixa nas diferentes concentrações de *d*-limoneno usadas como fonte de carbono. A maior atividade da enzima MnP (1,9 U/L) foi detectada quando o fungo foi crescido em 3% do monoterpeno, na condição estacionária. Atividade de MnP não foi produzida pelo fungo nas concentrações de 3 e 5% de *d*-limoneno, sob agitação.

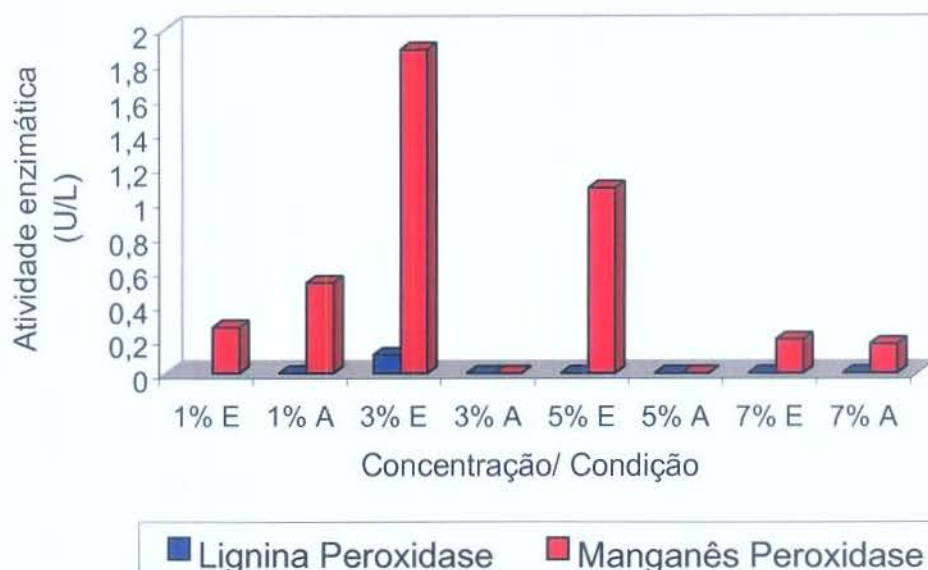


Figura 19: Atividade das enzimas lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) pelo fungo 898, quando crescido em diferentes concentrações de *d*-limoneno. (E) - cultivo estacionário; (A) - cultivo agitado.

Não existem trabalhos que demonstrem que as enzimas ligninolíticas estão envolvidas na degradação do *d*-limoneno, mas elas são responsáveis pela degradação de muitos outros compostos tóxicos encontrados no meio ambiente como fenol, ácido tânico, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, dioxinas, furanos, entre outros (GOLOVLEVA e LEON'EVSKII, 1998; RODRIGUEZ, PICKARD e VAZQUEZ-DUHALT, 1999; ZHANG, KNAPP e TAPLEY, 1999). Pelos resultados obtidos pode-se observar que os microrganismos estudados aqui foram aptos a produzir estas enzimas. Sabe-se que muitos microrganismos produzem estas enzimas na presença de compostos recalcitrantes como é o caso do *d*-limoneno e que, em geral, altas concentrações destes compostos inibem o sistema enzimático dos mesmos, impedindo a degradação de xenobióticos (SAXENA, SHARMILA e SINGH, 1995). Neste estudo, altas concentrações do *d*-limoneno não impediram a produção enzimática pelos microrganismos, principalmente, das enzimas lacase e peroxidase.

A Figura 20 mostra a atividade da enzima intracelular Catecol 1,2 dioxigenase. As maiores atividades enzimáticas foram produzidas pela linhagem LP-1 3 (0,05U/L), na concentração de 7% sob agitação; LP-1 1 (0,045 U/L), em 1% estacionária; SD-1 3 (0,045 U/L), em 3% sob agitação e 0,1D (0,045 U/L), em

5% estacionária. Não foi detectada atividade desta enzima por nenhuma linhagem estudada, quando estas foram crescidas na concentração de 3% de *d*-limoneno, sob condição estacionária.

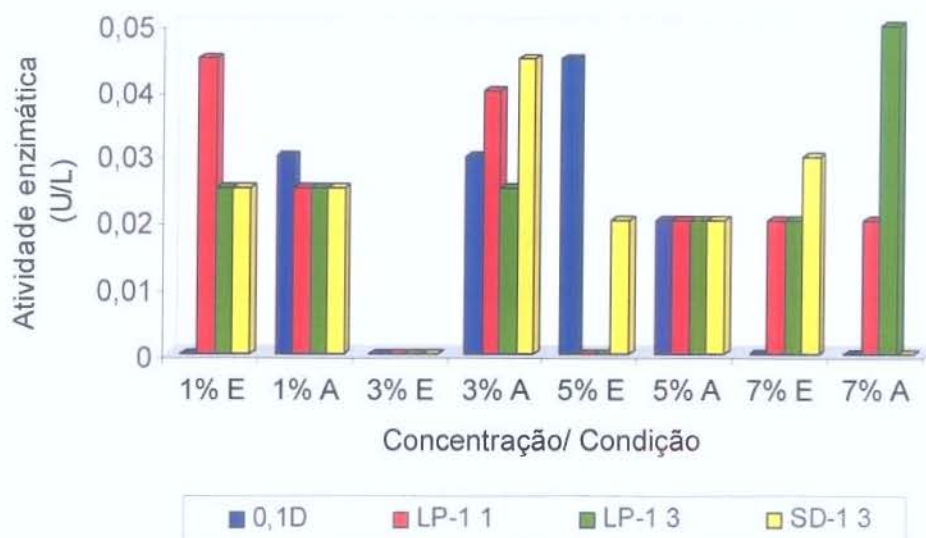


Figura 20: Atividade da enzima Catecol 1,2 dioxigenase pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; LP-1 3; SD-1 3, quando crescidas em diferentes concentrações de *d*-limoneno. (E) - cultivo estacionário; (A) - cultivo agitado.

A atividade da enzima Catecol 2,3 dioxigenase e Protocatecol 3,4 dioxigenase também foram determinadas, mas como as linhagens produziram quantidades pequenas, com valores entre 0,0 e 0,0010 U/L, das duas enzimas nas condições estudadas, os dados não foram apresentados.

Apesar de ser conhecido muito pouco sobre a degradação e/ou conversão do *d*-limoneno por dioxigenases, sabe-se que a catecol 1,2-dioxigenase e a catecol 2,3-dioxigenase são enzimas chaves no catabolismo de compostos aromáticos monocíclicos (MURAKAMI et al., 1998) e, portanto, podem estar envolvidas na degradação do *d*-limoneno. KIM et al. (2002), em seu trabalho, utilizaram o *d*-limoneno para induzir a produção de catecol 1,2-dioxigenase para a degradação de outro composto tóxico, o bifenil. Apesar da enzima não ter sido utilizada na degradação do monoterpene, os valores de atividade da catecol 1,2-dioxigenase encontradas em nosso trabalho, indicam que a enzima pode estar envolvida na degradação do *d*-limoneno. Além disso, outros estudos mostram que esta enzima e outras catecol dioxigenases podem degradar e/ou transformar

vários compostos tóxicos, como fenol, 3,4-dicloroanilina, anilina e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (MURAKAMI et al., 1998; LIPTHAY et al., 1999; LEBLOND et al., 2000; TRAVKIN et al., 2003).

Entretanto, a ausência de algumas enzimas no sobrenadante das culturas, tanto extracelulares como intracelulares, não indica a falta de capacidade de produzi-las, pois diferentes fatores interferem na produção de enzimas, tais como, pH, temperatura, nutrientes entre outros (SPARRAT et al., 2000). Além disso, a ausência de uma dessas enzimas, não significa, necessariamente, que o composto não será degradado, pois outras enzimas podem estar participando do seu processo degradativo.

Os dados obtidos da porcentagem de degradação e atividades enzimáticas sugerem que os microrganismos apresentaram melhores atividades, quando o *d*-limoneno foi adicionado nas concentrações 3 e 5% como principal fonte de carbono, sendo, portanto, essas concentrações utilizadas na fase seguinte do trabalho.

5.4.2 Relação entre o tempo de crescimento e a degradação de *d*-limoneno pelos microrganismos

Os microrganismos foram testados quanto à sua capacidade de degradar o *d*-limoneno, quando crescidos em meio de sais minerais contendo o monoterpene como fonte de carbono, por 1, 3, 5 e 7 dias, nas concentrações de 3 e 5%. Nesta etapa, a capacidade de utilização do monoterpene também foi avaliada por CLAE e determinações enzimáticas.

5.4.2.1 Degradação do *d*-limoneno

Quando os microrganismos foram crescidos em meio contendo 3% de *d*-limoneno (Figura 21), nota-se que os melhores resultados foram obtidos para o fungo 898, quando crescido por 1, 3 e 5 dias, na condição estacionária e as bactérias LP-1 1, com 3 dias de crescimento estacionário e com 5 dias sob agitação e 0,1D, com 1 e 3 dias de crescimento sob agitação. Com 1 dia de crescimento, na condição estacionária, somente o fungo 898 degradou o *d*-limoneno. Com 7 dias de crescimento, nenhuma das linhagens foi capaz de degradar o monoterpene, quando cultivados sem agitação.

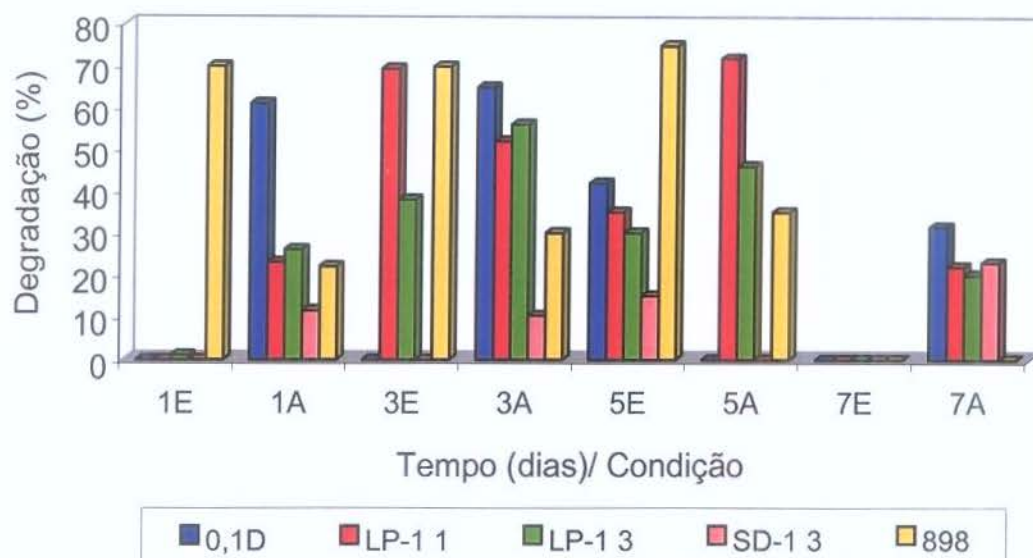


Figura 21: Degradação do *d*-limoneno (%) pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; LP-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em meio de cultivo contendo o monoterpene como única fonte de carbono, na concentração de 3%. (E) - cultivo estacionário; (A) - cultivo agitado.

A Figura 22 apresenta os resultados de degradação (%) do monoterpene, quando os microrganismos foram crescidos utilizando-se as concentrações de 3% sob as condições estacionária e com agitação durante 1, 3, 5 e 7 dias. As melhores porcentagens de degradação do monoterpene foram obtidas pelas linhagens 898 (82%), com 1 dia de crescimento estacionário e SD-1 3 (82%), com 5 dias de crescimento, sob agitação. Com 7 dias de crescimento somente a linhagem 898 foi capaz de degradar o monoterpene.

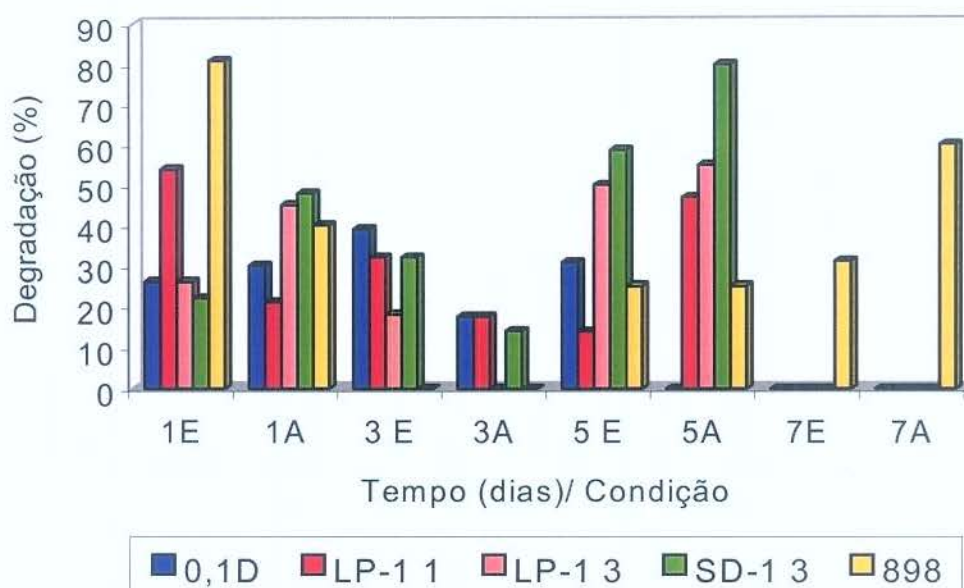


Figura 22: Degradação do *d*-limoneno (%) pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; LP-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em meio de cultivo contendo o monoterpeneo como única fonte de carbono, na concentração de 5%. (E) - cultivo estacionário; (A) - cultivo agitado.

Comparando-se os resultados ilustrados nas Figuras 21 e 22, observa-se que os microrganismos, em geral, degradaram maiores porcentagens de *d*-limoneno quando crescidos em meio contendo 3% do monoterpeneo. Entretanto, com 1 dia de crescimento os melhores resultados foram obtidos na concentração de 5% de *d*-limoneno. Observou-se também que porcentagens de degradação ocorreram com 3 e 5 dias de crescimento, sendo os menores valores encontrados com 7 dias, provavelmente, porque o composto tornou-se tóxico aos microrganismos.

Trabalhos realizados por vários pesquisadores estão de acordo com os resultados apresentados aqui, onde, geralmente, a formação dos produtos ocorreu na primeira semana do experimento. ADAMS, DEMYTTENAERE e KIMPE (2003) estudaram a biotransformação do *d*-limoneno para α -terpineol por *Penicillium digitatum*, realizada em culturas líquidas por 8 dias e após 5 dias observaram a formação do produto. Em estudo utilizando a bactéria *Pseudomonas putida*, CHATTERJEE e BHATTACHARYYA (2001) analisaram os produtos de bioconversão de 0,2% de *d*-limoneno, em meio de cultura, após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de cultivo. Os autores observaram que os produtos de

bioconversão aumentaram de maneira significativa entre 24 e 48 horas, sendo que após 120 horas, as concentrações dos produtos permaneceram inalteradas. PAVLOSTATHIS & MISRA (1999), estudando a biotransformação de 5 monoterpenos (arbanol, linalool, α -pineno, plinol e α -terpineol), observaram que após 8 dias de incubação as concentrações dos monoterpenos decresceram muito, mas permaneceram estáveis até o final do período de incubação de 30 dias. Em outro trabalho com *P. putida*, observou-se que a bactéria converteu 75 a 80% do *d*-limoneno, quando crescida em meio contendo 5% do monoterpeno, em ácido perílico após 72 horas de crescimento (SPELLMANS, BILSMA e EGGINK, 1998). MISRA, PAVLOSTATHIS e PERDUE (1996) estudando a biodegradação aeróbica de monoterpenos por microrganismos isolados do solo, observaram que após 40 horas de incubação os níveis de *d*-limoneno, terpineno e terpinoleno ficaram abaixo do nível de detecção, mostrando que os monoterpenos foram biotransformados ou biodegradados. ACOSTA et al. (1996), trabalhando com *P. aeruginosa* crescida em meio de sais minerais e 0,25% de *d*-limoneno por 21 dias, observaram que nas primeiras 24 horas ocorreu redução de 42% do monoterpeno e após o nono dia a concentração do *d*-limoneno se manteve constante até o final do experimento. Em nosso experimento, os microrganismos apresentaram bons resultados, pois foram capazes de degradar as concentrações de *d*-limoneno estudadas em poucos dias. Isto é importante, porque quanto mais rápido ocorrer a biodegradação do *d*-limoneno no lodo ativado, menos problemas ele acarretará às ETEs.

5.4.2.2 Atividades enzimáticas

A Figura 23 mostra os resultados da atividade da enzima lacase dos microrganismos crescidos em meio contendo 3% de *d*-limoneno. As maiores atividades de lacase foram produzidas pela linhagem LP-1 1, com 1 dia de crescimento, tanto sob condição estacionária como com agitação. A partir de 3 dias de crescimento, os microrganismos apresentaram produção enzimática semelhante nas condições estudadas.

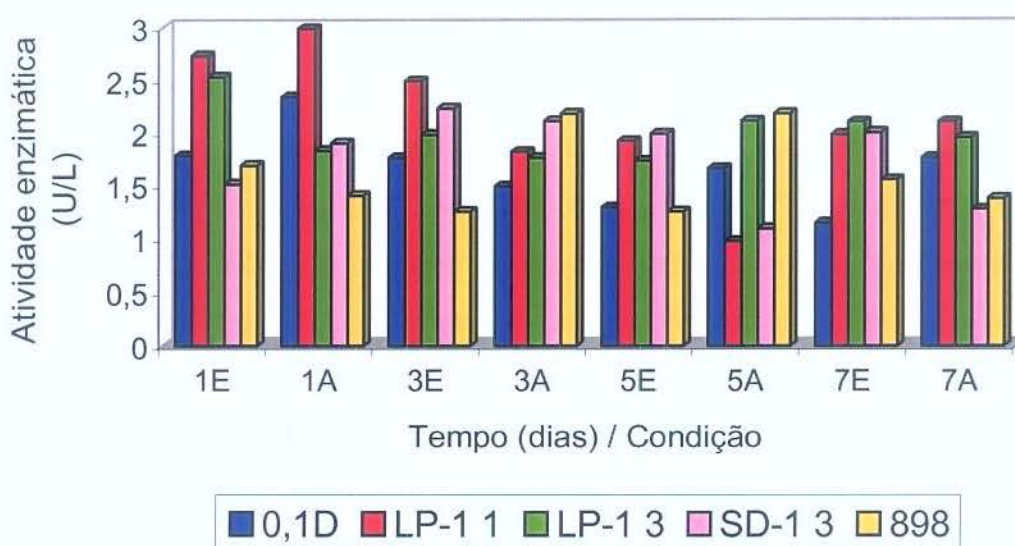


Figura 23: Atividade da enzima lacase pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; L-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em meio contendo sais minerais e 3% de *d*-limoneno como fonte de carbono. **(E)** – cultivo estacionário; **(A)** – cultivo agitado.

Quando os microrganismos foram crescidos em 5% de *d*-limoneno, observa-se que estes apresentaram comportamento semelhante quanto à produção de lacase, sendo que as bactérias produziram a enzima em maior quantidade que o fungo 898 (Figura 24). A linhagem LP-1 3 apresentou alta atividade da enzima, em torno de 2,5 U/L em todos os dias e nas duas condições estudadas, em relação às demais linhagens. A menor atividade enzimática foi produzida pela linhagem LP-1 1, quando crescida por 5 dias sob agitação.

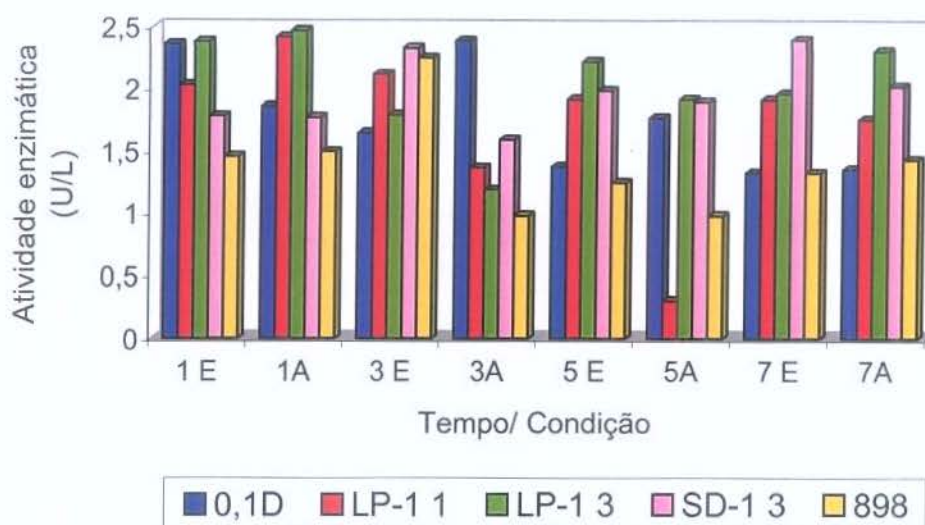


Figura 24: Atividade da enzima lacase pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; L-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em meio contendo sais minerais e 5% de *d*-limoneno como fonte de carbono. **(E)** – cultivo estacionário; **(A)** – cultivo agitado.

Na Figura 25, observa-se a atividade da enzima peroxidase produzida pelas linhagens crescidas em meio de cultura contendo 3% de *d*-limoneno como fonte de carbono. Em geral, os microrganismos apresentaram menores atividades da enzima peroxidase quando comparados com a lacase, nas mesmas condições de cultivo. A maior atividade enzimática foi produzida pela bactéria LP-1 1 (2,6 U/L), com 1 dia de crescimento, sob condição estacionária e LP-1 3 (2,5U/L), também com 1 dia de crescimento sob agitação.

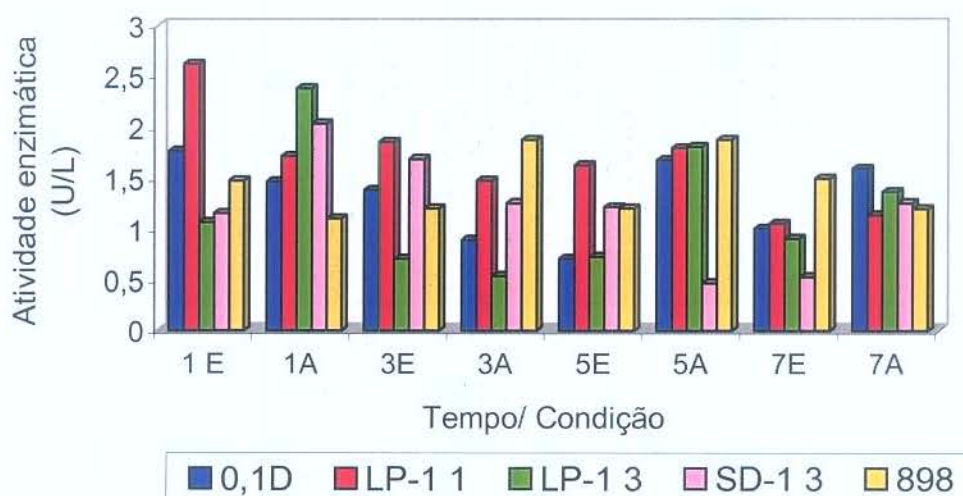


Figura 25: Atividade da enzima peroxidase pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; L-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em meio contendo sais minerais e 3% de *d*-limoneno como fonte de carbono. **(E)** – cultivo estacionário; **(A)** – cultivo agitado.

Os resultados da produção de peroxidase pelas linhagens selecionadas, crescidas em meio de sais minerais contendo 5% de *d*-limoneno são mostrados na Figura 26. As maiores atividades de peroxidase foram apresentadas pelas linhagens LP-1 3, com 1 dia de crescimento em ambas condições e por 0,1D; LP-1 1 e LP-1 3, com 3 dias de crescimento estacionário. Com 5 dias de crescimento, os microrganismos apresentaram menores atividades da enzima nas duas condições estudadas. Observa-se que houve aumento da atividade desta enzima quando a concentração de *d*-limoneno passou de 3% para 5%.

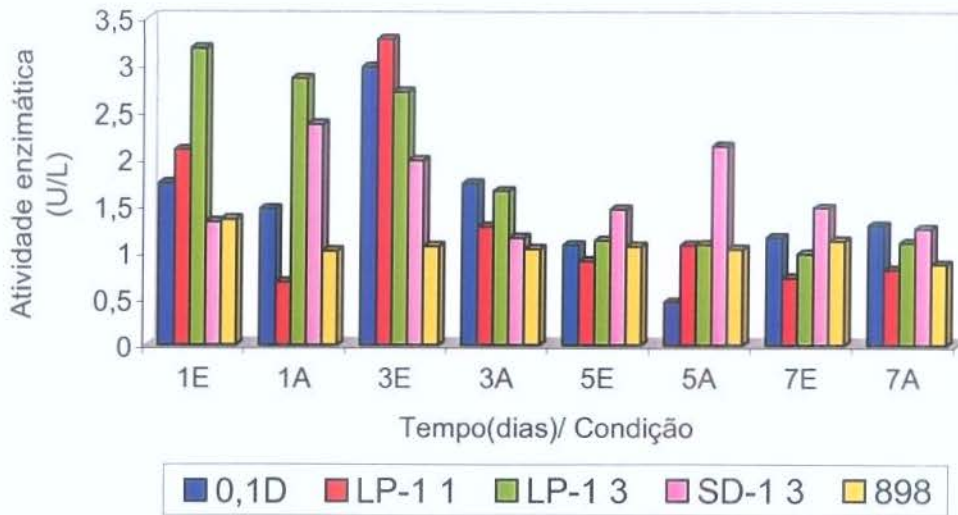


Figura 26: Atividade da enzima peroxidase pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; L-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em meio contendo sais minerais e 5% de *d*-limoneno como única fonte de carbono. (E) – cultivo estacionário; (A) – cultivo agitado.

A Figura 27 mostra as atividades das enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase produzidas pelo fungo 898 crescido em 3 e 5% de *d*-limoneno por 1,3, 5 e 7 dias. Observa-se que o fungo apresentou pouca atividade de LiP. A enzima MnP foi produzida principalmente quando o microrganismo foi cultivado em meio contendo 5% de *d*-limoneno com 7 dias de crescimento estacionário (7,2U/L) e com 1 e 7 dias de crescimento sob agitação, 6,8 e 7,0 U/L respectivamente. Quando a linhagem 898 foi cultivada em meio contendo 3% de *d*-limoneno a enzima MnP foi produzida com maior frequência quando comparado com 5%.

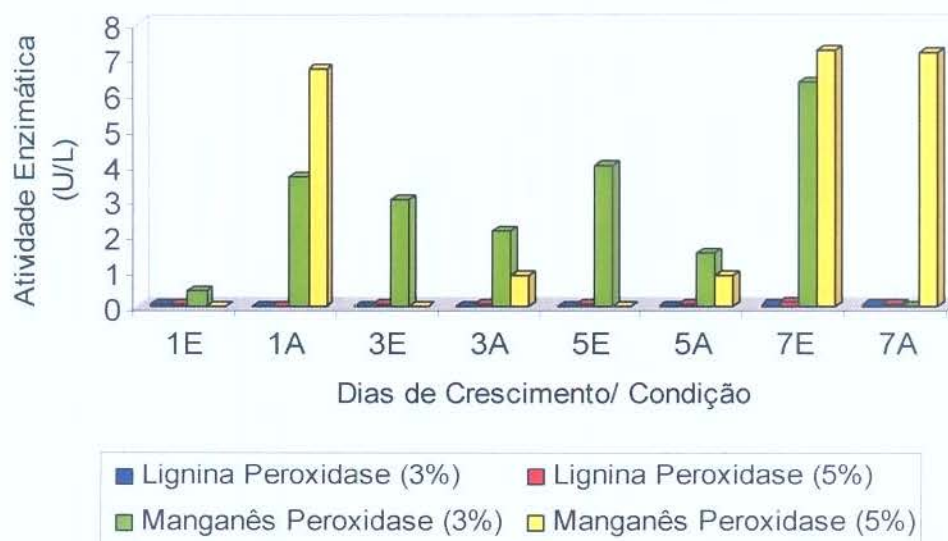


Figura 27: Atividade de lignina peroxidase e manganês peroxidase pelo fungo 898, quando crescido em meio contendo sais minerais e 3 e 5% de *d*-limoneno como fonte de carbono. **(E)** – cultivo estacionário; **(A)** – cultivo agitado.

As enzimas, em geral, são produzidas na fase estacionária de crescimento do microrganismo. Entretanto, neste estudo, estas enzimas foram produzidas de maneira semelhante em todos os dias amostrados, indicando que elas podem ter sido utilizadas para degradação inicial do *d*-limoneno.

A Figura 28 mostra as atividades da enzima intracelular catecol 1,2 dioxigenase, quando os microrganismos foram crescidos em 3% de monoterpene. Observa-se que as maiores atividades foram produzidas pela linhagem 0,1D com 3 (0,38 U/L), 5 (0,42 U/L) e 7 (0,55 U/L) dias de crescimento, sob condição estacionária. Os demais microrganismos apresentaram baixas atividades desta enzima quando comparados com 0,1D em todos os dias de crescimento, sendo que com 5 dias não foi detectada atividade para nenhum microrganismo. Quando os microrganismos foram cultivados sob agitação, nota-se que a partir do 3º dia de crescimento, houve uma produção muito baixa da catecol 1,2-dioxigenase, demonstrando que essa condição não foi favorável para a produção da enzima em questão, para qualquer dos microrganismos estudados.

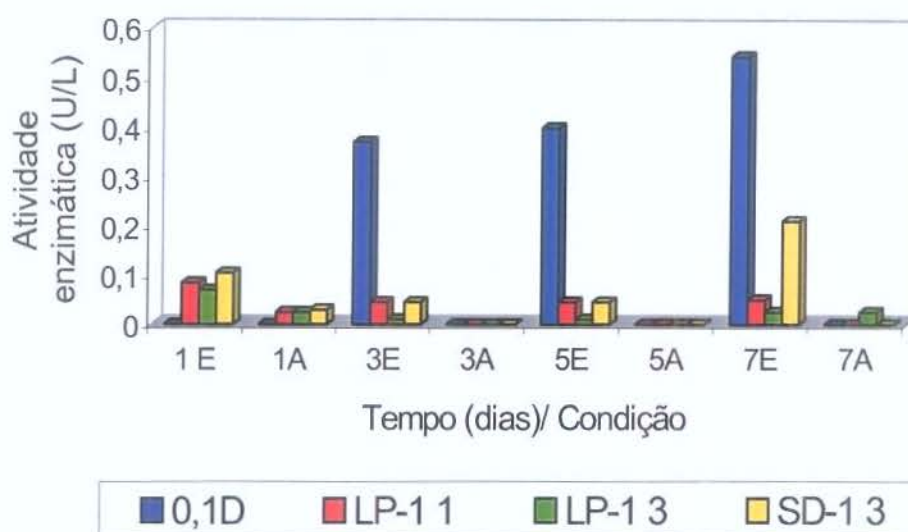


Figura 28: Atividade da enzima Catecol 1,2 dioxigenase pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; L-1 3; SD-1 3, quando crescidas em meio contendo sais minerais e 3% de *d*-limoneno como fonte de carbono. **(E)** – cultivo estacionário; **(A)** – cultivo agitado.

As melhores atividades da enzima catecol 1,2 dioxigenase para os microrganismos crescidos em meio contendo 5% de *d*-limoneno, também foram obtidas para a linhagem 0,1D com 3 (0,45U/L), 5 (0,40 U/L) e 7 (0,35 U/L) dias de crescimento estacionário (Figura 29). Resultados semelhantes foram observados quando os microrganismos foram cultivados em meio contendo 3% do monoterpeneo (Figura 28). Com 3, 5 e 7 dias de crescimento sob agitação, nenhuma linhagem produziu esta enzima e nos demais dias, a atividade enzimática apresentada pelas linhagens LP-1 1; LP-1 3 e SD-1 3 foi baixa.

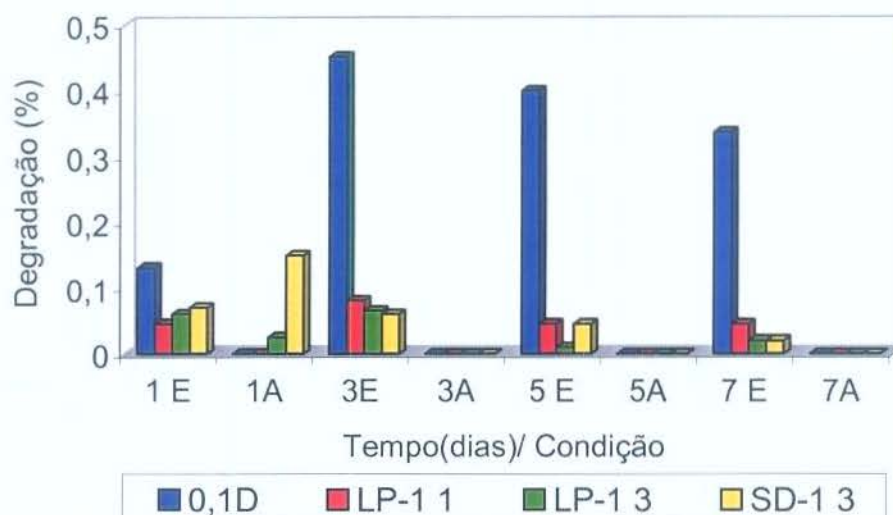


Figura 29: Atividade da enzima Catecol 1,2 dioxigenase pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; L-1 3; SD-1 3, quando crescidas em meio contendo sais minerais e 5% de *d*-limoneno como fonte de carbono. **(E)** – cultivo estacionário; **(A)** – cultivo agitado.

A atividade da enzima intracelular catecol 2,3 dioxigenase produzida pelas linhagens microbianas foi inferior a da catecol 1,2 dioxigenase, com valores entre 0,0 e 0,0020 U/L, nas condições estudadas, ou seja, quando as linhagens foram crescidas em meio contendo sais minerais e 3% e 5% de *d*-limoneno como fonte de carbono, por 1, 3, 5 e 7 dias, sob condição estacionária e sob agitação. Portanto, os dados não foram mostrados neste trabalho. A produção da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase também foi determinada, mas nenhum microrganismo produziu esta enzima nas condições estudadas.

Após verificar os resultados obtidos na avaliação do tempo de crescimento dos microrganismos em meio contendo 3 e 5% de *d*-limoneno, observou-se que estes apresentaram melhores resultados, tanto de porcentagem de degradação do *d*-limoneno como de atividades enzimáticas, quando crescidos por 3 e 5 dias.

5.5 Efeito da toxicidade do *d*-limoneno sobre os microrganismos estudados

5.5.1 Determinação do crescimento fúngico

O estudo da toxicidade do *d*-limoneno sobre o fungo 898 foi realizado através da determinação da massa seca, uma vez que, quanto mais tóxico for o composto para o microrganismo, menor será seu crescimento e, conseqüentemente, sua massa seca. Segundo alguns autores, o *d*-limoneno aumenta a fluidez da membrana fúngica, o qual leva à alta inespecificidade da membrana, aumentando sua permeabilidade, perda da sua integridade e, assim, decréscimo da massa seca (CHATTERJEE e BHATTACHARYYA, 2001; ONKEN e BERGER, 1999).

A Figura 30 mostra os resultados de massa seca obtidos quando o fungo 898 foi cultivado em meio de sais minerais contendo o *d*-limoneno nas concentrações 1, 3, 5 e 7%, nas condições estacionária e com agitação. A maior (40 mg) e a menor (5 mg) quantidade de massa seca, ou seja, o maior e o menor crescimento, foram observadas quando o microrganismo foi cultivado em meio contendo 1% do monoterpeneo, nas condições estacionárias e sob agitação, respectivamente. Nas demais concentrações de *d*-limoneno, o valor de massa seca variou entre 15 e 25 mg, mostrando que o composto pode ser tóxico ao microrganismo. TAN e DAY (1998) observaram que a conversão do *d*-limoneno para α -terpineol por *Penicillium digitatum* aumenta com o aumento da concentração do monoterpeneo, até atingir a concentração de 4%. A partir daí, não foram observadas mudanças na produção de α -terpineol, mostrando que o composto tornou-se tóxico ao microrganismo. Estes dados assemelham-se aos encontrados neste trabalho.

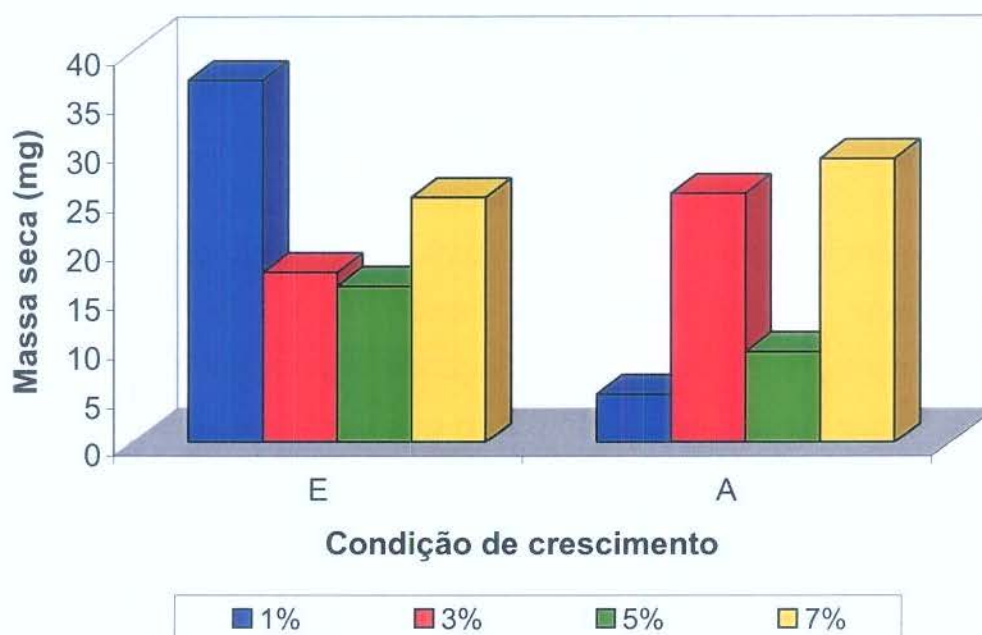


Figura 30: Massa seca produzida pelo fungo 898, quando cultivado em meio contendo sais minerais e o *d*-limoneno como fonte de carbono. (E) = cultivo estacionário; (A) = cultivo agitado

A Figura 31 mostra os valores de massa seca obtidos para fungo 898, quando crescido por 1, 3, 5 e 7 dias, em meio contendo sais minerais com 3 e 5% de *d*-limoneno, sob condição estacionária e com agitação. Observa-se que os maiores valores de massa seca foram obtidos quando o microrganismo foi cultivado por 7 dias, com exceção da concentração de 3%, com agitação. Nesta concentração, o microrganismo cresceu igualmente em todos os dias, apresentando os valores de massa seca em torno de 25 mg.

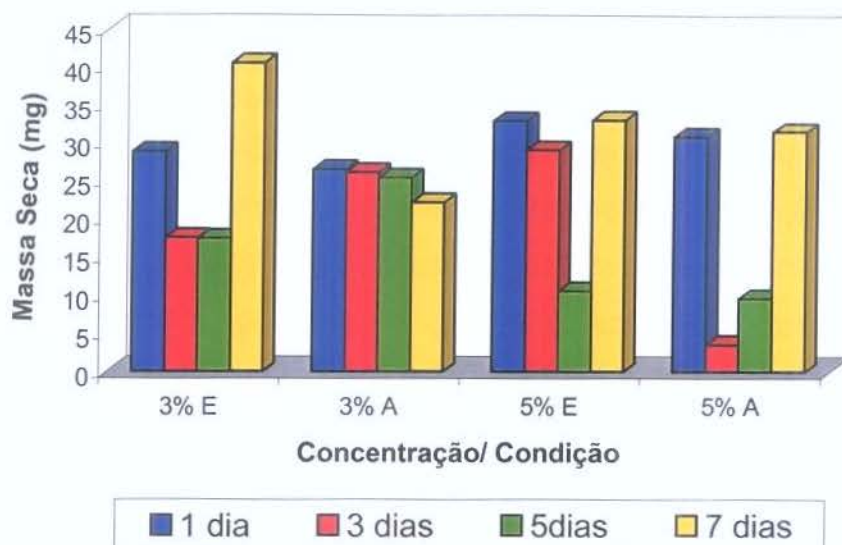


Figura 31: Massa seca produzida pelo fungo 898, quando cultivado em meio de cultura contendo sais minerais e 3 e 5% de *d*-limoneno como fonte de carbono. (E) = cultivo estacionário; (A) = cultivo agitado.

Observa-se também, nas figuras 30 e 31, que, de modo geral, no 7º dia de cultivo, o fungo 898 apresentou um rápido crescimento, mostrando que o *d*-limoneno tornou-se menos tóxico ao microrganismo com o aumento do período de incubação. Provavelmente, isto ocorreu devido à degradação e/ou conversão do *d*-limoneno em compostos menos tóxicos nos primeiros dias de cultivo, possibilitando o crescimento do microrganismo. Durante o experimento, também pode ter ocorrido a adaptação do microrganismo ao *d*-limoneno. Segundo ONKEN e BERGER (1999), a adaptação dos microrganismos a solventes tóxicos, como o *d*-limoneno, pode diminuir o dano destes compostos às suas membranas e estes podem crescer mesmo em altas concentrações do solvente.

De acordo com DEMYTTENAERE, BELLEGHEM e KIMPE (2001), que estudaram a biotransformação do *d*-limoneno por vários fungos, os diferentes gêneros não apresentam a mesma velocidade de crescimento. A conversão do *d*-limoneno para α -terpineol por *Penicillium digitatum* ocorreu na primeira parte do experimento, ou seja, após 24 horas. Já para *Corynespora cassicola* a bioconversão foi lenta, sendo que o melhor rendimento foi obtido no final do experimento, após 5 dias de incubação. ONKEN e BERGER (1999), trabalhando com cultura de *Pleurotus sapidus*, observaram que após adição do *d*-limoneno

ocorria um rápido decréscimo da massa seca, indicando progressivo dano na membrana fúngica. Neste mesmo trabalho, os autores observaram que apesar da diminuição do peso seco, os fungos ainda possuíam atividade de biotransformação por aproximadamente 4 dias. VAN DYK, VAN RENSBURG e MOLELEKI (1998), trabalhando com vários fungos filamentosos, observaram que após 24 horas houve um decréscimo das células viáveis, assim como, um decréscimo da formação dos produtos, quando os microrganismos foram crescidos em meio contendo *d*-limoneno.

5.5.2 Determinação do crescimento bacteriano

O *d*-limoneno é tóxico para muitas bactérias, mesmo em baixas concentrações, sendo que em altas concentrações a toxicidade não específica aos microrganismos pode impedir a decomposição e a mineralização do monoterpeno (PAVLOSTATHIS e MISRA, 1999). Por isso, torna-se importante um estudo sobre a influência da concentração do monoterpeno sobre o crescimento dos microrganismos em estudo (CHATTERJEE e BHATTACHARYYA, 2001). A toxicidade do *d*-limoneno às bactérias foi testada na ausência do monoterpeno e variando-se sua concentração de 1% a 10%, por um período de 10 dias. O crescimento das bactérias foi observado pelo aumento da turbidez do meio de cultura, sendo maior quanto menos tóxico for o *d*-limoneno para os microrganismos.

Através da Figura 32, nota-se que a bactéria 0,1D cresceu melhor quando incubado por um período mais longo (10 dias), sendo que o valor de absorbância foi praticamente o mesmo no 8º, 9º e 10º dias de crescimento. O crescimento do microrganismo aumentou conforme aumento da concentração de *d*-limoneno até 3%, sendo que a partir desta concentração, o crescimento microbiano começou a declinar. Pela Figura, pode-se concluir que este microrganismo cresceu melhor quando foram utilizadas as concentrações de 2 e 3% de *d*-limoneno.

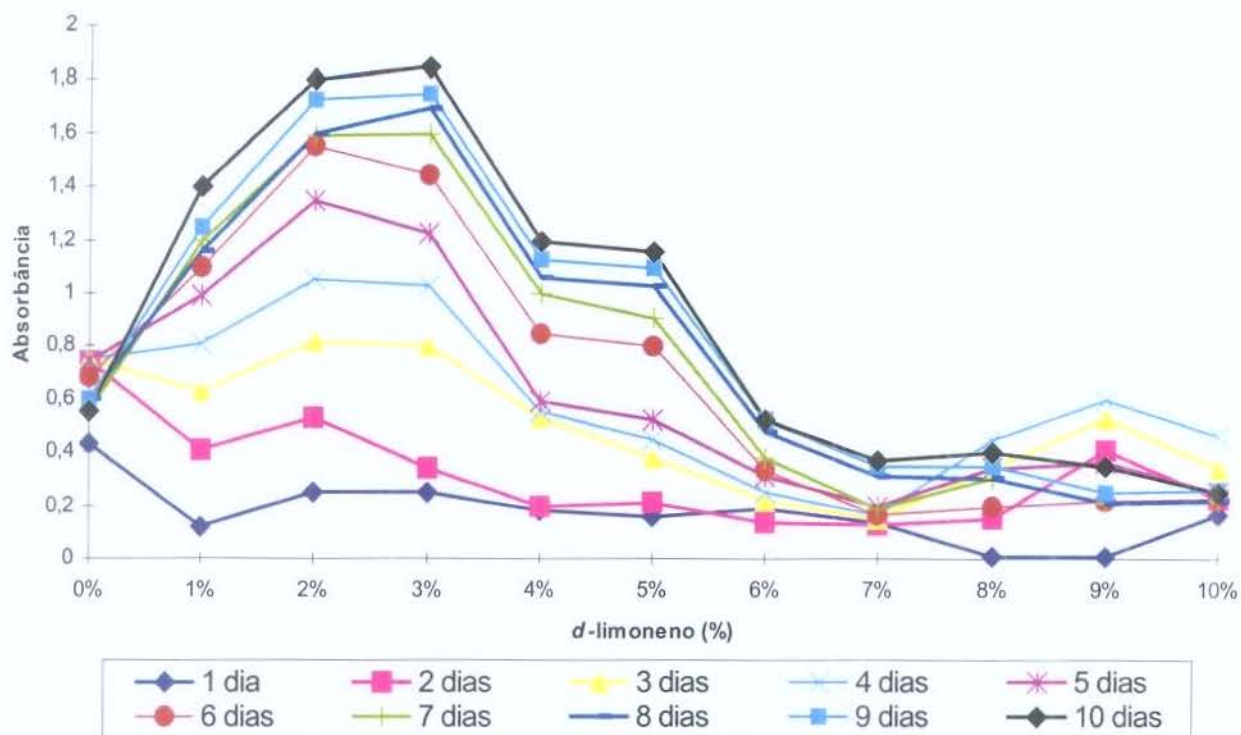


Figura 32: Crescimento da linhagem 0,1D cultivada durante 10 dias em meio contendo sais minerais e *d*-limoneno como fonte de carbono, na concentração de 0 a 10%. Avaliação por turbidimetria.

O crescimento da bactéria LP-1 1 (Figura 33) em meio contendo diferentes concentrações de *d*-limoneno foi inferior ao da 0,1D no mesmo meio (Figura 32). Seu comportamento foi semelhante em todas as concentrações e dias de crescimento, sendo que esta cresceu pouco durante o tempo do experimento. Observou-se também que o melhor crescimento do microrganismo ocorreu na ausência de *d*-limoneno, ou seja, quando o composto ainda não tinha sido adicionado ao meio de cultura. O maior crescimento, em meio contendo o monoterpeno, foi obtido quando a linhagem foi crescida em 2 e 3% do *d*-limoneno com 1 dia de cultivo. Os resultados demonstraram que o *d*-limoneno produziu maior toxicidade à bactéria LP-1 1, a qual apresentou baixos valores de Absorbância (crescimento) em relação a 0,1D. Mesmo aumentando o tempo de incubação não houve aumento no crescimento desta linhagem. Este fato deve-se provavelmente ao fato do microrganismo ser incapaz de metabolizar o *d*-limoneno ou de se adaptar à presença do composto.

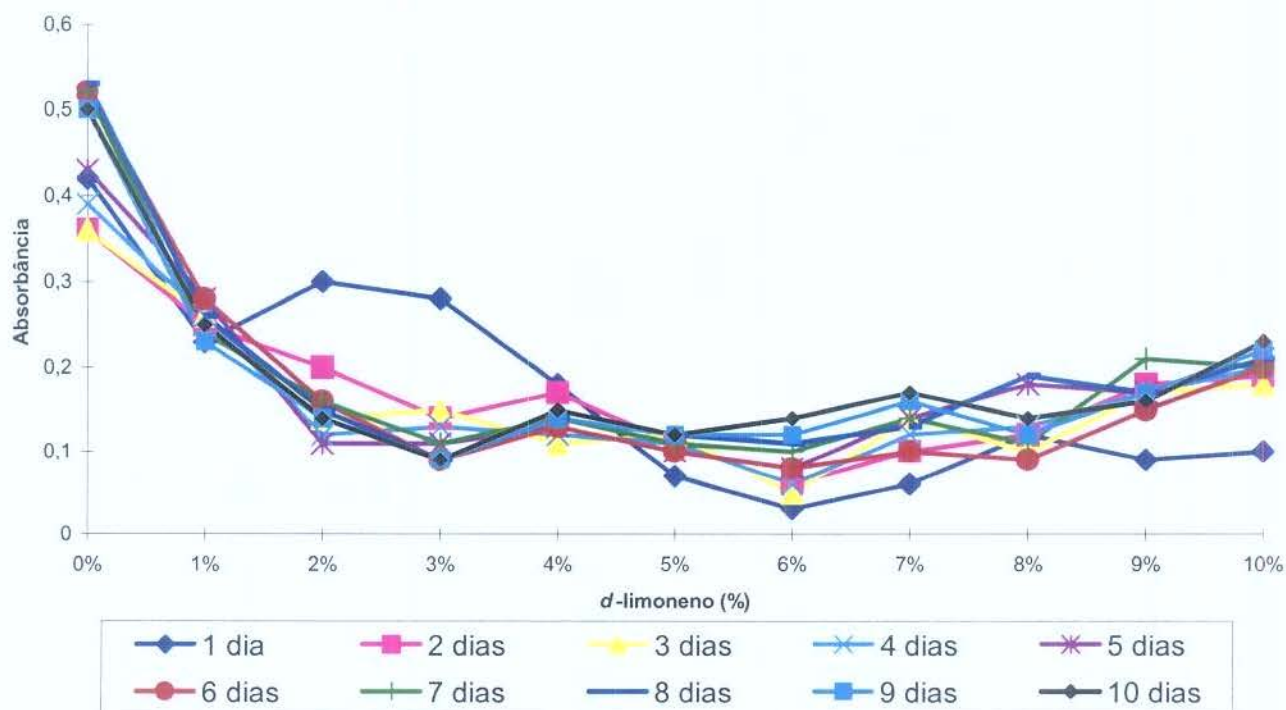


Figura 33: Crescimento da linhagem LP-1 1, cultivada durante 10 dias em meio contendo sais minerais e *d*-limoneno como fonte de carbono, na concentração de 0 a 10%. Avaliação por turbidimetria.

A Figura 34 mostra o crescimento da linhagem LP-1 3, na ausência e nas concentrações de 1 a 10% de *d*-limoneno. Observa-se que o maior crescimento do microrganismo ocorreu nas concentrações de 2 e 3% do monoterpene, sendo que o crescimento aumentou com o tempo de incubação. A partir de 3%, o crescimento foi pequeno e, praticamente, não se alterou durante o período, nas concentrações estudadas.

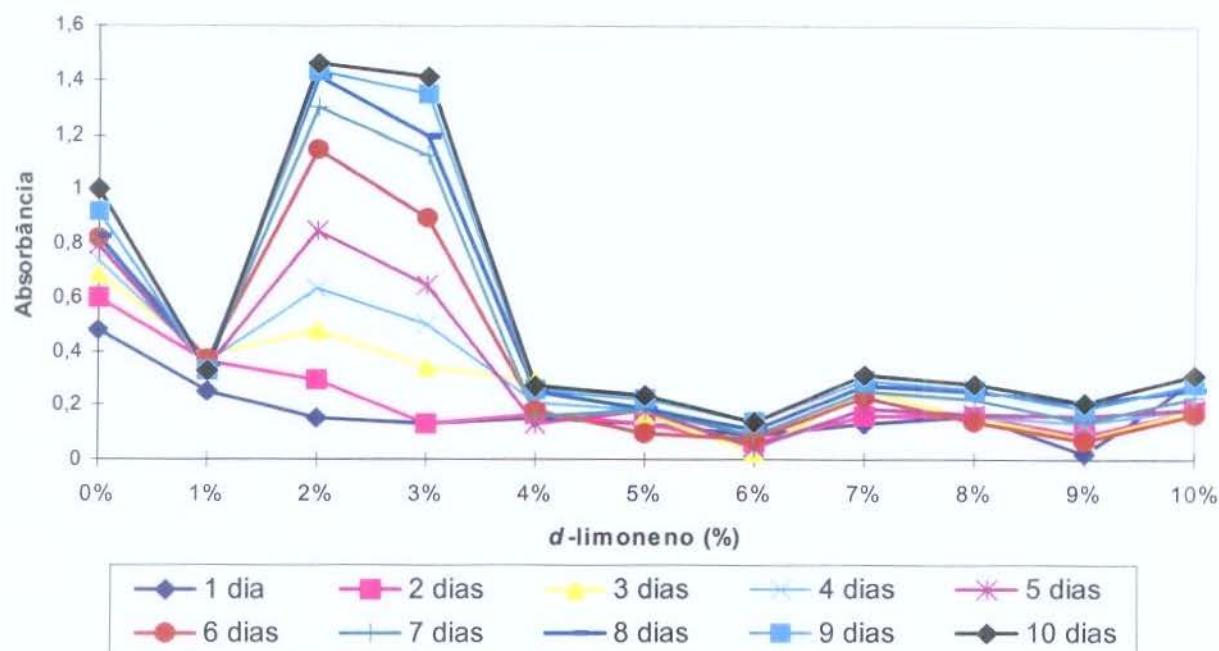


Figura 34: Crescimento da linhagem LP-1 3, cultivada durante 10 dias em meio contendo sais minerais e *d*-limoneno como fonte de carbono, na concentração de 0 a 10%. Avaliação por turbidimetria.

A linhagem SD-1 3 apresentou o melhor crescimento nas concentrações 1, 2 e 3% de *d*-limoneno, que aumentou no decorrer do tempo de cultivo, sendo maior com 10 dias de incubação (Figura 35). Nas demais concentrações o crescimento foi baixo durante os 10 dias de incubação. Observa-se também que o crescimento do microrganismo aumenta com o período de incubação, sendo que o crescimento máximo ocorreu com 10 dias em todas concentrações utilizadas.

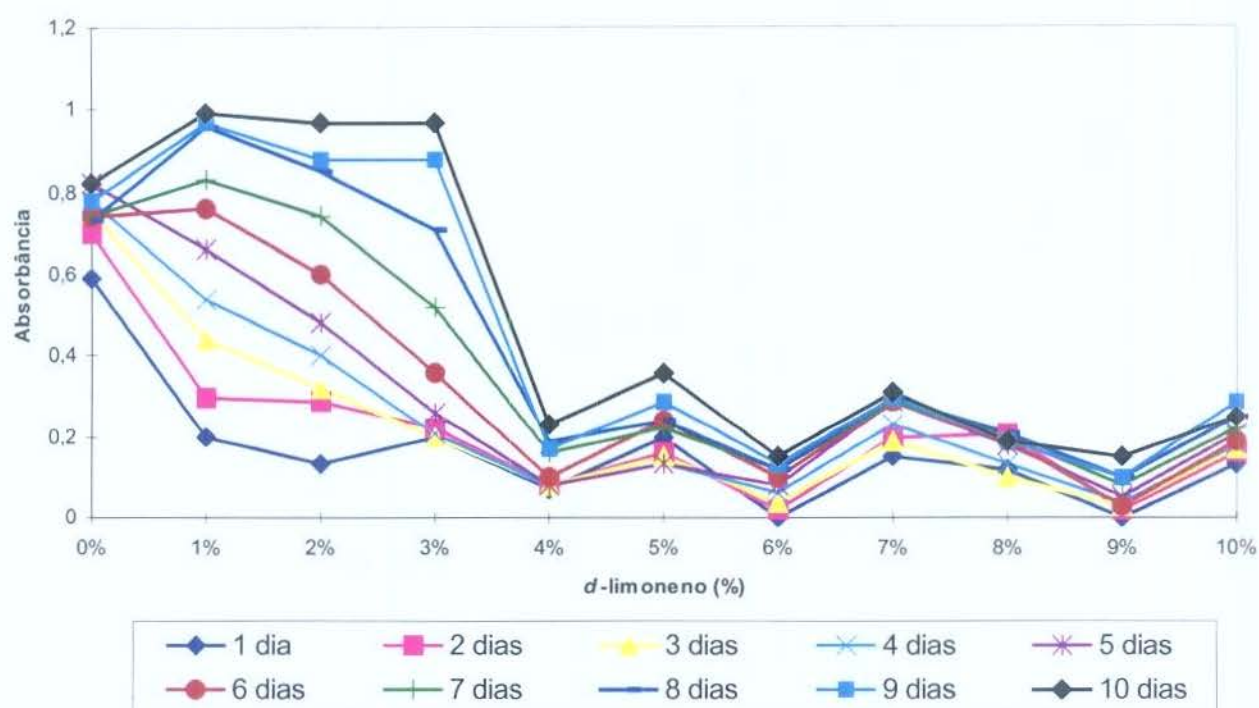


Figura 35: Crescimento da linhagem SD-1 3 cultivada durante 10 dias em meio contendo sais minerais e *d*-limoneno como fonte de carbono, na concentração de 0 a 10%. Avaliação por turbidimetria.

Comparando-se o efeito da toxicidade do *d*-limoneno refletido no crescimento das 4 bactérias estudadas (0,1D; LP-1 1; LP-1 3 e SD-1 3), mostrados nas Figuras 32 a 35, observa-se que a linhagem que apresentou maior crescimento foi a 0,1D, com medida máxima de absorbância igual a 1,9, seguida pelas linhagens LP-1 3; SD-1 3 e LP-1 1. Esta última apresentou crescimento muito baixo em todas as concentrações e dias estudados.

Observando-se as mesmas Figuras, verificou-se que os microrganismos apresentaram crescimento máximo quando foi adicionado ao meio 2 ou 3% de *d*-limoneno. Este estudo concorda com o apresentado por MARS, GORISSEN e VAN DEN BELD (2001), que utilizando a bactéria *Pseudomonas*, mostraram que o microrganismo foi capaz de utilizar o *d*-limoneno como fonte de carbono, quando crescido em meio de cultura contendo 2,4% do monoterpene. Entretanto não estão de acordo com o trabalho de SPELMANS, BIJLSMA e EGGINK (1998) que utilizaram concentrações mais altas de *d*-limoneno (5%) para crescimento de *Pseudomonas putida*, nem com os trabalhos de ACOSTA et al. (1996) e MAZAS e

RUIZ (1995) que utilizaram concentrações menores (0,25%) para estudo de degradação por *P. aeruginosa*.

Observou-se também, através deste experimento, que a medida de absorbância aumentou, indicando o crescimento do microrganismo, com o período de incubação dos mesmos, com exceção da linhagem LP-1 1, que apresentou crescimento semelhante em todo tempo de cultivo. Segundo CHATTERJEE e BHATACHARYYA (2001), que estudaram a degradação do *d*-limoneno por *Pseudomonas putida*, o crescimento do microrganismo e o consumo do monoterpeno aumenta com o período de incubação, observado pelo aumento da massa seca. Entretanto, os autores observaram que o consumo do *d*-limoneno pelo microrganismo permaneceu o mesmo após 5 dias de cultivo, enquanto o crescimento das células aumentou até o 7º dia de crescimento. Segundo os autores, o crescimento do microrganismo e, portanto, o aumento da massa seca, pode ter ocorrido devido ao consumo de outros nutrientes do meio e não do monoterpeno.

A partir dos resultados apresentados anteriormente (medida da atividade enzimática, porcentagem de degradação por CLAE e avaliação da toxicidade do composto às linhagens selecionadas), tanto da avaliação do tempo de crescimento, quanto do efeito da concentração do monoterpeno, concluiu-se que os melhores resultados foram obtidos quando os microrganismos foram crescidos por 3 e 5 dias, na concentração de 3% de *d*-limoneno, sob condição estacionária. Os microrganismos que apresentaram as melhores taxas de crescimento foram 0,1D, LP-1 3 e 898, sendo, portanto, estes escolhidos para a identificação e o estudo em efluente industrial. Apesar da linhagem LP-1 1 ter apresentado altas porcentagem de degradação, a bactéria foi descartada, pois não apresentou crescimento satisfatório no teste de toxicidade.

5.6 Identificação dos microrganismos isolados do efluente industrial

As duas bactérias selecionadas anteriormente, 0,1D e LP-1 3, são bacilos Gram-negativos e foram identificadas através de microscopia óptica e testes bioquímicos. Na Tabela 9, observam-se os resultados dos testes utilizados para identificação.

Tabela 9: Resultados dos testes de identificação bioquímica das linhagens 0,1D e LP-1 3.

TESTE BIOQUÍMICO	Linhagem 0,1D	Linhagem LP-1 3
KOH	(+)	(+)
Catalase	(+)	(+)
Oxidase	(+)	(-)
ONPG	(-)	(+)
Indol	(-)	(-)
Hidrólise da gelatina	(-)	(-)
Citrato	(+)	(+)
Vermelho de metila	(-)	(-)
Voges Proskauer	(-)	(+)
H ₂ S	(-)	(-)
Lactose	(-)	(+)
Glicose	(+)	(+)
Nitrato	(-)	(+)
Uréia	(-)	(+)
Oxidação/ Fermentação	Oxidação	Oxidação/ Fermentação
Produção de gás	(-)	(+)
Motilidade	(+)	(+)
MacConkey	Colônias brancas	Colônias rosas brilhantes
EMB	Colônias transparentes	Colônias rosadas e cremosas
Agar SS	Colônias amarelas	Colônias amarelas-rosadas
Meio PAF	Colônias fluorescentes	Colônias branco-cremes

ONPG: o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo

EMB: Agar Eosina Metil blue (Eosina Azul de Metileno)

SS: Agar *Salmonella-Shigella*

PAF: *Pseudomonas* Agar F

De acordo com os resultados obtidos nos testes bioquímicos, a linhagem 0,1D pode ser caracterizada como sendo do gênero *Pseudomonas* sp. e a linhagem LP-1 3, *Enterobacter* sp.. O gênero *Pseudomonas* é muito comum em

solo e outros ambientes naturais (TORTORA, FUNKE e CASE, 2000). Estas bactérias são capazes de sintetizar um grande número de enzimas diferentes e provavelmente contribuem significativamente para a decomposição de substâncias químicas, tais como, pesticidas, PCBs e petróleo (TANDLICH, BREZNÁ e DERCOVÁ, 2001; TORTORA, FUNKE e CASE, 2000). Vários são os trabalhos que demonstram que este microrganismo pode atuar na transformação do *d*-limoneno em outros compostos, como ácido perílico e α -terpineol, sendo várias as espécies de *Pseudomonas* capazes de utilizar o *d*-limoneno como fonte de carbono: *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. gladioli* (CHATTERJEE & BHATTACHARYYA, 2001; MARS, GORISSEN e VAN DEN BELD, 2001; SPEELMANS, BIJLSMA e EGGINK, 1998; SAVITHIRZ et al., 1998; ACOSTA et al., 1996). Além disso, outros trabalhos demonstraram a habilidade de certas *Pseudomonas* em degradar totalmente o *d*-limoneno (MISRA e PAVLOSTATHIS, 1997; LEBLOND, APPLGATE e MENN, 2000).

Não foi encontrado nenhum trabalho que demonstre a capacidade de *Enterobacter* sp. de degradar monoterpenos, em especial, o *d*-limoneno. Entretanto, o trabalho de HEERDEN et al. (2002) mostrou que este microrganismo pode estar presente no efluente da indústria cítrica. Além disso, *Enterobacter* sp. pertence a família *Enterobacteriaceae* e apesar de não comprovada sua capacidade de degradar o *d*-limoneno, sabe-se que outros membros desta família já foram capazes de metabolizar monoterpenos (DHERE e DHAVLIKAR, 1970). WRIGHT et al. (1986), trabalhando com *Serratia marcescens*, uma enterobactéria, mostraram que este microrganismo foi capaz de oxidar α -pineno para α -terpineol.

A linhagem fúngica 898 foi identificada através dos aspectos macroscópicos das colônias (Figura 36) e pelas características microscópicas (Figura 37).

O fungo foi identificado como sendo do gênero *Fusarium* sp. e pertence à coleção de microrganismos do Laboratório da UNICAMP. Sabe-se que este microrganismo é um fungo ligninolítico, mas sua capacidade de degradar monoterpenos ainda não havia sido testada. Entretanto, este microrganismo mostrou-se capaz de degradar vários compostos tóxicos ao meio ambiente como ácido tânico, ácido lignossulfônico, fenol, HAPs (antraceno, naftaleno, pireno, benzo[a]pireno) (CLEMENTE, 1997; FALCONI, 1998; CLEMENTE, 2002). Existem

trabalhos que demonstram que fungos pertencentes a este gênero são capazes de atuar sobre os monoterpenos. Em trabalho com *d*-limoneno, *Fusarium verticilloides* utilizou o monoterpeno produzindo ácido perílico (OLIVEIRA e STRAPASSON, 2000).



Figura 36: Fungo 898, crescido em meio de cultura PDA. Observação do aspecto macroscópico da colônia.

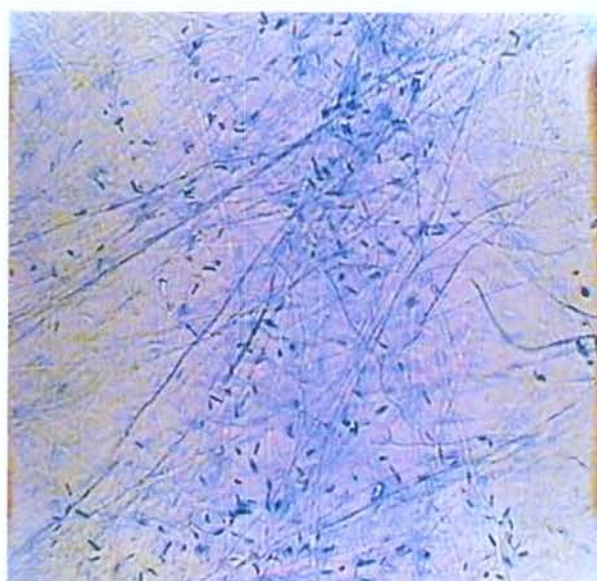


Figura 37: Foto do fungo 898 - Observação dos aspectos microscópicos da colônia.

5. 7 Estudo do crescimento microbiano no efluente industrial

Nesta etapa do trabalho, os microrganismos (0,1D; LP-1 3 e 898) foram cultivados no próprio efluente industrial de onde as linhagens foram isoladas: Calha, Água Preta, Saída do Sedimento e Lagoa de Polimento. Uma vez que o efluente industrial não apresenta o *d*-limoneno, em condições operacionais normais, este foi adicionado na concentração de 3%. Foi utilizado efluente não esterilizado e previamente esterilizado para saber se os microrganismos presentes no meio influenciariam as linhagens em estudo. O tempo de incubação do experimento foi de 3 e 5 dias e a utilização do monoterpene pelos microrganismos foi determinada pela degradação por CLAE (%), atividades enzimáticas, produção de biosurfactantes e efeito da toxicidade sobre as linhagens estudadas.

5.7.1 Degradação do *d*-limoneno

Pela Figura 38 observa-se que, de modo geral, os microrganismos utilizaram maior porcentagem de *d*-limoneno como fonte de carbono, quando crescidos em efluente previamente esterilizado por 3 dias. Entretanto, no efluente coletado no ponto SD e esterilizado nenhum dos microrganismos conseguiu degradar o monoterpene. Os melhores resultados foram observados para a bactéria *Pseudomonas* sp (0,1D), quando crescida no meio C estéril (75%) e não estéril (70%) e para o fungo *Fusarium* sp (898) em meio AP estéril (68%). Quando os microrganismos foram cultivados em efluente coletado na Calha (C) produziram uma maior porcentagem de degradação do *d*-limoneno.

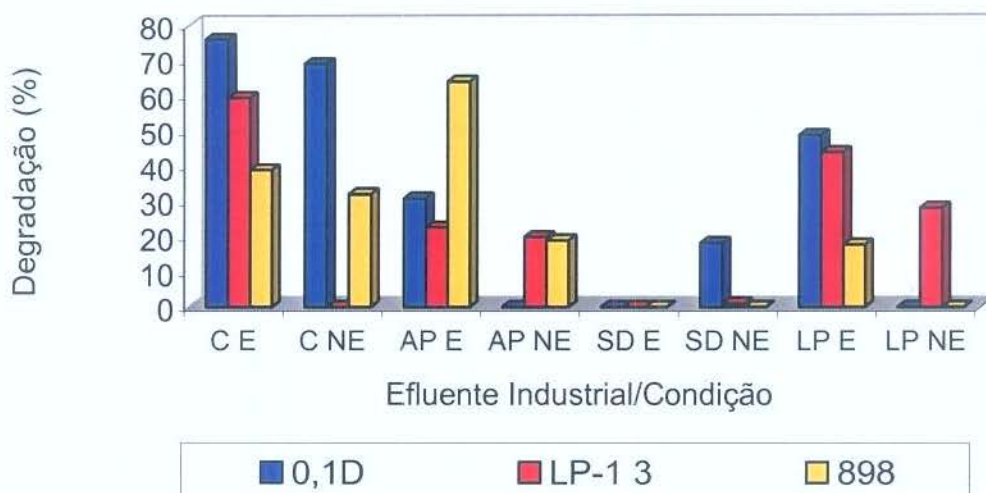


Figura 38: Degradação (%) do *d*-limoneno pelas linhagens 0,1D; LP-13 e 898, cultivadas em meio contendo o efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE), na concentração de 3% de *d*-limoneno por 3 dias. **C** = Calha; **AP** = Água Preta; **SD** = Saída do Sedimento; **LP** = Lagoa Polimento.

Quando os microrganismos foram cultivados em efluente industrial por 5 dias, somente a bactéria *Pseudomonas* sp (0,1D) degradou grande porcentagem de *d*-limoneno (Figura 39). O melhor resultado foi obtido quando a bactéria cresceu em meio contendo efluente da lagoa de polimento esterilizado (75%). O fungo *Fusarium* sp (898) não foi capaz de degradar o monoterpeno em nenhum dos meios estudados. Já *Enterobacter* sp (LP-13) conseguiu degradar o composto em pequena quantidade (20%) no efluente coletado da água preta (AP), sendo que nos demais efluentes esse microrganismo não foi capaz de degradá-lo.

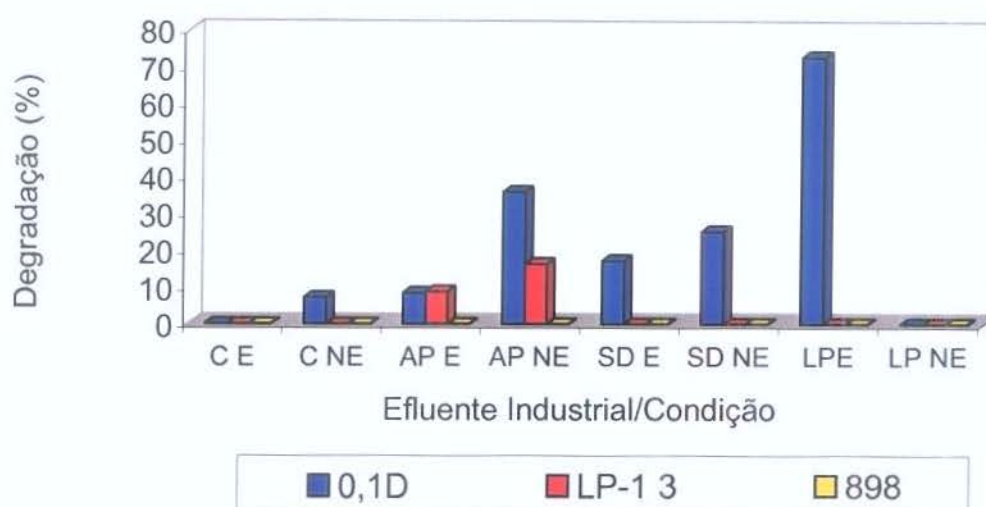


Figura 39: Degradação (%) do *d*-limoneno pelas linhagens 0,1D; LP-13 e 898 cultivadas em meio contendo o efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE) na concentração de 3% de *d*-limoneno por 5 dias. **C** = Calha; **AP** = Água Preta; **SD** = Saída do Sedimento; **LP** = Lagoa Polimento.

O trabalho realizado pela Agência de Proteção Ambiental dos E.U.A., que conduziu estudo de degradação de monoterpenos em Sistemas Municipais de Tratamento de Lodo Ativado, mostrou que este processo reduziu 90% do *d*-limoneno que entrou na Estação de Tratamento de Efluentes, o qual foi biodegradado para outros compostos (ALVAREZ et al., 1999). Os autores explicam que as concentrações utilizadas nestes estudos (10.000µg de *d*-limoneno por litro) são representativas de efluente municipal e em tratamento de efluente industrial a concentração de monoterpeno encontrada pode ser muito maior. Não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a degradação do *d*-limoneno em efluente industrial, entretanto, observando os dados obtidos da degradação do *d*-limoneno (Figuras 38 e 39), verificou-se que os microrganismos foram capazes de utilizar o monoterpeno quando presente em altas concentrações no efluente de indústria cítrica.

Pode-se concluir também que, de modo geral, os microrganismos, quando cultivados no efluente industrial previamente esterilizado, foram capazes de degradar uma maior porcentagem do *d*-limoneno do que quando cultivados em efluente não estéril. Isto ocorreu, provavelmente, porque os microrganismos

presentes no efluente industrial poderiam estar competindo com aqueles adicionados, por fontes de carbono mais simples, presentes no efluente industrial. É possível que a competição por nutrientes impediu o crescimento normal dos microrganismos e, assim, a degradação do *d*-limoneno. Já no efluente estéril, isto não aconteceu porque a esterilização provocou a morte da microbiota endógena e os microrganismos, aqui estudados, utilizaram as fontes de carbono disponíveis no efluente, crescendo melhor e, assim, aumentando a degradação do monoterpeneo em meio esterilizado. Já, o crescimento do microrganismo em um determinado efluente (C, AP, SD, LP) e não em outro, ocorreu devido à diferença de nutrientes presentes nestes.

5.7.2 Atividades enzimáticas

Foram determinadas as enzimas intracelulares (Catecol 1,2 dioxigenase; Catecol 2,3 dioxigenase ; Protocatecol 3,4 dioxigenase e Aldeído desidrogenase) e as enzimas extracelulares (Lacase; Peroxidase; Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase), após crescimento dos microrganismos em efluente industrial estéril e não estéril, por 3 e 5 dias. A produção de enzima lacase pelos microrganismos com 3 dias de crescimento está mostrada na Figura 40. Observa-se que a produção da enzima foi semelhante em todos os meios utilizados, tanto estéril, quanto não estéril, sendo o melhor resultado apresentado pelo *Fusarium* sp (898), quando crescido em meio SD não estéril com valor aproximado de 2,0 U/L.

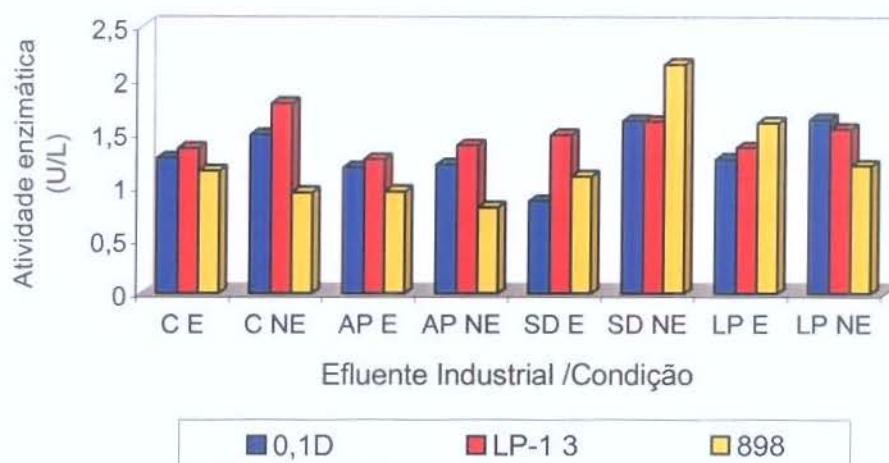


Figura 40: Atividade da enzima lacase para as linhagens 0,1D; LP-1 3 e 898 cultivadas em efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE) na concentração de 3% de *d*-limoneno por 3 dias. **C** = Calha; **AP** = Água Preta; **SD** = Saída do Sedimento; **LP** = Lagoa Polimento.

Quando as linhagens foram cultivadas por 5 dias, a produção de lacase também foi semelhante tanto nos efluentes estéreis como não estéreis (Figura 41), assim como, nos diferentes dias de cultivo. A maior produção de lacase, com 5 dias, foi obtida pela bactéria *Pseudomonas* 0,1D em meio SD não estéril (2,0 U/L).

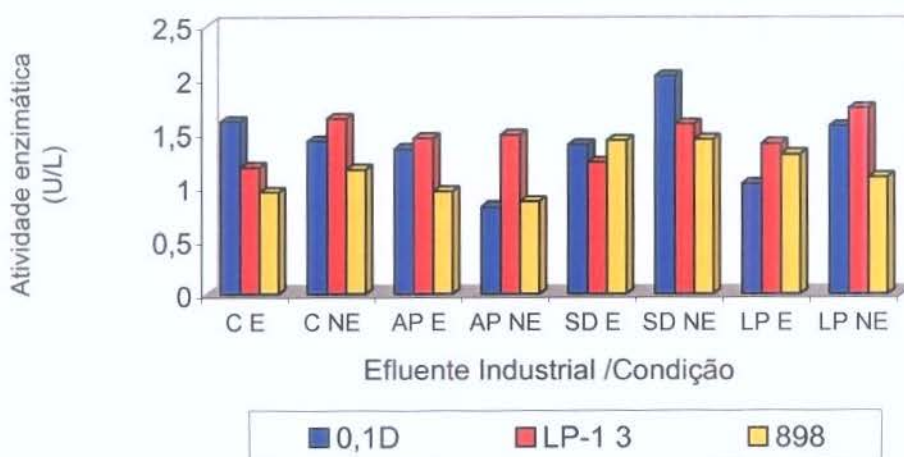


Figura 41: Atividade da enzima lacase para as linhagens 0,1D; LP-1 3 e 898 cultivadas em efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE) na concentração de 3% de *d*-limoneno por 5 dias. **C** = Calha; **AP** = Água Preta; **SD** = Saída do Sedimento; **LP** = Lagoa Polimento.

As Figuras 42 e 43 mostram os resultados da produção de peroxidase, quando os microrganismos foram cultivados nos efluentes industriais estéreis e não estéreis, por 3 e 5 dias, respectivamente. Pode-se observar pelas Figuras que a produção de peroxidase foi menor que a de lacase. Com 3 dias de crescimento (Figura 42), a linhagem *Pseudomonas* sp (0,1D) apresentou a melhor atividade da enzima em meio LP (2,3U/L) não estéril e a menor atividade em meio SD não estéril (0,4U/L). As demais linhagens produziram a enzima com valores semelhantes em todos os efluentes utilizados, sendo que a bactéria *Enterobacter* sp (LP-1 3) e o fungo *Fusarium* sp (898) apresentaram a maior atividade desta enzima em meio SD, não estéril (1,4U/L) e estéril (1,4U/L), respectivamente .

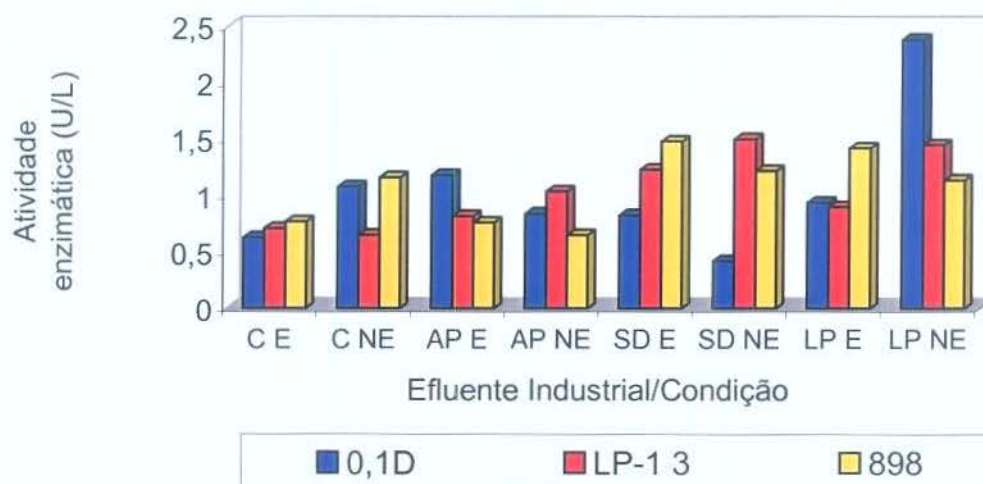


Figura 42: Atividade da enzima peroxidase para as linhagens 0,1D; LP-1 3 e 898 cultivadas em efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE) na concentração de 3% de *d*-limoneno por 3 dias. **C** = Calha; **AP** = Água Preta; **SD** = Saída do Sedimento; **LP** = Lagoa Polimento.

Quando crescidos por 5 dias (Figura 43), a maior produção de peroxidase também foi apresentada por *Pseudomonas* sp (0,1D) no meio LP não estéril (2,0U/L), seguida da *Enterobacter* sp. (LP-1 3), no mesmo meio (1,5U/L). As menores atividades desta enzima ocorreram quando os microrganismos foram cultivados em meio AP estéril. Nos demais efluentes utilizados, a enzima foi produzida pelos microrganismos de maneira semelhante nas condições de estudo.

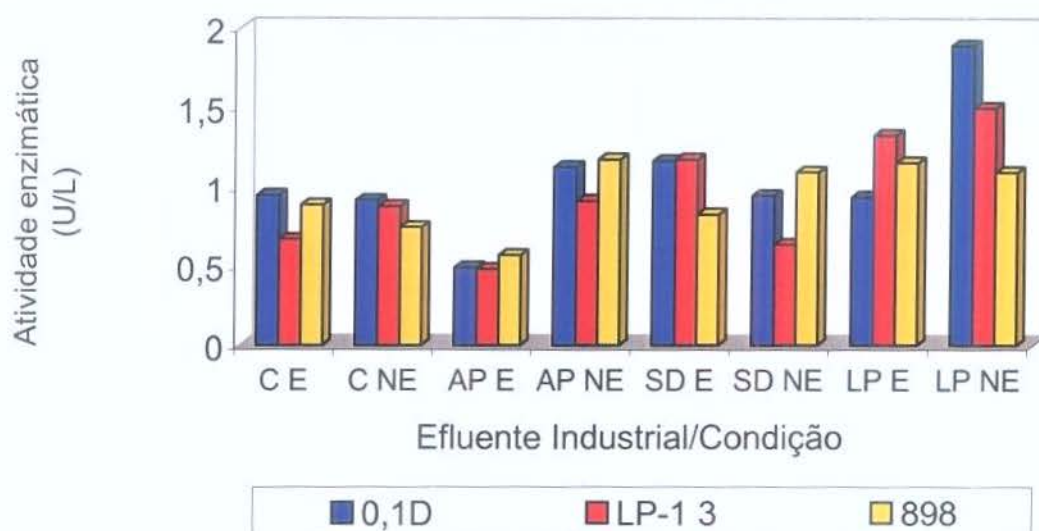


Figura 43: Atividade da enzima peroxidase para as linhagens 0,1D; LP-1 3 e 898 cultivadas em efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE) na concentração de 3% de *d*-limoneno por 5 dias. **C** = Calha; **AP** = Água Preta; **SD** = Saída do Sedimento; **LP** = Lagoa Polimento.

Na Figura 44, observam-se os resultados da produção de LiP e MnP pelo fungo *Fusarium* sp. (898), quando cultivado em efluente industrial por 3 e 5 dias. A maior produção de LiP foi observada em meio água preta estéril (AP) com 5 dias de crescimento (6,8 U/L). As maiores atividades de MnP foram produzidas pelo fungo crescido em meio AP (4,9U/L) e LP não estéril (4,0 U/L) e SD estéril (4,0U/L) com 3 dias de crescimento. Esta enzima não foi produzida pelo microrganismo quando este foi crescido em efluente C. Atividade de LiP não foi produzida nos meios LP estéril e SD e LP não estéril em nenhum dos dias estudados.

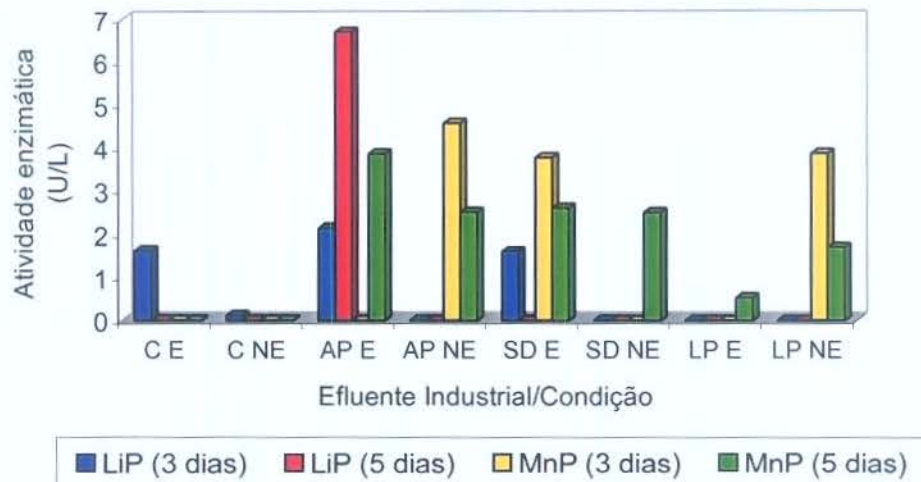


Figura 44: Atividade de Lignina Peroxidase (LiP) e Manganês Peroxidase (MnP) para as linhagens 0,1D; LP-1 3 e 898 cultivadas em efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE) contendo 3% de *d*-limoneno por 3 e 5 dias. **C** = Calha; **AP** = Água Preta; **SD** = Saída do Sedimento; **LP** = Lagoa Polimento.

Não foram encontrados trabalhos relacionando a degradação do *d*-limoneno com a produção de enzimas ligninolíticas. Entretanto, uma vez que, o sistema enzimático envolvido na despolimerização e mineralização da lignina é não específico, estas enzimas podem estar envolvidas na degradação de monoterpenos, assim como, os microrganismos que as produzem. Vários trabalhos demonstram que algumas linhagens de *Fusarium* foram capazes de colonizar, modificar e degradar a lignina através da produção de lacase, LiP e MnP (REGALADO et al., 1999; SPARRAT et al., 2000; KWON e ANDERSON, 2002). Também já foi demonstrado que *Pseudomonas* sp. pode atuar na degradação da lignina através da produção de enzimas ligninolíticas, principalmente, lacase (UMA, KALAISELVI e SUBRAMANIAN, 1994).

De acordo com a Figura 45, observa-se que a maior produção da enzima catecol 1,2 dioxigenase foi apresentada por *Enterobacter* sp. (LP-1 3), quando cultivada por 3 dias em efluente SD estéril (0,34 U/L). No meio C, tanto estéril como não estéril, ambos microrganismos não conseguiram produzir esta enzima intracelular. No meio LP estéril e não estéril somente *Enterobacter* sp. (LP-1 3) produziu a enzima, tanto com 3 dias como com 5 dias de crescimento. Vários pesquisadores estudando a bactéria *Pseudomonas* demonstraram que ela foi

capaz de produzir catecol 1,2 dioxigenase para degradação de compostos tóxicos (MURAKAMI et al., 1998; LIPTHAY et al., 1999; LEBLOND, APPLEGATE e MENN, 2000).

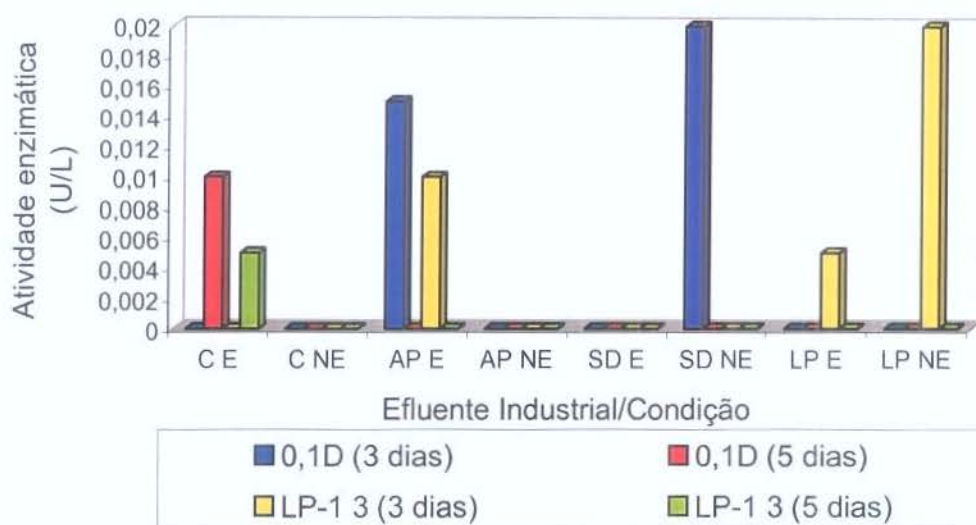


FIGURA 45: Atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase pelas linhagens 0,1D; LP-1 3 e 898 cultivadas em efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE) contendo 3% de *d*-limoneno por 3 e 5 dias. **C** = Calha; **AP** = Água Preta; **SD** = Saída do Sedimento; **LP** = Lagoa Polimento.

A maior produção da enzima Catecol 2,3 dioxigenase foi obtida pelas bactérias *Pseudomonas* sp. (0,1D) e *Enterobacter* sp. (LP-1 3), após 3 dias em meio SD não estéril e LP, respectivamente (Figura 46). Nos meios C e AP não estéril e SD estéril, os microrganismos não produziram a enzima em nenhum dos dias estudados.

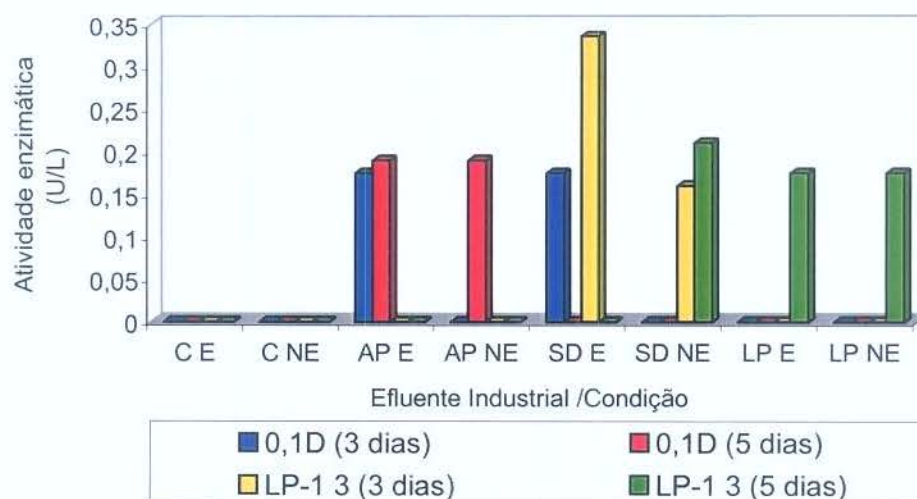


Figura 46: Atividade da enzima catecol 2,3 dioxigenase pelas linhagens 0,1D; LP-1 3 e 898 cultivadas em efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE) contendo 3% de *d*-limoneno por 3 e 5 dias. **C** = Calha; **AP** = Água Preta; **SD** = Saída do Sedimento; **LP** = Lagoa Polimento.

As enzimas protocatecol 3,4 dioxigenase e aldeído dehidrogenase também foram determinadas, mas os microrganismos apresentaram baixas atividades, com valores entre 0,0 e 0,020 U/L.

A produção enzimática, tanto das enzimas extracelulares como intracelulares, ao contrário da porcentagem de degradação do *d*-limoneno, foi maior em meio sem prévia esterilização. Isto pode ser devido ao fato de que em meio não estéril a competição por nutrientes facilmente disponíveis é maior, levando os microrganismos a procurarem outras fontes de carbono e produzirem enzimas capazes de degradarem fontes de carbono menos acessíveis e, possivelmente, ativando o sistema secundário, o que explica a presença das enzimas ligninolíticas. A produção das enzimas em picos pode estar relacionada à necessidade da bactéria em ter acesso a fontes de carbono. Ao entrar em contato com o composto o microrganismo produz as enzimas necessárias para torná-lo acessível e a partir do momento em que o composto se torna disponível, as linhagens param de produzir as enzimas. À medida que a fonte de carbono torna-se de difícil acesso, as mesmas voltam a serem produzidas.

5.7.3 Efeito da toxicidade do *d*-limoneno aos microrganismos crescidos em efluente industrial

5.7.3.1 Determinação do crescimento fúngico

Pela Figura 47 observa-se que os maiores valores de massa seca foram obtidos quando *Fusarium* sp. (898) foi crescido em efluente industrial, tanto estéril como não estéril por 3 dias exceto no efluente SD estéril. O fungo apresentou maiores valores de massa seca, em meios LP estéril (100mg/L) e SD e LP não estéril com 3 dias de crescimento, com atividade igual a 90mg/L.

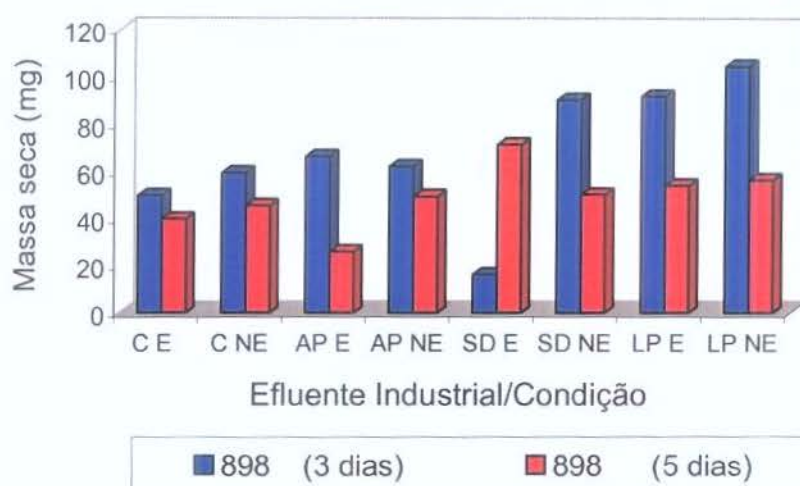


FIGURA 47: Produção de biomassa pelo fungo *Fusarium* sp. (898) cultivado por 3 e 5 dias em meio contendo efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE) e 3% de *d*-limoneno como fonte de carbono. **C** = Calha; **AP** = Água Preta; **SD** = Saída do Sedimento; **LP** = Lagoa de Polimento.

5.7.3.2 Determinação do crescimento bacteriano através da medida de turbidez do meio de cultura

As Figuras 48 a 51 apresentam os resultados do experimento de toxicidade para bactérias *Pseudomonas* sp. (0,1D) e *Enterobacter* sp. (LP-1 3) crescidas no efluente industrial não estéril, através da medida de absorbância do meio de cultura, avaliando-se, assim, a crescimento microbiano das mesmas.

A Figura 48 corresponde ao experimento realizado utilizando-se o meio contendo efluente coletado da calha. *Pseudomonas* sp. (0,1D) cresceu melhor quando utilizado o *d*-limoneno, na concentração de 7% (Figura 48 A). Neste

mesmo meio *Enterobacter* sp. (LP-1 3) (Figura 48 B) cresceu melhor em 8% de *d*-limoneno. Ambas apresentaram maior crescimento quanto maior o período de incubação.

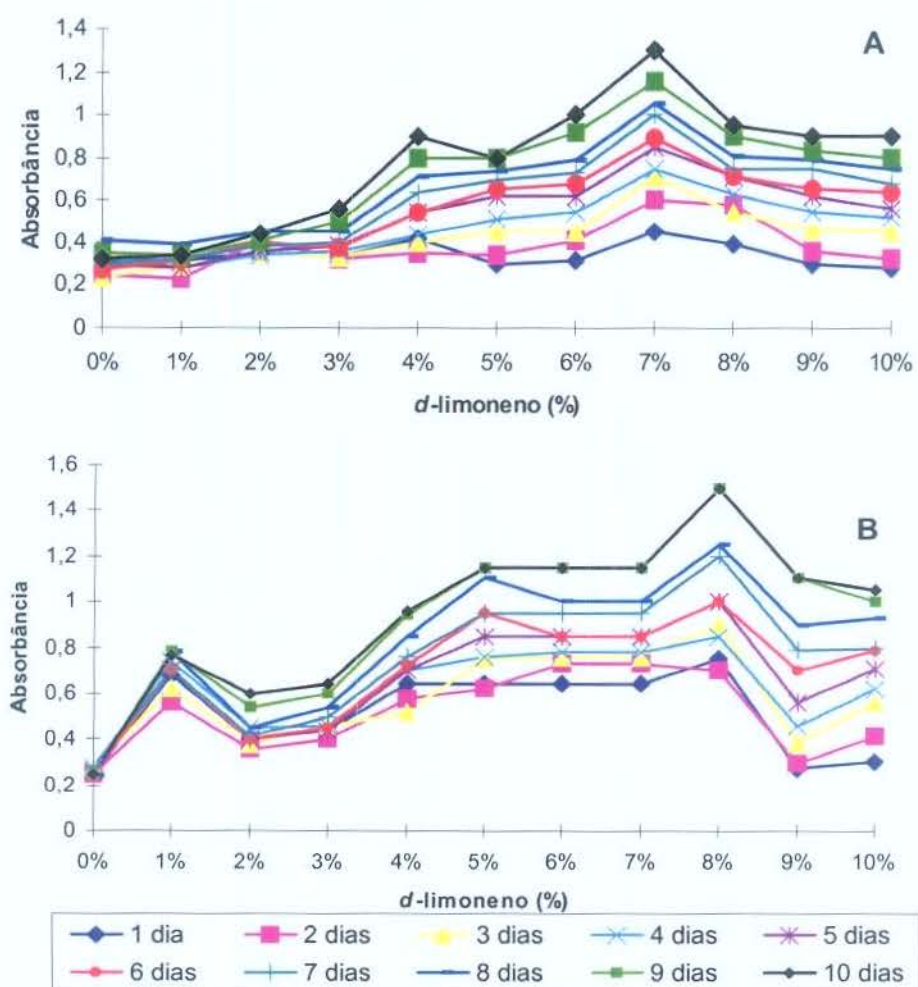


FIGURA 48: Toxicidade das linhagens 0,1D (A) e LP-1 3 (B) ao *d*-limoneno, quando cultivadas por 10 dias em meio contendo efluente industrial Calha e o monoterpeno, na concentração de 0 a 10%.

Nas Figuras 49 A e B, observa-se o crescimento das bactérias *Pseudomonas* sp. (0,1D) e *Enterobacter* sp. (LP-1 3) em meio AP, respectivamente. Para *Pseudomonas* sp. (0,1D) o melhor crescimento ocorreu em

1, 2 e 3% de *d*-limoneno. A partir de 4%, provavelmente, o monoterpeno tornou-se tóxico ao microrganismo, diminuindo seu crescimento. Já para *Enterobacter* sp. (LP-1 3), as melhores concentrações de *d*-limoneno foram de 4 a 7% e ele só se tornou tóxico ao microrganismo a partir da concentração de 8% do monoterpeno.

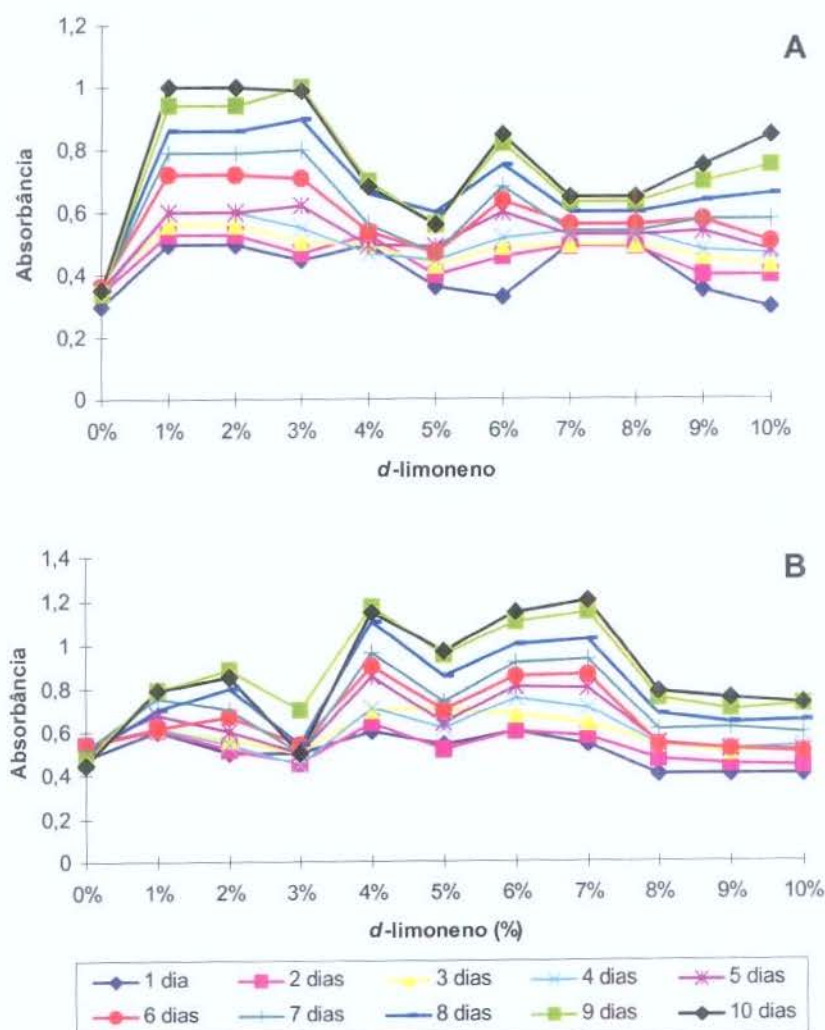


Figura 49: Toxicidade das linhagens 0,1D (A) e LP-1 3 (B) ao *d*-limoneno, quando cultivadas por 10 dias em meio contendo efluente industrial Água Preta e o monoterpeno, na concentração de 0 a 10%.

Quando cultivadas em meio SD, observa-se, nas Figuras 50 A e B, pouca alteração no crescimento dos microrganismos em todas as concentrações de *d*-

limoneno utilizadas. *Pseudomonas* sp. (0,1D) praticamente não cresceu durante todo período do experimento. Para *Enterobacter* sp. (LP-1 3), observa-se um pequeno crescimento a partir da concentração 6% até a 9%, onde o crescimento do microrganismo começou a diminuir.

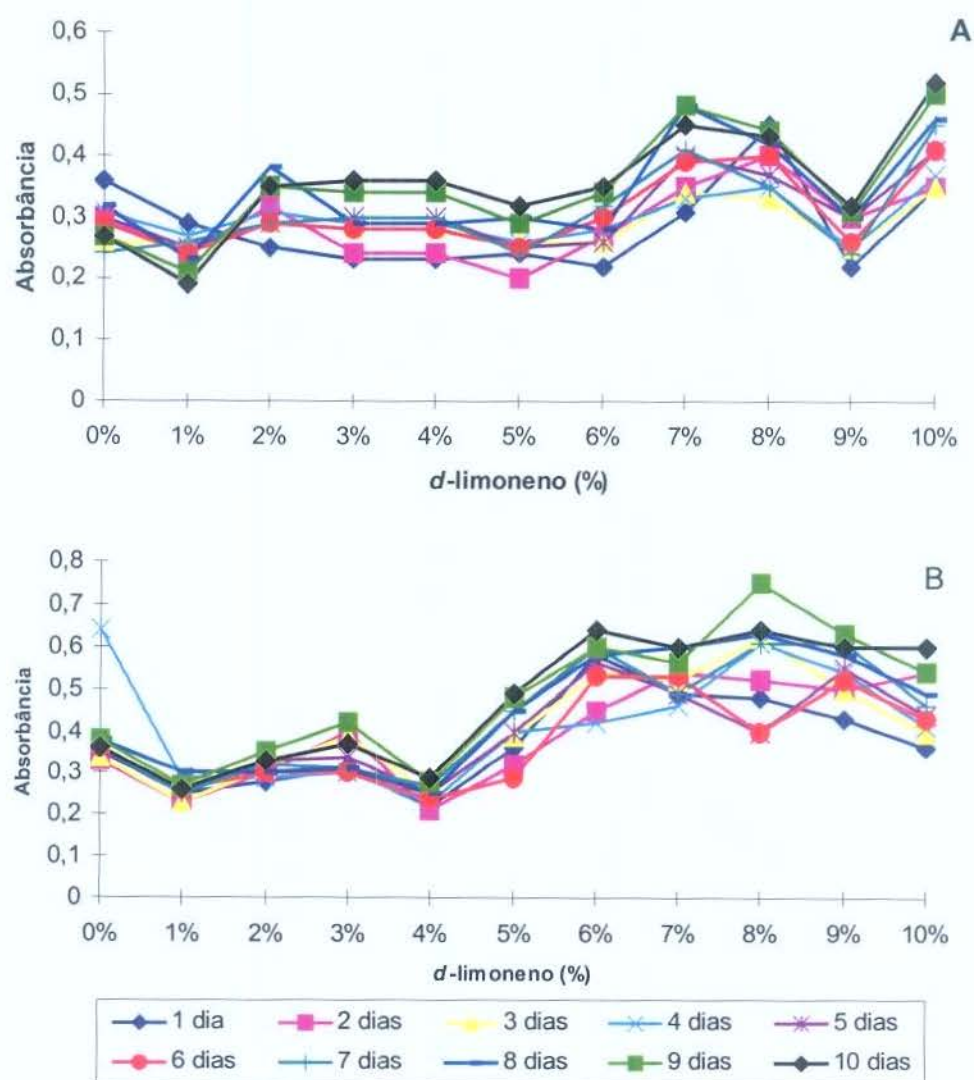


Figura 50: Toxicidade das linhagens 0,1D (A) e LP-1 3 (B) ao *d*-limoneno, quando cultivadas por 10 dias em meio contendo efluente industrial Saída do Sedimento (SD) e o monoterpeno, na concentração de 0 a 10%.

Quando utilizado o meio LP o crescimento dos microrganismos também foi baixo (Figuras 51 A e B). Para *Pseudomonas* sp. (0,1D) foi observado o maior

crescimento em meio contendo 7% de *d*-limoneno. Já para *Enterobacter* sp. (LP-1 3) o maior crescimento ocorreu na concentração de 3% do monoterpreno. Embora tenha ocorrido uma variação de crescimento com a concentração utilizada, observa-se que os microrganismos estudados cresceram pouco em todas concentrações de *d*-limoneno, no meio LP.

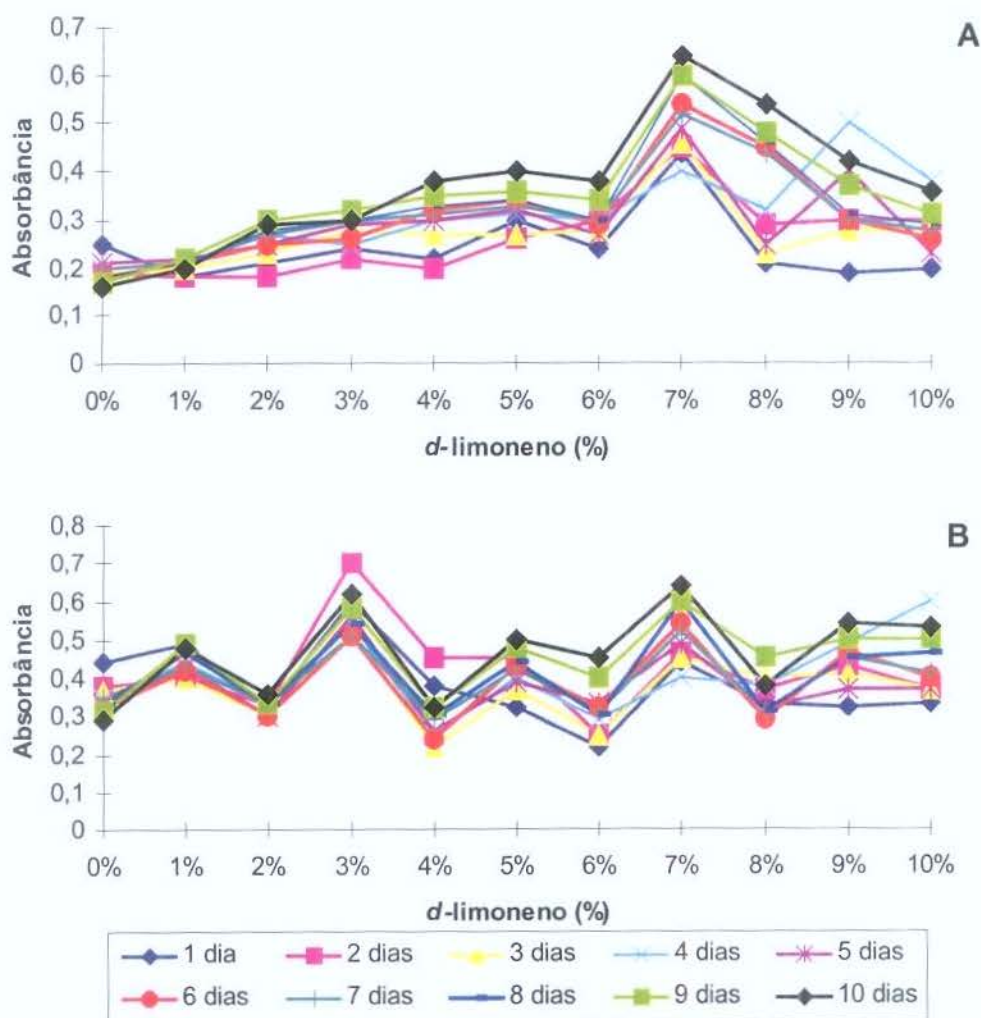


Figura 51: Toxicidade das linhagens 0,1D (A) e LP-1 3 (B) ao *d*-limoneno, quando cultivadas por 10 dias em meio contendo efluente industrial Lagoa de Polimento e o monoterpreno como única fonte de carbono, na concentração de 0 a 10%.

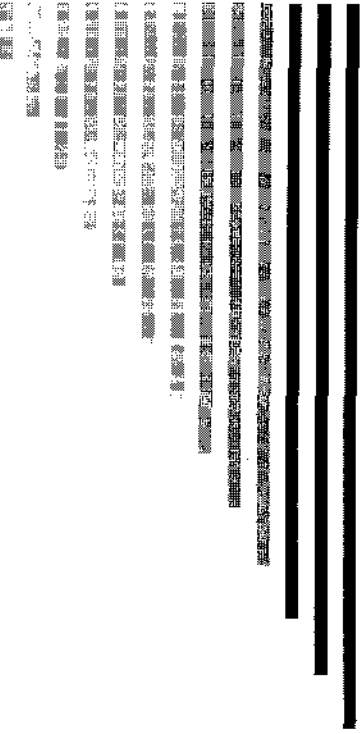
Comparando-se os resultados apresentados no teste de toxicidade quando os microrganismos foram crescidos no meio de sais minerais (Figuras 32 a 35) e

quando crescidos em efluente industrial (Figuras 48 a 51), observa-se que o crescimento de todos microrganismos estudados foi melhor quando se utilizou o meio contendo somente sais minerais e *d*-limoneno. Este fato deve-se, provavelmente, porque o efluente industrial pode conter compostos tóxicos ao microrganismo, além do *d*-limoneno, impedindo seu crescimento.

Após a avaliação da toxicidade do monoterpeno aos microrganismos, também foi determinada a produção de biosurfactante, tanto água-óleo como óleo-água, mas os microrganismos não apresentaram resultados satisfatórios, mostrando que, provavelmente, a produção deste composto não interfere na degradação do *d*-limoneno. Uma vez que o papel dos surfactantes é permitir o crescimento dos microrganismos nos substratos imiscíveis, reduzindo a tensão superficial e tornando-os mais viáveis a degradação e ao metabolismo (FIECHTER, 1992), é provável que os microrganismos estudados aqui, utilizaram outros meio para o transporte do composto para dentro da célula para sua possível degradação. Outra explicação é que como o *d*-limoneno é um composto lipofílico, ele pode difundir-se livremente através da membrana celular (WERF, SWARTS e BONT, 1999), não sendo necessária a produção de biosurfactantes pelos microrganismos.

Através dos resultados obtidos, verifica-se que os microrganismos estudados podem ser utilizados, futuramente, no tratamento de efluente de indústria cítrica, pois foram capazes de degradar altas concentrações do monoterpeno, quando presente no próprio efluente industrial, em poucos dias.

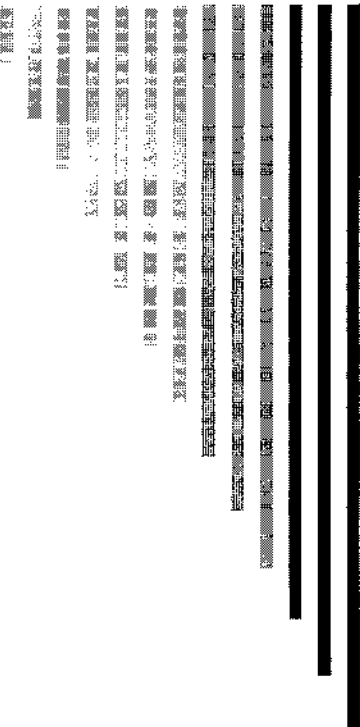
Entretanto, serão necessários estudos mais detalhados sobre o comportamento destes no efluente industrial, quanto à sua capacidade de crescer e competir como os demais microrganismos presentes no efluente e de utilizar os nutrientes presentes para seu crescimento e metabolismo.



CONCLUSÃO

- Foram isolados 572 microrganismos do efluente da indústria cítrica;
- Do total de microrganismos estudados, sendo 628, 5 foram pré-selecionados, 0,1D, LP-1 1, LP-1 3, SD-1 3 e 898, pela sua capacidade de crescer e degradar altas porcentagens de *d*-limoneno;
- Pelo teste de toxicidade, o maior crescimento foi apresentado pela linhagem 0,1D seguida pelas linhagens LP-1 3, LP-1 1 e SD-1 3;
- Quanto à avaliação do tempo de crescimento e ao estudo da concentração de *d*-limoneno no meio, avaliados pela atividade enzimática, % de degradação do *d*-limoneno e teste de toxicidade, somente 3 microrganismos, 0,1D, LP-1 3 e 898, foram selecionados;
- A concentração em que os microrganismos apresentaram melhor crescimento, bem como maior porcentagem de degradação do *d*-limoneno e as melhores atividades enzimáticas foi na concentração de 3% de fonte de carbono;
- As maiores porcentagens de degradação do *d*-limoneno e atividades enzimáticas foram obtidas quando as linhagens foram crescidas por 3 dias.
- Os microrganismos apresentaram maiores porcentagens de degradação do monoterpeno quando crescidos em meio efluente industrial estéril. Entretanto, as maiores atividades enzimáticas foram obtidas em efluente não estéril.
- Os microrganismos estudados foram capazes de produzir as enzimas extracelulares, principalmente a lacase e a peroxidase, e as enzimas intracelulares, principalmente a catecol 1,2 dioxigenase e elas podem estar atuando na degradação do composto.

- Os microrganismos foram identificados como *Pseudomonas* sp., e *Enterobacter* sp. e *Fusarium* sp., sendo as bactérias isoladas do efluente industrial e o fungo pertencente à coleção de microrganismos do laboratório.
- Os 3 microrganismos identificados foram capazes de degradar altas concentrações de *d*-limoneno, crescendo melhor quando utilizada a concentração de 3% do monoterpeno por 3 dias.



REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

_ABECITRUS. Subprodutos da laranja. Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/subprobr.html> . Acesso em: 02 mai. 2004.

ACOSTA, M.; MAZAS, N.; MEJIAS, E.; PINO, J. Obtención de aromatizantes mediante biotransformación del limoneno por *Pseudomonas aeruginosa*. **Alimentaria**, p. 73-75, mai, 1996.

ADAMS, A.; DEMYTTENAERE, J.C.R.; KIMPE, R.D. Biotransformation o (R)-(+)- and (S)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of the culture conditions. **Food Chemistry**, v. 80, p. 525-534, 2003.

AITKEN, M.D.; VENKATADRI, R.; IRVINE, R.L. Oxidation o phenolic pollutants by a lignin degrading enzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Research**, v. 23, n. 4, p. 443-450, 1989.

ALVAREZ, F.R.; SHAUL, G.M.; KRISHNAN, E.R.; PERRIN, D.L.; RAHMNAN, M. Fate of terpene compounds in activated sludge wastewater treatment systems. **Journal Air & Waste Manage**, v. 49, p. 734-739, 1999.

AMARAL, J. A.; EKINS, A.; RICHARDS, S.R.; KNOWLES,R. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 520-525, 1998.

ANDERSON, R.C.; ANDERSON, J.H. Respiratory toxicity of mattress emissions in mice. **Archives of Environmental Health**, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2000.

APHA, AWWA, WEF. American Public Heath Association – Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association. Inc., Washington, D.C., 1995.

ASTM – American Society for testing and materials – Standard practice for determining resistance of synthetic polymeric materials to fungi. G. 21-90, 1990

ARORA, D.A. Biodelignification of wheat straw by different fungal associations. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 6, p. 57-60, 1995.

BABITSKAYA, V.G. Enzymatic degradation of lignin in plant substrates by micelial fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 30, p. 670-676, 1994.

BAGGI, G.; BARBIERI, P.; GALLI, E.; TOLLARI, S. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 2129-2132, 1987.

BALAJEE, S.; MAHADEVAN, A. Influence of temperature on growth, 2,3-dichlorophenoxyacetic acid degrades o-xylene. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2129; 2132, 1987.

BALAN, D.S.L. **Descoloração de corantes e efluentes têxteis**. Trabalho apresentado ao II Workshop de Biodegradação. Campinas, 2001.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E.S. Veratryl alcohol an inducer of lacase by an ascomycete, *Botryphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93-96, 1996.

BARNHART, E.T.; SARLIN, L.L.; CALDWELL, D.J.; BYRD, J.A.; CORRIER, D.E.; HARGIS, B.M. Evaluation of potential disinfectants for preslaughter broiler crop decontamination. **Poultry Science**, v. 78, n. 1, p. 32-37, 1999.

BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white-rot fungi use the degrade pollutants. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 28, n. 2, p. 78-87, 1994.

BOON, P.J.M.; BOON, D.V.D.; MULDER, G.J. Cytotoxicity and Biotransformation of the anticancer drug perilly alcohol in PC12 cells and in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 167, p. 55-62, 2000.

BORJA, R.; MARTÍN, A.; MAESTRO, R., LUQUE, M.; DURÁN, M.M. Enhancement of the anaerobic digestion of wine distillery wastewater by removal of phenolic inhibitors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 45, p. 99-104, 1993.

BRADDOCK, R.. By-products of citrus fruit. **Food Technology**, p. 74-77, 1995.

BRADDOCK, R.J.; CADWALLADER, K.R. Citrus by-products manufacture for food use. **Food technology**, p. 105-110, 1992.

BRADDOCK, R.J.; TEMELLI, F.; CADWALLADER, K.R. Citrus essential oils - a dossier for material safety data sheets. **Food Technology**, p. 114-116, 1986.

BUGG, T.D.H. Oxygenases: mechanisms and structural motifs for O₂ activation. **Current Opinion In chemical Biology**, v. 5, p. 550-555, 2001.

CADWALLADER, K.R.; BRADDOCK, R.J.; PARISH, M.E. Isolation of α -terpineol dehydratase from *Pseudomonas gladioli*. **Journal Food Science**, v. 57, n. 1, p. 241-244, 1992

CAMERON, M. D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S. D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, p. 751-758, 2000.

CARVALHO, D.F.; MARCHI, D.D.; DURRANT, L.R. Surface active emulsifying agents produced by microorganisms isolated from oil-contaminated soil. **Conference Proceeding – Environmental strategies for the 21st Century**, p. 564-569, 1998.

CHANG, H.C.; ORIEL, P. Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Food Science**, v. 59, n.3, p. 660-662, 1994.

CHANG, Y.C.; KARLBERG, A.T.; MAILBACH, H.I. Allergic contact dermatitis from oxidized *d*-limonene. **Contact Dermatitis**, v. 37, n. 6, p. 308-309, 1997.

CHASTAIN; D.E., DOYLE, E.C.; EUGENE W.S.; CHRISTINE, C.S. **Using limonen-10-ol to kill bacteria, yeast, and fungi**. Int. A01N 031/00. US. n. 5543435. 7Apr., 1994. 6Aug., 1996.

CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D.K.; Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 55, p. 541-546, 2001.

CLEMENTE, A.R. **Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Fungos Ligninolíticos e sua Aplicação na Biorremediação de Solos Contaminados**. 2002. 159p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

CLEMENTE, A. R. **Seleção de microrganismos ligninolíticos, estudo do sistema enzimático produzido e sua relação na degradação de compostos xenobióticos**. 1997. 137 p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL), Lorena, 1997.

- COLLINS, P.J.; DOBSON, A.D.W. Extracellular lignin and manganese peroxidase production by the white-rot fungus *Coriolus versicolor* 290. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 17, n. 9, p. 989-992, 1995.
- COLOCOUSI, A.; SAQIB, K.M.; LEAK, D.J. Mutants of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11617 defective in the catabolism of α -pinene. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 822-830, 1996.
- CONNOR, M.S.; DELANEY, M.; ETTELE, N.; McMANUS, K.; VENTRY, L.S. Treatment plant identifies mystery gas. **Water Environmental & Technology**, v. 5, n. 11, p. 13-14, 1993.
- COOPER, D.; GOLDENBERG, B.G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.
- DAGLEY, S. Biochemical approach to some problems of environmental-pollution. **Essays Biochemistry**, v. 11, p. 81-138, 1975.
- D'ANNIBALE, A.; CRESTINI, D.; DI AMTTIA, E.; SERMANI, G.G. Veratryl alcohol oxidation by manganese-dependent peroxidase from *Lenitus edodes*. **Journal of Biotechnology**, v. 48, p. 231-239, 1996.
- DE JONG, E. FIELD, J.A., BONT, J.A.M. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 153-188, 1994.
- DELORME, V.A.; CRISOFULLI, T.; WARNER, M.J. **Biodegradable fertilizer and pest control composition comprising limonene**. Int. A01N 027/00. U.S. n. 5728648. 19Sep., 1996. 17Mar., 1998.
- DEMYTTENAERE, J.C.R.; BELLEGHEM, K.V.; KIMPE, N.D. Biotransformation o (R)-(+)- and (S)-limonene by fungi and the use o solid phase microextraction for screening. **Phytochemistry**, v. 57, p. 199-208, 2001.
- DHERE, S.G.; DHAVLIKAR, R.S. Microbial transformation of terpenoids. **Science and Culture**, v. 36, n. 5, p. 292, 1970.
- DIETRICH, D.R.; SWENBERG, J.A. The presence of alpha-2F-globulin is necessary for d-limonene promotion of male rat kidney tumors. **Cancer Research**, v. 51, p. 3512-3521, 1991.

DUETZ, W.A.; FJALLMAN, A.H.M.; REN, S.; JOURDAT, C.; WITHOLT, B. Biotransformation of *d*-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2829-2832, 2001.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.L. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1151-1158, 1996.

EVANS, C.S.; GALLAGHER, I.M.; ATKEY, P.T.; WOOD, D.A. Localization of degradative enzymes in white-rot decay of lignocellulose. **Biodegradation**, v. 2, p. 93-106, 1991.

FALCONI, F.A. **Bioconversão de compostos fenólicos por fungos ligninolíticos**. Campinas, 1998. 108p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

FALK, A. Purpuric rash caused by dermal exposure to *d*-limonene. **Contact Dermatitis**, v. 25, p. 198-199, 1991.

FIECHTER, Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, p. 286-293, 1992.

FINKLE, B.J. Ring cleavage of plant catechols by crystalline oxygenases. **Phytochemistry**, v. 10, p. 235-242, 1971.

FISCHBACH, R.J.; ZIMMER, R.S.; PICHNER, A.; SCHNITZLER, J. Monoterpene synthase activities in leaves of *Picea abies* (L.) Karst. and *Quercus ilex* L. **Phytochemistry**, n. 54, p. 257-265, 2000.

FISCHER, K.; AKTHAR, M.; MESSNER, K.; BLANCHETTE, R.A. Pitch reduction with the white-rot fungus *Cerioporiopsis subvermispora*. **6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**. Vienna, Austria, 11-15 June 1995.

FUJISAWA, H.; HAYAISHI, O. Protocatechuate 2,3-dyxygenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 10, p. 2673-2081, 1968.

- GOLD, M.H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiology Reviews**, v. 57, p. 605-622, 1993.
- GOLOVLEVA, L.A.; LEONT'EVSKII, A.A. Ligninolytic activity of wood-decaying fungi. **Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 477-482, 1998.
- GRIFFITHS, E.T.; BOCIEK, S.M.; HARRIES, P.C.; JEFFCOAT, R.; SISSONS, D.J.; TRUDGILL, P.W. Bacterial metabolism of α -pinene: pathway from α -pinene oxide to acyclic metabolites in *Nocardia* sp. strain P18.3. **Journal Bacteriology**, v. 169, n. 11, p. 4972-4979, 1987.
- HANN, D.H.; SOLENBERG, P.J.; BALTZ, R.H. Tn5099 a xylE promoter probe transposon fr *Streptomyces* spp. **Journal Bacteriology**, v. 173; p. 5573-5577, 1991.
- HARAYAMA, S.; KOH, M. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. **Annual Review Microbiology**, v. 46, p. 565-601, 1992.
- HARD, G.C.; WHYSNER, J. Risk assessment of *d*-limonene: an example of male rat-specific renal tumorigens. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 24, n. 3, p. 231-254, 1994.
- HARDMAN, D.J. Microbial control of environmental pollution: the use of genetic techniques to engineer organisms with novel catabolic capabilities. **Environmental Biotechnology**. Ed. Elles Horwood, Chichester, 1987.
- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, p. 125-135, 1994.
- HEERDEN, I.V.; CRONJÉ, C.; SWART, S.H.; KOTZÉ, J.M. Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. **Bioresource Technology**, v. 81, v. 1, p. 71-76, 2002.
- HEGEMAN, G.D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 3, p. 1141-1154, 1966.
- HERRERA, A. E. M. **Produção e caracterização parcial de um composto de baixa massa molecular com atividade fenoxidásica de *Thermoascus***

- aurantiacus**. Campinas, 1995. 145. Tese (Doutor em Ciências, área Bioquímica) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1995.
- IKAN, R. Isoprenoids III -Terpenoids. In: **Natural Products**. 2ª ed. New York: Academic Press, 1990. cap. 3, p. 168-225.
- IQBAL, S.; KHALLID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude-oil and hyperproduction of biosurfactants by gamma-ray-induced mutant o *Pseudomonas aeruginosa*. **Letter Applied Microbiology**, v. 21; p. 176-179, 1995.
- JOHJIMA, T.; ITOH, N.; KABUTO, M.; TOKIMURA, F.; NAKAGAWA, T.; WARIISHI, H.; TANAKA, H. Direct interactions of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 1989-1994, 1999.
- JONHSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V.S.; ADHIKARI, D.K.; SISTA, V.; YADAV, N.K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**, v. 6, p. 487-490, 1992.
- KARLBERG, A.T.; DOOMSGOOSSENS, A. Contact allergy to oxidized d-limonene among dermatitis patients. **Contact Dermatitis**, v. 36, n. 4, p. 201-206, 1997.
- KARLBERG, A.T.; MAGNUSSON, K.; NILSSON, U. Influence of an antioxidant on the formation of allergenic compounds during autoxidation of d-limonene. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 38, n. 2, p. 199-207, 1994.
- KAPICH, A.N.; JENSEN, K.A.; HAMMEL, K.E. Peroxyl radicals potential agents of lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 461, n. 1-2, p. 115-119, 1999.
- KERSTEN, P.J.; KALYANARAMAN, B.; HAMMEL, K.E.; REINHAMMAR, B.; KIRK, T.K. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. **The Biochemical Journal**, v. 268, p. 475-480, 1990.
- KIM, D.; PARK, M.J.; KOH, S.C.; SO, J.S.; KIM, E. Three separate pathways for the initial oxidation of limonene, biphenyl, and phenol by *Rhodococcus* sp strain T04. **Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 86-89, 2002.

KIMBALL, D.A. Citrus oils, aromas, and essences. In: **Citrus Processing Quality Control and Technology**. New York: CHAPMAN & HALL, 1991. cap. 6, p. 73-101.

KOH, S.; PARK, Y.; KOO, Y.; SO, J. Plants terpenes and lignin as natural cosubstrats in biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs). Disponível em: <http://www.postech.ac.at/webzine/content/review> Acesso em: 10 abr. 2003.

KUMAKARA, 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**, Amsterdam, v. 169, p. 247-250, 1984.

KWON, S.; ANDERSON, A.J.. Genes for multicopper proteins and laccase activity: Common features in plant-associated *Fusarium* isolates. **Canadian Journal of Botany**, v. 80, n. 5, p. 563-570, 2002.

_LARANJABRASIL. A indústria da laranja. Disponível em: <http://www.laranjabrasil.com.br/paginas.htm/senai> . Acesso em: 10 abr. 2003.

LEBLOND, J.D.; APPELEGATE, B.M., MENN, .; SCHULTZ, T.W.; SAYLER, G.S. Structure-toxicity assessment of metabolites of the aerobic bacterial transformation of substituted naphthalenes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 1235-1246, 2000.

LIPTHAY, J.R.; BARKAY, T.; VEKOVA, J.; SORENSEN, S.J. Utilization of phenoxyacetic acid, by strains using either the *ortho* or *meta* cleavage of catechol during phenol degradation, after conjugal transfer o *tfdA*, the gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/2-oxoglutarate dioxygenase. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 207-214, 1999.

MACEDO, J.M.B.; GOTTSCHALK, L.M.F., BOM, E.P.S. Calcium carbonates mediates higher lignin peroxidase activity in the culture supernatant of *Streptomyces viridosporus* T7A. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p. 163-169, 1999.

MACHADO, M.A. **Biotecnologia na citricultura**. 1997. Disponível na Internet: <http://www.biotecnologia.com.br/1hp.html> . Data de acesso: 18 fev. 999.

MANIMEKALAI, R. SWAMINATHAN, T. Bioderadation o phenolic compounds using *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal Scientific & Industrial Research**, v. 57, n. 10-11, p. 833-837, 1998.

MANZANARES, P.; FAJARDO, S.; MARTIN, C. Production of ligninolytic activities when treating paper pulp effluents by *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, Washington, v. 43, p. 125-132, 1995.

MARQUES, D.S. **Desterpenação de óleo essencial de laranja por cromatografia preparativa de fluido supercrítico**. Campinas, 1997. 331p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

MARS, A.E.; GORISSEN, J.P.L.; VAN DEN BELD, I. Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillic acid by *Pseudomonas putida* GS1 in a fed-batch reactor. **Applied Microbiological and Biotechnology**, v. 56, p. 101-107, 2001.

MATTHEWS, R.F.; BRADDOCK, R.J. Recovery and applications of essential oils from oranges. **Food Technology**, p. 57-61, 1987.

MAZAS, N.; RUIZ, A. Aislamiento y caracterización de cepas biotransformadoras de terpenos, productoras de aromas. **Alimentaria**, v. 260, p. 41-43, 1995.

MISRA, G.; PAVLOSTATHIS, S.G. Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and soil-slurry systems. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 572-577, 1997.

MISRA, G.; PAVLOSTATHIS, S.G.; PERDUE, E.M. Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 831-838, 1996.

MONTIES, B. Chemical assessment of lignin biodegradation some qualitative and quantitative aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, p. 277-284, 1994.

MUMTAZ, M.M.; DE ROSA, C.T.; GROTEN, J.; FERON, V.J.; HANSEN, H.; DURKIN, P.R. Estimation of toxicity of chemical mixtures through modeling of

chemical interactions. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, suppl. 6, p. 1353-1360, 1998.

MURAKAMI, S.; NAKANISHI, Y.; KODAMA, N.; TAKENAKA, S.; SHINKE, R.; AOKI, K. Purification, characterization, and gene analysis of catechol 2,3-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Pseudomonas* species AW-2. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 62, n. 4, p. 747-752, 1998.

OLIVEIRA, B.H.; STRAPASSON, R. A. Biotransformation of the monoterpene, limonene, by *Fusarium verticilloides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 11-14, 2000.

ONKEN, J. BERGER, R.G. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. **Journal of Biotechnology**, v. 69, n. 2-3, p. 163-168, 1999.

PAPPAS, P.; SOTIROPOULOU, M.; KARAMANAKOS, P.; KOSTOULA, A.; LEVIDIOTOU, S.; MARSELOS, M. Acute-phase response to benzo[a]pyrene and induction of rat ALDH3A1. **Chemical-Biological Interactions**, v. 143-144, p. 55-62, 2003.

PAVARINA, E.C. **Fungos microaeróbios na bioconversão de material lignocelulósico**. Campinas, 161p., 2002. Doutor em Ciência de Alimento. Faculdade de Engenharia de Alimentos . Universidade Estadual de Campinas.

PAVLOSTATHIS, S.G.; MISRA, G. Biotransformation of selected monoterpenes under nitrate-reducing conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 63-68, 1999.

PÉREZ, J.; SAEZ, L.; DE LA RUBIA, T.; MARTINEZ, J. *Phanerochaete flavidolba* ligninolytic activities and decolorization of partially biodepurated paper mill wastes. **Water Research**, v. 31, n. 3, p. 495-502, 1997.

POLISSI, A.; HARAYAMA, S. In vivo reactivation of catechol 2,3-dioxygenase mediated by a chloroplast-type ferredoxin: a bacterial strategy to expand the substrate specificity of aromatic degradative pathways. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 8, p. 3339-3347, 1993.

- POTTER, N.N; HOTCHKISS, J.H. Vegetables and Fruits. In: **Food Science**. 5^a ed. New York: CHAMPMAN & HALL, 1995. p. 432-435.
- PRATES, H.T.; SANTOS, J.P.; WALQUIL, J.M.; FABRIS, J.D.; OLIVEIRA, A.B.; FOSTER, J.E. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castanum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 243-249, 1998.
- REDDY, C.A.; D'SOUZA, T.M. Physiology and molecular biology o the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology**, v. 13, p. 137-152, 1994.
- REGALADO, V.; PERESTELO, F.; RODRIGUEZ, A.; CARNICERO, A.; SOSA F.J.; FUENTE, G.; FALCÓN, M.A. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: lacase, and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. **Applied Microbiology and Technology**, v. 51, p. 388-390, 1999.
- RINGLING, D. & VAN ALFEN, N. K. Extra- and Intracellular laccases of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3634-3639, 1993.
- RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, v.38, n. 1, p. 27-32, 1999.
- SANTOS, J.P.; PRATES, H.T.; WAQUIL, J.M.; OLIVEIRA, A.B. **Avaliação de substâncias de origem vegetal no controle de pragas de grãos armazenados**. Disponível na Internet: <http://www.cnpms.embrapa.br/pesq1998.html>. Data de acesso: 19 fev. 1999.
- SAVITHIRZ, N.; GAGE, D.; FU, W.; ORIEL, P. Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425. **Biodegradation**, v. 9, n. 5, p. 337-341, 1998.
- SAXENA, R.K.; SHARMILA, P.; SINGH, V.P. Microbial degradation of tannins. Biotransformations: Microbial degradation of health risk compounds. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 32, p. 259-270, 1995.

SAYADI, S.; ELLOUZ, R.; Roles o lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporim* in the decolorization o olive mill wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1265-1273, 1995.

SHIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SPARRAT, M.C.N.; MARTINEZ, M.J.; TOURNIER, H.A.; CABELLO, M.N. ARAMBARRI, A.M. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* isolated from different substrata. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 799-803, 2000.

SPEELMANS, G.; BIJLSMA, A.; EGGINK, G. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 50, p. 538-544, 1998.

SRINIVASAN, D.; D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Demonstration of laccase in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61,n.12, p. 4274-4277, 1995.

SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production o phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v. 8n, n. 12, p. 234-240, 1989.

TAN, Q.; DAY, D.F. Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 96-101, 1998.

TANDLICH, R.; BREZNÁ, B.; DERCOVÁ, K. The effects o terpenes on the biodegradation o polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas stutzeri*. **Chemosphere**, v. 44, p. 1547-1555, 2001.

THE ROD FAMILY TRUST, Robert, R.L. **Process for repelling and killing insects and compositions to effect the same comprising a monoterpene**. Int. A01N 025/32. U.S. n. 5653991. 9May, 1995. 5Aug., 1997.

- TIEN, M.; KIRK, T.K. In: **Biomass**, part B. Editors WOOD, W.A.; KELLOJ, S.T., London, p. 238-249, 1983.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.
- TRAVKIN, V.M.; SOLYANIKOVA, I.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; VERVOORT, J.; VAN-BEREKL, W.J.H.; GOLOVLEVA, L.A. Degradation of 3,4-dichloro and 3,4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-K. **Journal of Environmental Science and Health**, v. B38, n. 2, p. 121-132, 2003.
- TRUDGILL, P.W. Microbial metabolism of monoterpenes - recent developments. **Biodegradation**, v. 1, p. 93-105, 1990.
- TUOR, U., WINTERHALTER, K. & FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 1-17, 1995.
- URIBE, S.; PEÑA, A. Toxicity of allelopathic monoterpenes suspensions on yeast. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 4, p. 1399-1408, 1990.
- UMA, L.; KALAISELVI, R.; SUBRAMANIAN, G. Isolation of a lininolytic bacterium for the degradation and possible utilization o coir waste. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 3, p. 303-308, 1994.
- VAN DYK, M.S.; VAN RENSBURG, MOLELEKI, E. N. Hydroxylation of (+) limonene, (-) α -pinene and (-) β -pinene by a *Hormonema* sp. **Biochemistry Letters**, v. 20, n. 4, p. 431-436, 1998.
- VILA, R.; VALENZUELA, L.; BELLO, H.; CANIGUERAL, S.; MONTES, M.; ADZET, T. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. **Planta Medica**, v. 65, n. 2, p. 178-179, 1999.
- WANG, Z.; CHEN, T.; GAO, Y.; BREUIL, C.; HIRATSUKA, Y. Biological degradation of resins acids in wood chips by wood-inhabiting fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.1, p.222-225, 1995.
- WARD, B.B.; COURTNEY, K.J.; LANGEHEIM, J.H. Inhibition of *Nitrosomonas europaea* by monoterpenes from coastal redwood (*Sequoia sempervirens*) in

whole-cell studies. **Journal of chemical Ecology**, v. 23, n. 11, p. 2583-2598, 1998.

WERF, M.J.; KEIJZER, P.M.; SCHAFT, P.H. *Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 133-143, 2000.

WERF, M.J.; SWARTS, H.J.; BONT, J.A.M. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.5, p. 2092-2102, 1999.

WERF, M.J.; OVERKAMP, K.M.; BONT, J.A.M. Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 19, p. 5052-5057, 1998.

WRIGHT, S.J.; CAUNT, P.; CARTE, D.; BAKER, P.B. Microbial oxidation of alpha-pinene by *Serratia marcescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23; p. 224-227, 1986.

ZHANG, F.M.; KNAPP, J.S.; TAPLEY, K.N. Decolorisation of cotton bleaching effluent with wood rotting fungus. **Water Research**, v. 33, n. 4, p. 919-928, 1999.