

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**ESTUDOS MECANÍSTICOS DA DEGRADAÇÃO DE  
EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE PAPEL E  
CELULOSE POR FUNGOS BASIDIOMICETOS  
DEGRADADORES DE MADEIRA**

**CARLOS HENRIQUE LEMOS SOARES**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. NELSON C. DURÁN**

**1998**

**Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Química Orgânica do  
Instituto de Química**

UNIDADE	IQ
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	Solie
V.	Ex.
TOMBO DE:	37914
PROG.	229/99
C	<input type="checkbox"/> 0 <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO:	R\$ 11,00
DATA:	11/05/99
N.º CPD	6160124648-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNICAMP**

**Solie** Soares, Carlos Henrique Lemos  
**Estudos mecanísticos de degradação de efluentes de indústrias de papel e celulose por fungos basidiomicetos degradadores de madeira / Carlos Henrique Lemos Soares -- Campinas, [SP : s.n.], 1998.**

**Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero**

**Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.**

**1.\* Trametes Villosa. 2. \*Panus crinitus. 3.\* Lacase.**  
**I. Durán Caballero, Nelson Eduardo II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.**

**ESTUDOS MECANÍSTICOS DA DEGRADAÇÃO DE  
EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE PAPEL E CELULOSE  
POR FUNGOS BASIDIOMICETOS DEGRADADORES DE  
MADEIRA**

..... Sonho que se sonha só  
É só um sonho  
Que se sonha só  
Mas sonho que se sonha junto  
É realidade .....

(Raul Seixas)

Aos meus filhos      Adriana  
                                 Denise  
                                 Henrique

Razão maior de toda a minha persistência e teimosia ...  
Perdão pelo tempo que não lhes dediquei.

**Aos meus pais**

**Adhemar e Aparecida**

**pela torcida e apoio de sempre.**

**A Vera**

**que sempre de uma maneira  
muito especial soube ajudar e incentivar  
A você o meu eterno agradecimento.**

Dedico e agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Nelson Durán, não apenas pela orientação segura, mas também pela compreensão e tolerância, que me permitiram superar os graves problemas que enfrentei e que por muito pouco não inviabilizaram a conclusão deste trabalho. Muito obrigado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço, em especial, a professora Dra Clarice L. Leite do Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, pela assistência material proporcionada e principalmente pelas discussões, comentários e sugestões que muito me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Dra Elisa Espósito, Fundação André Toselo, Campinas, SP, pelo importante apoio inicial.

Agradeço ao prof. Dr Juan Reyes, IQ, Unicamp, pela ajuda recebida.

Agradeço ao meu amigo Luiz Augusto, Guto, pela ajuda em preparar algumas figuras utilizadas aqui e principalmente pela preocupação em proporcionar melhores condições de trabalho.

Agradeço a minha aluna e amiga Ivana E. Baptista pela imprescindível ajuda.

Agradeço aos amigos e parceiros de trabalho Danilo W. Filho e Rosângela C. Pedrosa pelo constante apoio recebido.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFSC, que de uma forma ou de outra, também contribuíram para a execução do trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr Luiz A. S. Madureira e a Jaime Rodriguez, ambos do Departamento de Química da UFSC, pela assessoria prestada na realização das medidas cromatográficas e com IR, respectivamente.

# ÍNDICE

	Pág.
Agradecimentos	
PREFÁCIO.....	1
SUMMARY.....	2
SUMÁRIO.....	4
ABREVIATURA.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Estrutura da Madeira.....	6
1.1.1. Celulose- Estrutura Química.....	6
1.1.2. Celulose- Comportamento Químico .....	7
1.1.3. Hemicelulose- Estrutura Química .....	8
1.1.4. Lignina- Estrutura Química.....	8
1.1.5. Lignina- Comportamento Químico.....	10
1.1.6. Extrativos .....	11
1.2. Madeira- Uso Industrial .....	11
1.2.1. Considerações Gerais .....	11
1.2.2. Produção de Polpas Celulósicas e Papel .....	12
1.2.2.1. Princípios Gerais da Polpação- Produção de Polpas não-Branqueadas.....	12
1.2.2.2. Princípios gerais da fase de branqueamento de polpas .....	14
1.2.3. Efluentes de indústrias de papel e celulose. ....	19
1.2.3.1. Composição química dos efluentes de processos convencionais .....	19
1.2.3.2. Efluentes de processos de branqueamento tipo ECF e TCF. ....	20
1.2.3.3. Impacto ambiental - Efeitos biológicos de efluentes da produção de polpas. ....	21
1.2.3.3.1. Metodologia de avaliação de efeitos biológicos .....	21
1.2.3.3.2. Toxicidade de efluentes de indústria de papel e celulose .....	23
1.2.3. 4. Tratamentos convencionais de efluentes .....	24
1. 3. Biodegradação dos componentes da madeira .....	25
1.3.1. Enzimas ligninolíticas extracelulares produzidas por fungos .....	26
1.3.1.1. Lacase .....	26
1.3.1.2. Lignina peroxidase .....	29
1.3.1.3. Manganês Peroxidase (MnP) .....	32
1.3.1.4. Importância relativa de cada enzima na biodegradação de lignina .....	33
1.3.2. Mecanismos de degradação de lignina .....	35
1.4. Fungos e suas aplicações biotecnológicas .....	38
1.4.1. Biotecnologia-Indústria Papeleira-Meio Ambiente .....	39
1.4.2. Biodegradação de poluentes industriais .....	42
2.1. Objetivos gerais .....	44
2. 2. Objetivos específicos .....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
3.1. Efluente .....	45
3.2. Culturas .....	45
3.3. Experimentos de descoloração .....	45
3.4. Determinação adas atividades enzimáticas .....	45
3.4.1. Fenoloxidasas (lacase e peroxidase) .....	45
3.4.2 Lignina peroxidase .....	46
3.4.3. Manganês peroxidase .....	46
3.4.4. $\beta$ -glicosidase .....	47

<b>3.5. Medidas Analíticas</b> .....	47
<b>3.5.1. Determinação de fenóis totais</b> .....	47
3.5.1.1. Método de Folin .....	47
3.5.1.2. Método de 4-aminoantipirina (4-AAP) .....	47
<b>3.5.2. Determinação de proteínas totais</b> .....	47
<b>3.6. Análise cromatográfica</b> .....	48
3.6.1. Análise de composição dos efluentes .....	48
3.6.2. Análise da distribuição de massas moleculares .....	48
3.6.3. Análise CG-MS .....	48
<b>3.7. Análises espectrofotométricas</b> .....	49
3.7.1. Análise por UV .....	49
3.7.2. Análise por FT-IR .....	49
<b>4. RESULTADOS</b> .....	50
<b>4.1. Otimização das condições para biodegradação do efluente pelos fungos</b> .....	50
4.1.1. Biodegradação do efluente pelo fungo <i>Trametes villosa</i> .....	50
4.1.2. Biodegradação do efluente pelo fungo <i>Panus crinitus</i> .....	53
<b>4.2. Atividade enzimática durante o processo de biodegradação</b> .....	54
<b>4.3. Efeito indutivo na atividade enzimática</b> .....	57
<b>4.4. Estudo da distribuição de massas moleculares das várias frações de componentes do efluente, por cromatografia de exclusão, durante o processo de biodegradação.</b> .....	62
<b>4.5. Mecanismos de biodegradação do efluente- Estudos espectroscópicos</b> .....	68
4.5.1. Modificações UV espectrais do efluente tipo kraft durante o tratamento com os fungos basidiomicetos <i>Panus crinitus</i> e <i>Trametes villosa</i> . .....	68
4.5.2. Estudos espectroscópicos - FT-IR .....	77
<b>4.6. Análise de produtos da biodegradação de efluentes</b> .....	83
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	86
5.1. Processo de descoloração e remoção de fenóis totais. ....	86
5.2. Estudo da distribuição de massas moleculares (MM) .....	87
5.3. Atividade enzimática extracelular durante o processo de biodegradação. ....	90
5.4. Efeito indutivo na atividade enzimática .....	95
5.5. Modificações UV espectrais do efluente durante tratamento com os fungos basidiomicetos <i>Panus crinitus</i> e <i>Trametes villosa</i> . ..	96
5.6. Estudos espectroscópicos - FT-IR .....	100
5.7. Considerações gerais sobre o mecanismo de biodegradação .....	102
5.8. Caracterização de produtos. ....	104
<b>6. CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	105
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	107

## PREFÁCIO

Este trabalho foi realizado em parte no Laboratório de Química Biológica do Instituto de Química da Unicamp, e parte no Laboratório de Biotecnologia e Bioquímica de Fungos da Universidade Federal de Santa Catarina, CCB, BQA.

Como todo trabalho de tese deveria ser, este representa realmente uma fase de amadurecimento e consolidação de uma linha de pesquisa.

Santa Catarina possui um grande número de indústrias de papel e celulose, o que nos estimulou a criar um grupo de trabalho que atue no desenvolvimento de métodos biotecnológicos de tratamento de efluentes, particularmente, tratamento biológico com a utilização de fungos da região de Florianópolis.

Do ponto de vista ambiental, é importante compreender o comportamento de efluentes deste tipo de indústria frente à degradação biológica, particularmente das frações de mais alta massa molecular, contidas no mesmo, uma vez que, além do transtorno acarretado pela coloração escura dos efluentes, também tem sido levantada a possibilidade de que estas frações sejam lentamente degradadas, sob condições ambientais naturais, gerando assim estruturas de baixa massa molecular, que seriam potencialmente tóxicas. Desde que os métodos tradicionais de tratamento de efluentes, tais como lagoa de aeração e lodo ativado não removem eficientemente estas frações, a biodegradação das mesmas por métodos alternativos torna-se bastante atraente.

Por outro lado é imprescindível o desenvolvimento de métodos de monitoramento do impacto ambiental nas áreas circunvizinhas as indústrias de papel e celulose do estado de Santa Catarina.

Ao longo do período de desenvolvimento do trabalho de tese, conseguimos estruturar dois laboratórios de pesquisa na UFSC, consolidar um grupo de trabalho integrado, bem como estabelecer uma relação de cooperação técnica promissora com algumas indústrias de papel e celulose do estado de Santa Catarina.

Como fruto destes esforços, apresentamos 18 resumos em congressos nacionais e internacionais, 9 trabalhos completos em Anais de Congressos e submetemos 3 trabalhos a publicação em revistas internacionais, sendo eles:

-Biodegradation of high and low fractions of Kraft bleachery caustic (E<sub>1</sub>) effluent by *Trametes villosa*

Carlos H. L. Soares and Nelson Durán

Environmental Technology (no prelo)

-The role of enzymes in biodegradation of bleached kraft pulp effluent by basidiomycetes

Carlos H. L. Soares and Nelson Durán

Journal of Biotechnology (submetido)

-Biodegradation of chlorolignin and lignin-like compounds contained into E<sub>1</sub>-pulp bleaching effluent by fungal treatment

Carlos H. L. Soares and Nelson Durán

Applied Biochemistry Biotechnology Part A (no prelo)

Assim, sinto-me, hoje, recompensado pelo esforço desenvolvido, bem como pelas privações que um trabalho desta natureza obrigatoriamente impõe. Por outro lado, acredito ter contribuído, mesmo que modestamente, para o desenvolvimento de linhas de pesquisas tecnológicas, dentro da Universidade Federal de Santa Catarina, fundamentais para sua consolidação como uma instituição de pesquisa.

## SUMMARY

The basidiomycete fungi *Panus crinitus* and *Trametes villosa* have been studied for their ability to degrade and decolorize Kraft pulp bleaching effluents (E<sub>1</sub>-stage). The results showed that the white-rot fungi *P. crinitus* and *T. villosa* exhibited a decolorization rate about 55-65% and 70-80%, respectively, during 1-2 days. The total phenolic content decreased in agreement with the decolorization rate. The production of lignocellulose-degrading enzymes as lignin-peroxidase (LiP), laccase, manganese peroxidase (MnP),  $\beta$ -glucosidase, glucose oxidase has been evaluated.

The ligninolytic enzyme patterns were quite similar, being that laccase and lignin peroxidase were the major extracellular ligninolytic enzymes secreted by both the fungi, *T. villosa* and *P. crinitus*. The MnP extracellular activity was not detected under the conditions employed. On the other hand, these fungi exhibited differences in their individual behavior regarding to their LiP/laccase activity ratio,  $\beta$ -glucosidase activity levels, overall peroxidase activity levels and in the temporal profile of enzyme liberation into the extracellular media. Both fungi secreted substantial quantities of extracellular laccase (120-418 U l<sup>-1</sup>) and  $\beta$ -glucosidase (30-145 U l<sup>-1</sup>), a moderate rate of generic peroxidases, lignin peroxidase, and traces of manganese peroxidase. Laccase presented a maximum activity at 36 hs, for *T. villosa*, and at 50 hs for *P. crinitus*, after incubation, and it decreased slowly in the subsequent period. Peroxidases e  $\beta$ -glucosidases activities decreased during the degradation period.

Glucose oxidase and oxalic acid oxidase activities have also been evaluated but the results were not conclusive. While some authors related the importance of manganese peroxidase activity on decolorization of the effluent by other fungi, we could not observe this effect in this case. It does not seem to be responsible for the decolorization or degradation of effluent by *T. villosa* and *P. crinitus*.

Studies of changes of molecular-size distribution during the effluent incubation period with the fungi was carried out by size exclusion HPLC and the elution was concomitantly monitored at 210 nm and 280 nm. Significant differences could be verified in this case. We could observe that not only the two elution profiles, at 210 and 280 nm, were partially different, but, curiously, it was also evident that the formation of lower-MW intermediate compounds, during the biodegradation process, could be better characterized at 210 nm than at 280 nm. The fungi could efficiently degrade all the fractions of different molecular-mass, however, the individual degradation rate for each fraction was different. The present results showed that the depolymerizing pathway was preferential in the *T. villosa* and *P. crinitus* case. As laccase has been refereed as an enzyme which the polymerizing ability is predominant in vitro, a presence of a natural mediator for laccase depolymerization capability could be pointed out, on speculative-terms. The higher-molecular-weight fractions were chemically modified prior to their depolymerization and the decolorization process seems to be more correlated to this modification. Laccase may play an important role in this case, however, synergistic effects from other enzymes cannot be ruled out. Minor polymerization reactions could be also found for both fungi.

Bleached Kraft pulp effluent displays no typical differential UV spectrograms as for lignin and lignin related compounds. It showed maximum peak at about 220, 276,310 nm and above 350 nm. Kinetic studies of the decolorization by reducing agents as sodium borohydride enhanced the presence of different carbonyl groups

conjugated with -OH phenolic groups. The modifications observed during the biodegradation of the effluent indicated the formation of intermediary carbonyl groups, including the quinoid type, which were consumed in the final phase of the degradation. The differential spectrograms in the final phase were similar to those of the phenolic acids as observed for model compounds. Another important observation comes from the analysis of extracts obtained from the solvent extraction. The results suggested that the spectrogram observed for the effluent was a composition of absorbancies of the different molecular mass fractions contained in it.

The structural changes during the biodegradation of E<sub>1</sub>-Kraft pulp bleaching effluent by basidiomycete fungi, *Trametes villosa* and *Panus crinitus*, were also characterized by using the FT-IR method. The major chemical modifications of E<sub>1</sub>-effluent observed during this biodegradation process can be summarized as follows : i) In despite of the fact that the lignin-derived compounds contained in the untreated effluent showed a lower aromatic nuclei content than normal lignin (1500 cm<sup>-1</sup> region), and phenolic hydroxyl group content, both substructures were intensively degraded by fungal treatment. ii) The formation of a new type of intermediary conjugated carbonyl, which was removed upon reduction with sodium borohydride, and carboxyl groups were found (1630-1660 cm<sup>-1</sup> region) only in the *T. villosa* case, and was absent in the *P. crinitus*. Fungal attack changes the absorption maximum of original carbonyl absorption band in the untreated effluent spectra to higher wavenumbers. iii) The aliphatic moieties in the organic material dissolved in the effluent seem to be degraded faster than the aromatic ones. iv) The relative content of syringyl units or guaiacyl ring condensed structures into the treated effluent sample apparently increased (increased intensity at 1326 cm<sup>-1</sup>) during the incubation period with the *T. villosa* fungus, which may indicate a relative selectivity of its ligninolytic system. The same effect was not observed in the *P. crinitus* case.

## SUMÁRIO

O fungo *Trametes villosa* promoveu a descoloração de 70-80% da intensidade inicial da cor do efluente, no período 35-50 hs de incubação com o mesmo. Concomitantemente ao processo de descoloração, a concentração total de fenóis, medida por dois métodos químicos independentes, método de Folin e método 4-aminoantipirina (4-AAP), decresceu ao longo do período de incubação. Os resultados obtidos pelo método Folin indicaram que o processo de descoloração foi mais rápido do que o consumo de fenóis totais. Tal resultado parece indicar que modificações químicas nas subestruturas dos componentes do efluente, particularmente nas de maior massa molecular, podem contribuir para o processo descoloração, concomitantemente, ou antes mesmo que estas sofram um processo de mineralização total (transformação a CO<sub>2</sub>). O pH inicial do efluente não foi um fator limitante da ação do fungo, pelo menos para valores menores que 9,5, para efluentes não tamponados. O efluente tratado com o fungo *Parus crinitus* apresentou uma taxa de descoloração de 60-70% no período de 45-55 hs. Também neste caso ocorreu a redução acentuada da concentração total de fenóis. A avaliação das atividades enzimáticas extracelulares demonstrou que, o fungo *T. villosa* produziu quantidades apreciáveis das enzimas lacase, peroxidase totais, lignina peroxidase e de β-glicosidase, superior a todos os demais fungos testados. Já o fungo *P. crinitus* produziu quantidades ligeiramente inferiores das citadas enzimas, apenas nas primeiras 48 hs de incubação. Para o fungo *Phellinus sp* não foi detectada nenhuma atividade enzimática relativa a lacase e somente quantidades desprezíveis de atividade para β-glicosidase. Por outro lado, este fungo produziu quantidades moderadas de peroxidases e altas quantidades de Mn-peroxidase, mantidas durante todo período de incubação (20 dias). O fungo *Phellinus sp* não descoloriu apreciavelmente o efluente. Os resultados obtidos parecem sugerir que a enzima Mn-peroxidase, neste caso, não foi determinante da capacidade de descoloração e biodegradação do efluente. Diferenças significativas puderam ser observadas entre as curvas de distribuição de MM obtidas a 210 e 280 nm. A principal constatação foi a de que a fração de componentes de baixa massa molecular pôde ser melhor caracterizada pela curva obtida a 210 nm, do que pela respectiva curva a 280 nm. As variações observadas nas curvas de distribuição de massas moleculares indicaram que todas as frações; alta, média e baixa-MM, foram degradadas pela ação tanto do fungo *Trametes villosa*, quanto à do fungo *Parus crinitus*. Espectros-UV diferenciais de efluentes tipo E<sub>1</sub> obtidos durante o período de incubação com o fungo *T. villosa* revelaram importantes modificações estruturais promovidas por este fungo; no período inicial (0-48 hs), ocorreu a formação progressiva de um grupamento conjugado com o anel aromático, evidenciada pelo aumento acentuado de absorbância a 310 nm. Pelo fato de que tal absorção pode ser suprimida pela redução com borohidreto de sódio, o grupamento intermediário formado deve ser tipo carbonílico. O fungo *P. crinitus* não apresentou esta característica. A análise dos espectro FT-IR das amostras de efluentes revelou que o processo Kraft de polpação e o processo de branqueamento alteram significativamente a estrutura da lignina residual, contida no efluente, sendo que o conteúdo de estruturas aromáticas, neste caso, é baixo. Também esta técnica, FT-IR, demonstrou a formação de grupo carbonílico com absorção em torno de 1650 cm<sup>-1</sup>, decorrente da ação do fungo *T. villosa* sobre o efluente.

## ABREVIATURAS

- E<sub>1</sub> - estágio da primeira extração alcalina da fase de branqueamento de polpas
- C<sub>1</sub> - estágio da primeiro tratamento com cloro da fase de branqueamento de polpas
- D<sub>1</sub> - estágio do tratamento com dióxido de cloro da fase de branqueamento de polpas
- EDTA - dietilenodiamino
- QZQP - sequência de branqueamento utilizando quelante(Q)(EDTA),ozônio (Z), quelante, peróxido de hidrogênio(P)
- AZQP - sequência de branqueamento: ozônio, quelante, peróxido
- QPZP - sequência de branqueamento: quelante, peróxido, ozônio, peróxido
- DBO - demanda biológica de oxigênio
- DQO - demanda química de oxigênio
- ECF - Elemental chlorine-free
- TCF - Totally chlorine-free
- TEF - Totally effluent-free
- AOX - adsorbable organic halogen
- TOC - total organic chlorine
- cit. P<sub>450</sub> - citocromo P<sub>450</sub>
- LC<sub>50</sub> - concentração letal necessária para reduzir em 50% o efeito observado
- MM - massa molecular
- A-MM - alta massa molecular
- B-MM - baixa massa molecular
- Md-MM - média massa molecular
- La - lacase
- MnP - Manganês peroxidase
- LiP - lignina peroxidase
- HRP - horse radish peroxidase
- DHP - dehydrogenation polymer
- Da - daltons
- UV - ultravioleta
- FT-IR - Fourier Transform Infra-Red
- H<sup>1</sup>-RNM - ressonância nuclear magnética de prótons
- <sup>13</sup>C-RNM - ressonância nuclear de carbono 13
- 4-AAP - 4-aminoantipirina
- HPLC - high pressure liquid chromatography
- ABS - absorvância
- GC-MS - gas chromatography- mass spectroscopy
- CDH - celobiose desidrogenase
- CBQ - celobiose-quinona oxirredutase
- AV - álcool veratrílico

## 1. INTRODUÇÃO

Madeira é a parte compacta ou fibrosa do tronco, dos ramos e das raízes de árvores, arbustos e outras plantas, sendo constituída de tecidos lenificados, que se desenvolveram sob a casca. Das quatro divisões principais do reino vegetal, *Thallophyta*, *Bryophyta*, *Pteridophyta* e *Spermatophyta*, esta última engloba a maioria das matérias-primas, normalmente utilizadas na produção de polpas celulósicas, particularmente as madeiras (39). A divisão *Spermatophyta* por sua vez pode ser subdividida em *Gymnospermae* e *Angiospermae*. As madeiras da subdivisão *Gymnospermae* são denominadas coníferas e/ou resinosas e/ou moles ao passo que as da subdivisão *Angiospermae* são ditas folhosas e/ou não resinosas e/ou duras (39). Como exemplos de coníferas produtoras de madeiras moles podemos mencionar os pinheiros, do gênero *Pinus*, os cedros verdadeiros do gênero *Cedrus*, os ciprestes e as araucárias. Entre as espécies produtoras de madeira dura estão o mogno, jacarandá, andiroba e o eucalipto (39). A classificação das madeiras em duras ou moles indica antes tipos de estrutura e composição do que propriedades mecânicas das mesmas.

### 1.1. Estrutura da madeira

De uma maneira geral as madeiras são constituídas de quatro componentes principais: celulose, hemicelulose, lignina e os assim chamados extrativos (39,55).

#### 1.1.1. Celulose- Estrutura Química

A celulose é um polímero homogêneo, não ramificado, cuja cadeia polimérica é constituída de centenas de unidades monossacarídicas, de apenas um tipo, D-glicose, ligadas covalentemente por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$ (Figura 1). Os dois resíduos terminais de glicose da cadeia polimérica de celulose diferem entre si pela natureza redutora de uma das extremidades.

Na madeira, as moléculas de celulose são mantidas juntas, de tal maneira a formar microfibrilas, as quais por sua vez são organizadas em um arranjo paralelo, lado a lado, formando fibrilas, que se entrelaçam, formando então as fibras de celulose (Figura 2)(55). Duas regiões morfológicamente diferentes podem ser bem caracterizadas, quando se analisa as fibras de celulose por difração de raios-X; uma região cristalina, altamente organizada e uma região amorfa, desordenada. As propriedades físicas das fibras de celulose, tais como resistência à tração mecânica, alongamento e capacidade de sovatação, dependem do grau de organização (grau de cristalinidade) das mesmas (39).

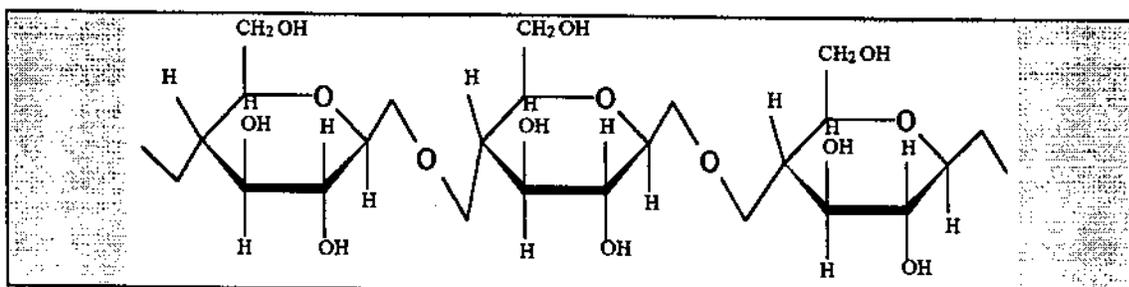
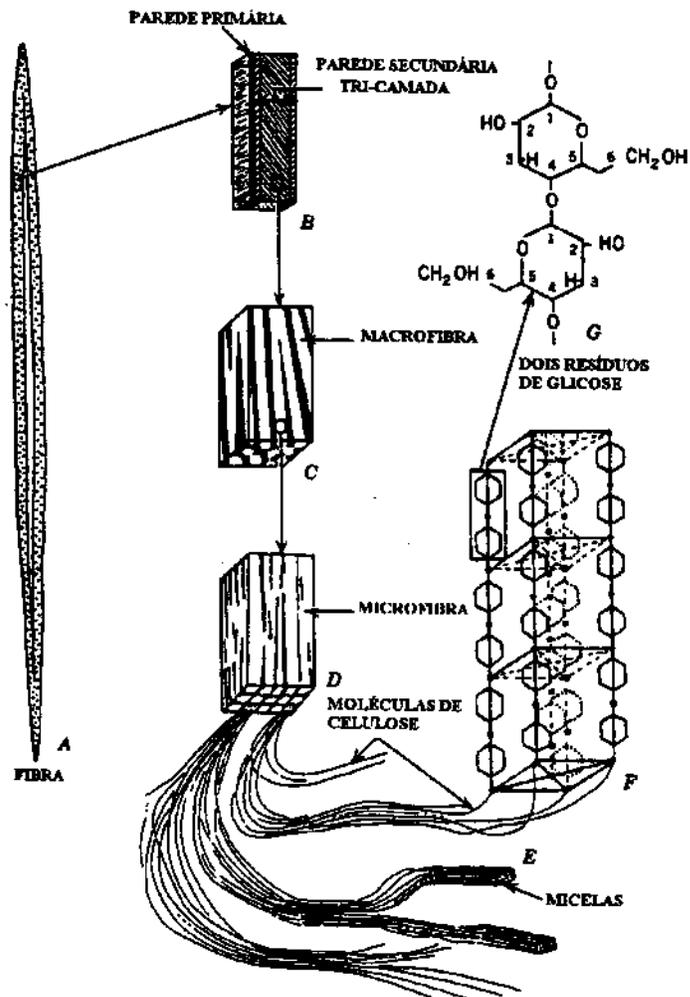


Figura 1. Representação da subestrutura da molécula de celulose.



(adaptado da ref. 86)

**Figura 2.** Representação esquemática das fibras de celulose e sua disposição espacial na madeira.

### 1.1.2. - Celulose - Comportamento Químico

Os grupamentos -OH livres dos resíduos de glicose na cadeia polissacarídica da celulose são os responsáveis pelas reações apresentadas por este polímero, algumas das quais são de grande interesse industrial. Tais grupamentos podem sofrer reações de substituição, adição e reações de oxido-redução. São de interesse industrial os derivados carboximetilcelulose, acetato de celulose, nitrato de celulose, xantato de celulose, celofane, rayon (39,55,72,128). Por outro lado as ligações glicosídicas β(1→4), entre as unidades monossacarídicas, podem sofrer reações de hidrólise tanto em meio ácido, quanto em meio alcalino, embora neste último, apenas em condições especiais. Assim por exemplo, em meio alcalino e a temperaturas superiores a 70 °C, a celulose pode ser hidrolizada na sua extremidade redutora, perdendo uma glicose, reação esta que é conhecida como "peeling" (39,145). O isolamento de celulose, particularmente em madeira, será discutido em seções posteriores.

### 1.1.3. Hemiceluloses - Estrutura Química

Hemiceluloses constituem na verdade um grupo de substâncias poliméricas formadas a partir de unidades monossacarídicas diferentes. Portanto são polissacarídeos heterogêneos, contendo nas suas estruturas tanto hexoses, quanto pentoses. Possuem cadeia polimérica ramificada e de baixa massa molecular. Em geral, as hemiceluloses contidas na madeira são misturas complexas de polissacarídeos, variando em composição de acordo com o tipo de madeira. Assim são freqüentes as glicouranoxilanas, arabinoglicouranoxilanas, galactoglicomananas, arabinogalactanas e outras. A ligação glicosídica mais freqüente nas hemiceluloses é a ligação do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , porém ligações do tipo  $\beta(1 \rightarrow 3)$  e  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  também podem ser encontradas, particularmente nas ramificações (39,55).

### 1.1.4. Lignina- Estrutura Química

Lignina é uma substância cuja molécula é extremamente complexa, polimérica, heterogênea, formada a partir de três tipos diferentes de unidades monoméricas, derivadas de 4-hidroxiarilpropenil álcoois, sendo eles; álcool trans-*para*-cumárico (I) (unidade hidroxifenil), álcool trans-sinápílico (II) (unidade siringil) e álcool trans-coniferílico (III) (unidade guaiacil) (Figura 3)(2,39,55,80). Na molécula de lignina, tais unidades são distribuídas ao acaso e ligadas covalentemente por pelo menos dez tipos de ligações químicas diferentes. Estas incluem ligações tipo éter, alquil-aril, alquil-alquil e aril-aril, sendo que a mais freqüente é a ligação do tipo  $\beta$ -O-4, representando em torno de 50% das ligações. São freqüentes também ligações do tipo -C-C-, como as ligações difenil e diarilpropano, particularmente a ligação  $\beta$ -1 (Figura 4). Os grupamentos funcionais que portanto definem as características estruturais e químicas de lignina são os grupos hidroxílicos de álcoois primários e secundários, hidroxílicos de fenóis, eterificados e livres, grupos carbonílicos de diferentes tipos, metoxilas ligadas à anéis aromáticos e insaturações. O caráter aromático da estrutura de lignina está em torno de 51 % (2,55,80).

Lignina apresenta uma molécula tridimensional, estereoquimicamente bastante complexa, amorfa e óticamente inativa. À semelhança de hemiceluloses, a rigor, nós devemos conceituar lignina como um grupo de substâncias, denominadas "ligninas", desde que o conteúdo relativo de cada um dos vários tipos de unidades monoméricas é variável, assim como também o tipo de ligação química entre elas. Portanto, o que se observa é que, dependendo da sua origem, tipo de madeira ou diferentes partes de um mesmo tecido, a lignina encontrada possui diferentes características estruturais. Em geral, ligninas encontradas em madeiras moles apresentam um alto teor de álcool coniferílico (unidades guaiacil) em contraposição às ligninas encontradas em madeiras duras, as quais apresentam quantidades equivalentes de álcool coniferílico e álcool sinápílico (unidades siringil) (2,51,55,80). Com base nestas constatações experimentais foram sugeridos os termos lignina guaiacil e lignina guaiacil-siringil, que denominam respectivamente os dois tipos principais de lignina, quanto a sua composição (2,55). Assim por exemplo, as ligninas encontradas no gênero *Eucalyptus* são caracteristicamente ligninas guaiacil-siringil (19,39).

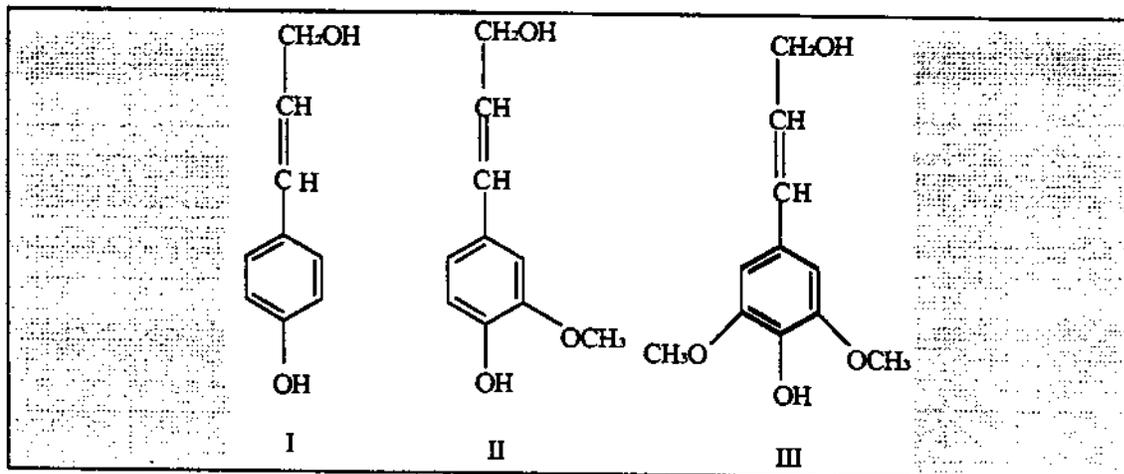
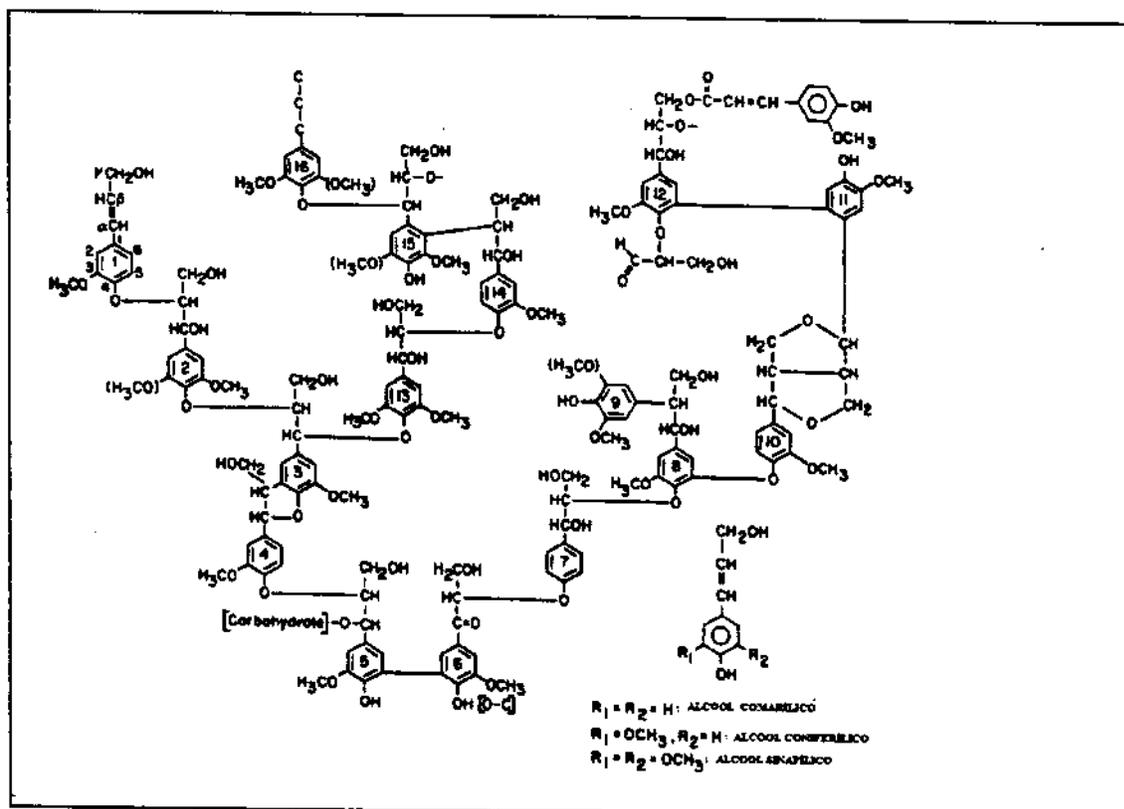


Figura 3. Estruturas precursoras na formação de lignina, álcool *para*-cumárico (I) ; álcool coniferílico (II) ; álcool sinapílico (III).

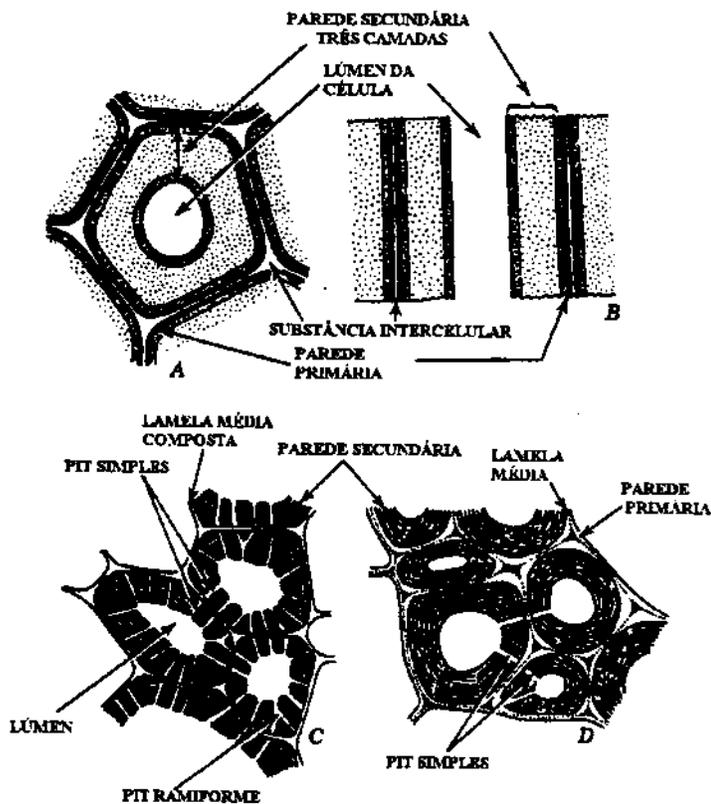


(adaptado ref. 55)

Figura 4. Representação parcial da molécula de lignina e seus precursores.

Na madeira, lignina pode ser encontrada nas paredes primária e secundária das células, as quais detêm a maior fração da quantidade total de lignina (70-90%) (Figura 5). Também é encontrada nos espaços intercelulares, lamela média, que individualmente possui a maior concentração de lignina, comparativamente às outras partes de um mesmo tecido. Nas paredes celulares, lignina aparece ligada a hemicelulose, formando uma espécie de "cimento" no qual as fibrilas de celulose estão embebidas (Figura 2) (55,86). Na lamela média, forma uma espécie de retículo com cadeias paralelas e entrecruzadas, conferindo propriedades adesivas que mantêm as várias células do tecido vegetal agregadas. O papel da lignina nos tecidos vegetais é o de conferir força e resistência mecânica, porém com elasticidade. Um outra função da

lignina é a de proteção da madeira contra degradação microbiológica, função esta desempenhada graças a sua natureza recalcitrante ou seja de difícil biodegradação (18,55,110,80,93). Desta maneira, lignina desempenha um papel fundamental no controle do ciclo de carbono na biosfera, uma vez que controla ou condiciona a degradação de celulose e hemicelulose por microorganismos.



(adaptado da ref. 86)

Figura 5. Representação esquemática da parede celular de madeira.

### 1.1.5. - Lignina - Comportamento Químico

As principais reações apresentadas por lignina são as de sulfonação, mercaptação, halogenação, nitração e oxidação (39,61,62). A sulfonação é a principal reação, do ponto de vista industrial, uma vez que os processos convencionais de polpação de materiais ligninocelulósicos empregam técnicas baseadas na dissolução de lignina (e outros componentes da madeira), na forma de derivados, tais como ligninossulfonatos ou ácidos ligninossulfônicos (61,145). Também a halogenação, utilizando cloro ou dióxido de cloro, constitui um importante processo industrial, empregada no branqueamento de polpas celulósicas. Tal reação gera cloroligninas e clorofenóis de baixo peso molecular (61,62). Além da reação de halogenação, dióxido de cloro e hipoclorito de sódio promovem ainda extensa oxidação dos grupamentos fenólicos e carbonílicos de lignina, gerando derivados de cor castanho-escuro, os quais são os responsáveis pela cor escura dos efluentes de indústrias de papel e celulose (95). Em adição, a cor castanha das polpas celulósicas não branqueadas e a cor amarelada do papel são também conseqüências da oxidação da lignina residual contida nos mesmos (39).

Por outro lado, a lignina não é facilmente hidrolizável, não apresentando assim reações de hidrólise enzimática, porém, hidrólise ácida e principalmente alcalina são possíveis em condições especiais de pH e temperatura. Estas reações, combinadas com as reações de sulfonação ou de halogenação, são também utilizadas nos processos de polpação e branqueamento de polpas, respectivamente (61,62), desde que promovem a despolimerização de estruturas de mais alto peso molecular, com a conseqüente formação de derivados de baixo peso molecular. Neste caso, tais derivados contêm um número maior de grupamentos hidroxílicos, que em adição a outros acima mencionados, conferem aos mesmos uma maior solubilidade em meio aquoso, facilitando assim sua dissolução no licor de polpação ou branqueamento.

Todos os métodos empregados para extração de lignina da madeira, em maior ou menor grau, acarretam modificações na sua estrutura, inclusive os métodos de extração com solventes. Assim, baseado no método de extração, diversos tipos de lignina podem ser obtidos, sendo que os principais são (39,95):

- i) Lignina de Brauns - obtida pela extração exaustiva de serragem de madeira com etanol, à temperatura ambiente.
- ii) Lignina de Björkman ou "milled wood lignin" - é a lignina que se obtém utilizando-se a extração da madeira finamente moída com solventes neutros, como por exemplo dioxano. Em princípio, esta é a forma de lignina, obtida por extração, menos quimicamente modificada.
- iii) Lignina Klason - este tipo de lignina é obtido em condições drásticas de extração, apresentando-se portanto bastante modificada quimicamente. É obtida pela hidrólise com ácido sulfúrico concentrado.
- iv) Lignina Kraft - é a lignina extraída do licor de polpação ("black liquor") obtido no processo industrial de produção de polpas celulósicas de mesmo nome, Kraft.

### 1.1.6. Extrativos

O termo "extrativo" é empregado para denominar uma fração menor (5-10%) dos componentes da madeira que podem ser extraídos com solventes orgânicos como etanol, acetona, diclorometano. Engloba uma grande variedade de substâncias, com características estruturais bastante diversificadas, tais como ácidos graxos e terpenóides, incluindo resinas ácidas, óleos voláteis, álcoois polihidroxilados, lignanas e flavonóides (39,55,95).

## 1.2. Madeira - Uso Industrial

### 1.2.1. Considerações Gerais

A madeira representa uma forma renovável de biomassa, de relativamente alto conteúdo de energia de fácil obtenção, bastante estável e facilmente manipulável. Como fonte de energia tem sido utilizada a milhares de anos, porém, como fonte de matéria-prima para a produção de inúmeros produtos químicos de interesse industrial, excetuando-se a produção de papel e celulose, tem sido pouco aproveitada, em relação ao seu enorme potencial (72,128).

A produção de papel e celulose é a maior responsável pela grande demanda de madeira, com uma produção mundial em torno de 120 milhões de toneladas de polpas por ano (47,111,121). Através deste processo de polpação, a celulose é obtida após extração dos demais componentes da madeira, gerando portanto uma quantidade enorme de subprodutos como lignina, hemicelulose, açúcares, etc (95,145).

Considerando-se os números acima, podemos estimar por exemplo, que a produção de lignina ( modificada e derivados) deve ficar em torno de 60 milhões de toneladas/ano, as quais são principalmente evaporadas e queimadas com o objetivo de se produzir energia (100). Apenas uma fração muito pequena é aproveitada em outros processos industriais, por exemplo como “pelletizante” para rações animais e adesivos/ligantes para aglomerados. Inúmeros trabalhos têm apontado possíveis alternativas para a utilização industrial de ligninas, particularmente como fonte de produtos aromáticos de interesse na síntese de polímeros (72,128). No entanto, deve aqui ser ressaltado, que a viabilidade econômica do processo de produção de polpas celulósicas depende da energia obtida com a queima de subprodutos tais quais lignina e outros. Portanto, qualquer uso alternativo que seja proposto para lignina e derivados, deve ser economicamente mais atrativo que a sua queima. As considerações acima são válidas apenas para o processo de polpação propriamente dito, embora o processo de branqueamento de polpas também gere lignina e derivados, particularmente cloroligninas. Isto se deve ao fato de que, neste caso, o destino destes subprodutos é o meio ambiente, na forma de efluentes industriais líquidos. Considerações mais detalhadas sobre o processo de polpação são realizadas na seção seguinte.

## **1.2.2. - Produção de polpas celulósicas e papel**

### **1.2.2.1. - Princípios gerais da polpação-produção de polpas não branqueadas**

✓ O objetivo do processo de polpação é obter as fibras de celulose livres dos demais componentes da madeira, especialmente de lignina, para que esta assuma as características mecânicas necessárias para a fabricação de papel (39,61,145). Pelas propriedades físico-químicas apresentadas por lignina, bem como a sua disposição estrutural na madeira, a extração deste componente constitui-se o ponto crítico do processo de polpação, o qual pode ser realizado por processo mecânico, químico e químico-mecânico.

A desfibrção da madeira pode envolver apenas processo mecânico, sendo que a polpa produzida nestas condições presta-se à produção de papel de moderada resistência e baixa alvura. O uso destinado a este tipo de papel deve prescindir de longa durabilidade, como por exemplo “papel jornal” (39,145).

A deslignificação da madeira através de processo químico exige modificações morfológicas e físico-químicas na sua estrutura, com a conseqüente penetração e difusão dos agentes químicos de polpação nas células. No interior das estruturas celulares, tais agentes de polpação promovem a despolimerização de lignina, gerando fragmentos de menor massa molecular, através da clivagem das ligações entre as unidades recorrentes formadoras da sua estrutura polimérica. Concomitantemente promovem ainda a introdução de grupamentos hidrofílicos, tornando-a mais solúvel no meio de polpação (39,61,111).

Dois processos tecnológicos principais respondem quase pela totalidade da produção mundial de polpas, que são os processos sulfito e o Kraft (sulfato em meio alcalino)(39,61,145).

O processo sulfito utiliza um licor de polpação contendo dióxido de enxofre e um óxido alcalino, que pode ser de sódio, magnésio ou cálcio. A retirada de lignina ocorre via sulfonação a temperaturas elevadas.

✱ O processo Kraft predomina a nível mundial e particularmente no Brasil, é o único tipo de processo químico de polpação (Figura 6). Tal tecnologia envolve o cozimento da madeira, já sem a casca e na forma de “chips”, com um licor de polpação

contendo hidróxido de sódio e sulfeto de sódio a 160-180 °C, utilizando portanto condições drásticas de pH e temperatura (39,61,145). Nestas condições, as reações químicas responsáveis pela deslignificação são tipicamente reações de adição nucleofílicas dos agentes de polpação ( $HS^-$ ,  $HO^-$ ), as quais promovem a clivagem das ligações  $\alpha$  e  $\beta$ -ariléter nas subunidades fenólicas, bem como a clivagem das ligações  $\beta$ -ariléter das subunidades não-fenólicas, sendo esta última a reação mais importante (61). Os fragmentos de lignina produzidos possuem uma estrutura química bastante modificada, a qual apresenta um conteúdo relativo de grupamentos hidroxílicos, fenólicos e não fenólicos maior, embora o caráter aromático seja bem menor (98,102,153). Apresentam ainda grupamentos sulfônicos, hidrofílicos, que conferem então, como já mencionado, maior solubilidade aos fragmentos, no meio de polpação. Reações de condensação entre as subunidades de lignina competem com as reações de fragmentação e dissolução mencionadas acima (61).

Nas condições da polpação tipo Kraft, em torno de 55 % do peso seco da madeira é dissolvido no licor de polpação, assim como também, 90-95 % da lignina originalmente contida na mesma (95,145). Também hemicelulose, um outro constituinte da madeira, é retirado por hidrólise, sendo igualmente dissolvido.

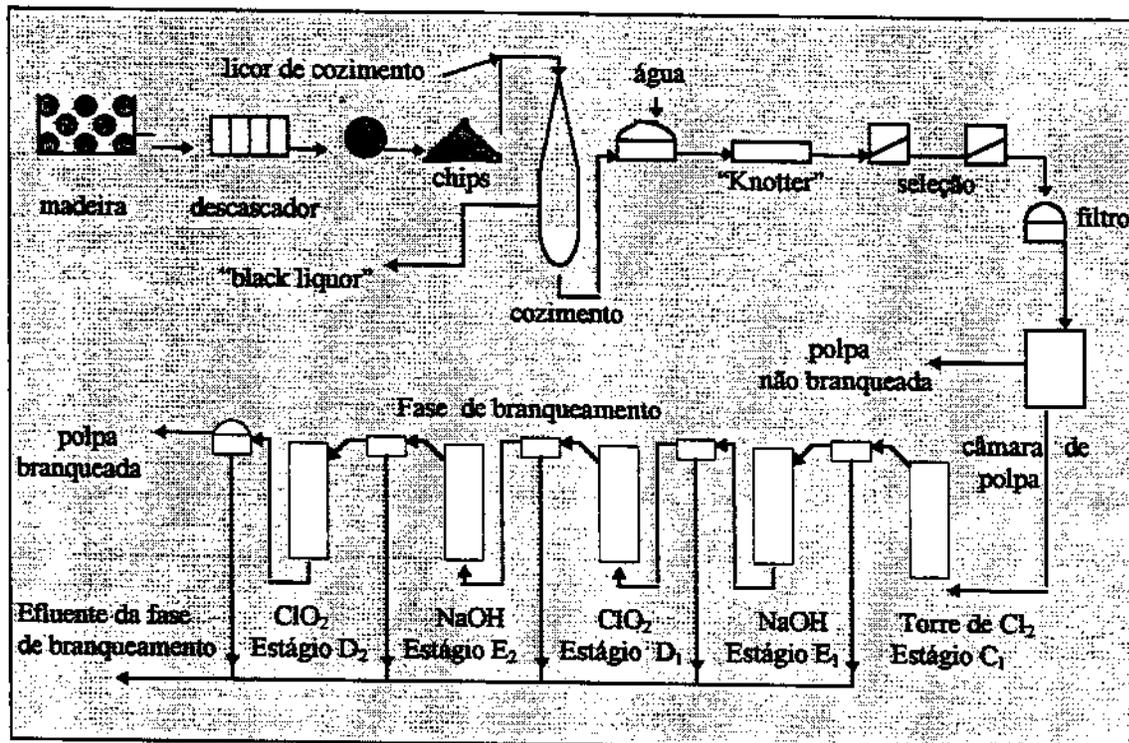


Figura 6. Diagrama do processo de polpação tipo Kraft, produzindo ambos os tipos de polpas, não branqueada e branqueada, utilizando um processo de branqueamento convencional.

A polpa então produzida possui ainda um certo teor de lignina residual, 5-10 %, a qual por ter sofrido reações de oxidação, apresenta uma cor mais escura, conferindo também este aspecto à polpa, por este motivo dita polpa não branqueada. O licor de polpação, resultante ao final desta operação, contém um alto teor de matéria orgânica, constituído principalmente de lignina de baixa massa molecular e derivados tiólicos, hemicelulose, açúcares e derivados ácidos e a fração de extrativos da madeira. Tal licor não se constitui em efluente a ser descartado para o meio ambiente, ou a bem da verdade, apenas uma fração mínima deste pode ter este destino (3-5%). Isto se deve ao fato de que o processo de polpação é realizado em um sistema praticamente

fechado, no qual o licor resultante é concentrado por evaporação e então queimado, recuperando assim boa parte da energia gasta no processo (em torno de 65-75 %). Deve ser ressaltado que alguns extrativos podem ser obtidos ou recuperados do licor de polpação, sendo o mais importante deles, em termos comerciais, a fração denominada de "tall oil" (72).

#### 1.2.2.2. - Princípios gerais da fase de branqueamento de polpas

A quantidade de lignina residual na polpa não branqueada pode ser estimada pela medida do parâmetro denominado número de Kappa, o qual é representado pela quantidade (volume) de permanganato de potássio 0,1 N (como oxidante de lignina) gasto por grama de pasta celulósica seca, sob condições definidas e corrigidas para um consumo de 50 % de permanganato. Assim por exemplo, um valor de Kappa igual a 30 indica um conteúdo de lignina residual de 5% (39,145).

Na década de 80, este valor de número de Kappa, 30, era considerado um valor limite para as polpas não-branqueadas produzidas nas condições tecnológicas da época. Hoje, processos de polpação modernos e mais eficientes trabalham com um valor de Kappa de 13-18, obtendo polpas de qualidade superior (111,121).

A característica da polpa não branqueada, evidenciada pelo número de Kappa, determina as condições em que se deve operar o branqueamento, ou seja determina a quantidade e a natureza dos agentes químicos empregados no processo. Portanto, tal fator, indiretamente, tem importantes implicações na natureza dos efluentes a serem gerados na produção de polpas branqueadas.

Com base nestas considerações, é possível entender porque a fase de branqueamento é sem dúvida a mais problemática e onerosa do processo total de produção de polpas branqueadas. Não só pelos custos diretos com a produção, mas também pelos custos indiretos, gerados particularmente com o tratamento de efluentes produzidos, como será discutido a seguir.

Independentemente da tecnologia utilizada, a fase de branqueamento é realizada em vários estágios, onde diversos agentes químicos podem ou têm sido empregados. Nos últimos 10 anos, as modificações tecnológicas introduzidas neste processo foram significativas, criando inúmeras possibilidades em termos de seqüência de agentes de branqueamento (111,121).

Os processos mais convencionais utilizam ainda o tratamento com cloro molecular ( $\text{Cl}_2$ ), aliado a dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) e seguido de sucessivas extrações alcalinas com NaOH concentrado (Figura 6). Uma das seqüências mais empregadas é: i) tratamento com cloro molecular ( $\text{C}_1$ ); ii) extração alcalina, com NaOH ( $\text{E}_1$ ); iii) dióxido de cloro ( $\text{D}_1$ ); iv) extração alcalina ( $\text{E}_2$ ); v) dióxido de cloro ( $\text{D}_2$ ).

A etapa  $\text{C}_1$  emprega em torno de 40-45 kg de cloro/tonelada de polpa (dependendo do número de Kappa da polpa), à temperatura de 15-30 °C e um pH final de 1,5-2,0. Nestas condições, ocorre a cloração das subestruturas aromáticas da lignina residual da polpa, bem como a desalquilação oxidativa, com a conseqüente despolimerização das estruturas de maior massa molecular (62). Ambas as reações envolvem um ataque eletrofilico inicial aos anéis aromáticos, efetuado pelos ions cloronium,  $\text{Cl}^+$ , formados pela cisão heterolítica, e não homolítica (gerando radicais), da ligação Cl-Cl (62). Além da introdução de cloro, vários grupamentos ácidos são formados na estrutura polimérica de lignina, bem como estruturas do tipo quinonóide. As reações das subestruturas de lignina com cloro podem ser esquematizadas como nas Figuras 7 e 10.

A etapa E<sub>1</sub> é a extração alcalina da polpa clorada na etapa C<sub>1</sub>. Em geral são empregados 30-40 kg de alcali/tonelada de polpa, a temperatura de 60-70 ° C e a um pH final de 11,0-12,0. O tratamento alcalino da polpa promove a transformação das estruturas quinonóides da cadeia polimérica de lignina (formadas durante o tratamento anterior, C<sub>1</sub>) em hidroxi-derivados (62,98). No caso de estruturas quinonóides cloradas, ocorre a conseqüente substituição de cloro, via reação nucleofílica dos íons hidróxido (OH<sup>-</sup>) com as subestruturas aromáticas. Também ocorre a substituição de cloro alifático por grupamentos hidroxílicos (102). Os íons hidróxido podem ainda reagir com os grupamentos carbonílicos de estruturas *orto*-quinonóides promovendo rearranjos moleculares com a formação de estruturas tipo hidroxi, carboxi-ciclopentadieno (Figura 8)(62). Por outro lado, a extração alcalina pode se tornar mais eficiente, com relação a remoção de lignina e obtenção de um maior índice de alvura da polpa, se um agente oxidante nucleofílico, como por exemplo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou ClO<sup>-</sup>, for adicionado ao meio (62).

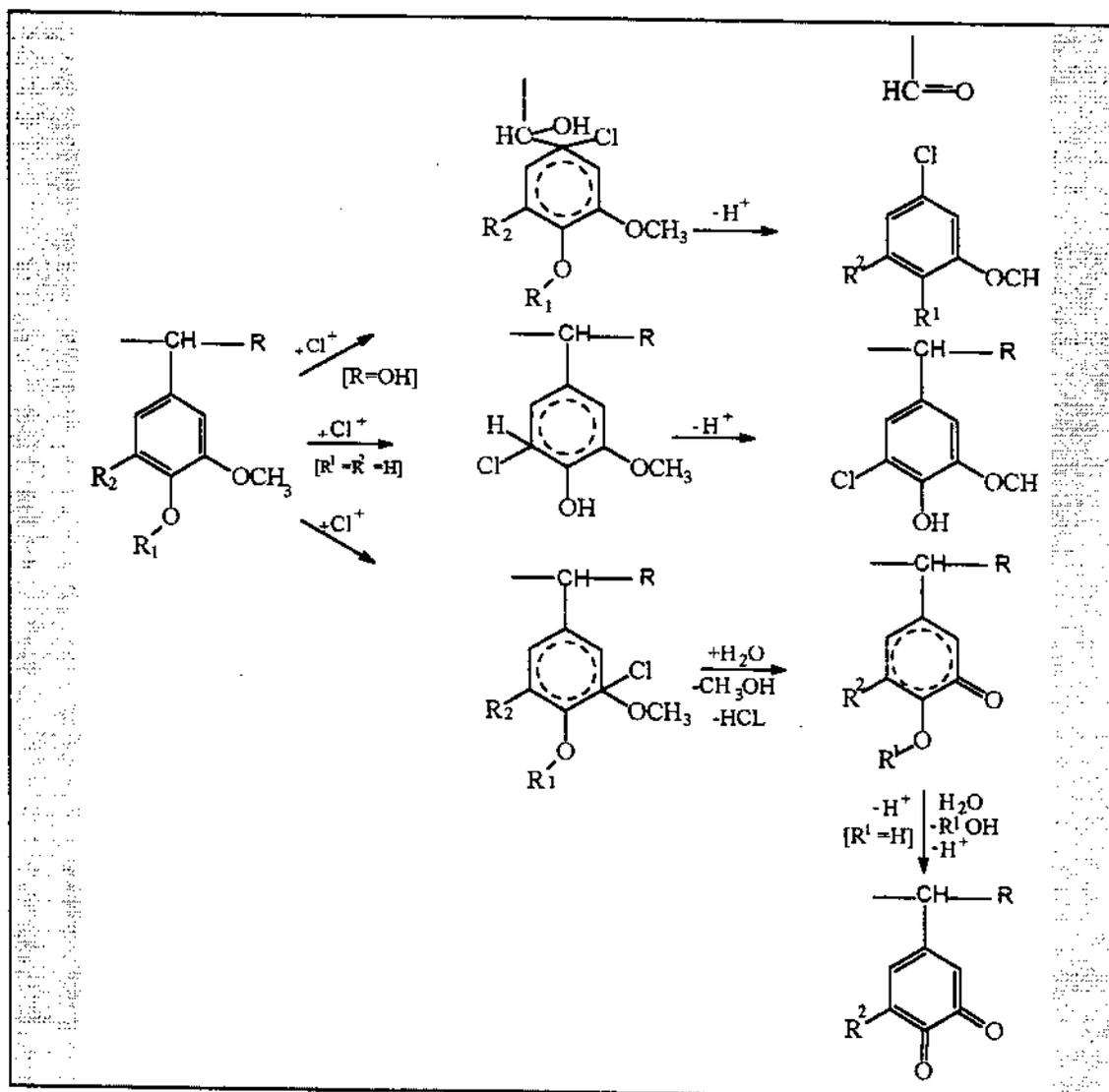


Figura 7. Reações de cloro molecular, ou mais especificamente íons cloronium, com a lignina residual da polpa.

A utilização de dióxido de cloro, etapa D<sub>1</sub>, como agente de branqueamento tem sido intensificada e recomendada, inclusive em substituição ao cloro molecular,

(13,31,98,111,112) particularmente em função da sua maior especificidade em relação à lignina e principalmente devido aos efeitos deletérios ao meio ambiente, provocados pelo uso de cloro molecular.

Dióxido de cloro promove a oxidação de grupamentos fenólicos da lignina, via reação eletrofílica envolvendo os radicais  $\cdot\text{ClO}_2$  e  $\cdot\text{HClO}_2$ , os quais subtraem H destes grupamentos com a conseqüente formação de fenoxi-dienonil radicais (62,168). Tais reações produzem derivados tipo ácido mucônico, após clivagem dos anéis aromáticos, ou estruturas tipo quinonóides (Figura 9).

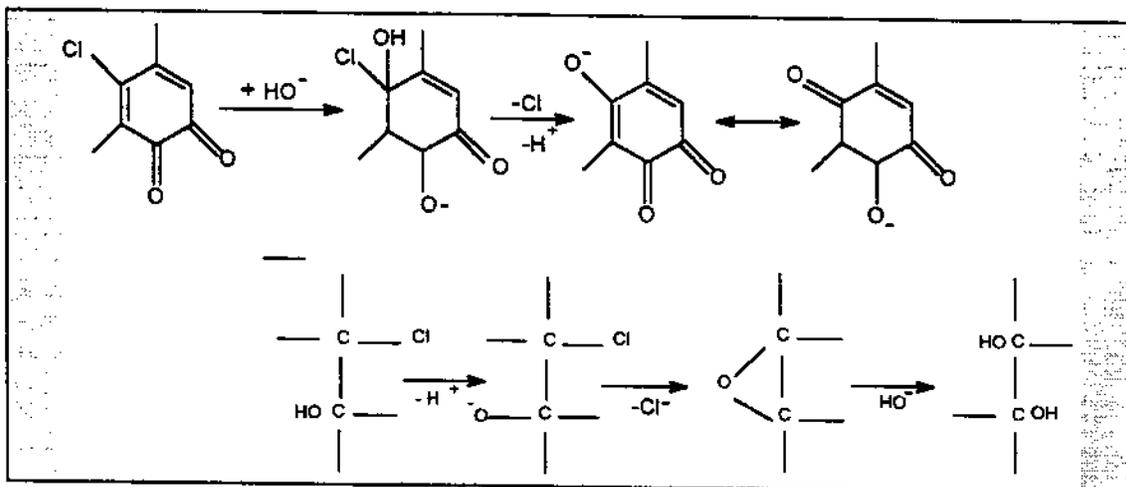


Figura 8. Reações das subestruturas cloradas, com  $\text{OH}^-$ , durante a fase da extração alcalina da polpa ( $\text{E}_1$ ).

Estudos mais recentes com ácido 3,4-dimetoxibenzoico e 4-metil-veratrol demonstraram que dióxido de cloro pode também reagir com estruturas não fenólicas (149). Neste caso, o mecanismo proposto envolve a formação de um cation radical através de um complexo de transferência de carga, seguido pela adição eletrofílica de  $\text{ClO}_2$  ao anel aromático (Figura 9). Contrariamente à ação de cloro, dióxido de cloro não promove reações de substituição, não gerando portanto, diretamente, derivados clorados. Os possíveis derivados clorados formados neste caso são provavelmente produtos da ação do cloro molecular gerado pela decomposição parcial do dióxido de cloro (62). Portanto o tratamento de polpas com dióxido de cloro gera, proporcionalmente, uma quantidade bem menor de derivados organoclorados, quando comparado com o tratamento com cloro molecular (13,111). Este fato tem importantes implicações do ponto de vista ambiental, como será discutido mais adiante.

Durante o processo completo de branqueamento, em torno de 70 kg de matéria orgânica, por tonelada de polpa branqueada, são dissolvidos nos vários licores empregados, sendo que destes, aproximadamente 50 kg são provenientes de lignina, 19 kg de polissacarídeos e 1 kg oriundos de extrativos (esta quantidade pode variar em função do tipo de polpa, de madeira dura ou mole). Os estágios C e  $\text{E}_1$  são responsáveis por aproximadamente 80-85 % da quantidade total de matéria extraída no processo completo (85,102,168).

Nos processos convencionais de branqueamento, o efluente final da planta de branqueamento é formado pela soma dos efluentes de cada estágio. Em função do alto conteúdo de cloro deste efluente, não é possível operar esta fase em um sistema fechado, como na fase de polpação. Assim sendo, tal efluente, após tratamento

externo, é liberado para o meio ambiente, fato este que constitui um grande problema para as indústrias de papel e celulose (95,112,157).

Várias outras técnicas de branqueamento têm sido desenvolvidas, visando não só tornar o processo mais eficiente, mas principalmente torná-lo menos poluente e mais compatível com as exigências de qualidade ambiental dos dias atuais. O uso de agentes de branqueamento alternativos como por exemplo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )(13), ozônio ( $O_3$ )(13,129), oxigênio molecular ( $O_2$ )(98) e enzimas ligninocelulolíticas (21,47,111,168) têm sido estudados e gradativamente tendem a substituir o uso de cloro e/ou dióxido de cloro (111).

O processo de deslignificação de polpas empregando-se oxigênio molecular ( $O_2$ ) tem sido bastante utilizado, inclusive adaptado ao uso intercalado em seqüências convencionais de branqueamento, onde, em geral, constitui uma fase de pré-tratamento

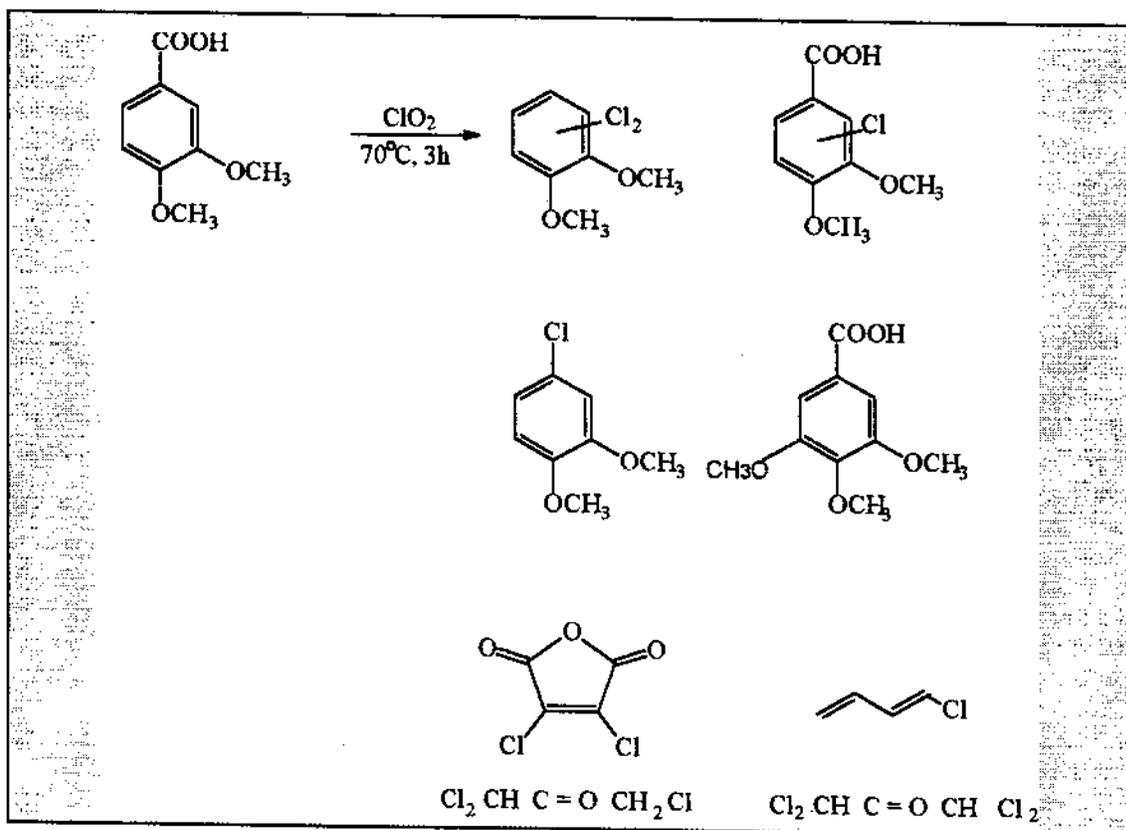
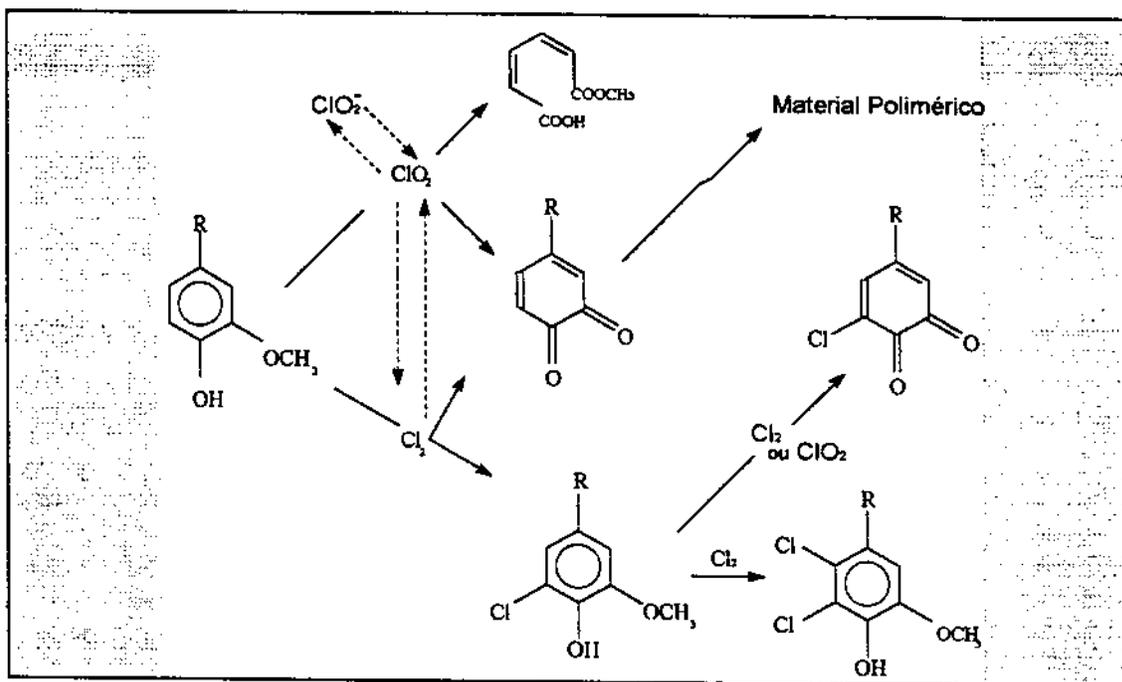


Figura 9. Reações de dióxido de cloro com estruturas não aromáticas, relacionadas com lignina.



**Figura 10.** Reações de cloro e dióxido de cloro, usados como agente de branqueamento, com subestruturas fenólicas da lignina residual da polpa.

da polpa(13,98). O oxigênio molecular, como dirradical, promove a retirada de H de grupamentos hidroxílicos fenólicos e enólicos das subunidades de lignina, via reação eletrofílica inicial, desencadeando então a auto-oxidação destes grupamentos, através da adição eletrofílica do oxidante aos radicais intermediários. Em meio alcalino, promove também a retirada de elétrons de íons fenolatos, produzindo fenoxi-ciclohexadienonil radicais. Como consequência destas reações, ocorre intensa ruptura de estruturas aromáticas e despolimerização de ligninas de maior massa molecular, através da clivagem de ligações do tipo C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> (62,98).

A utilização de ozônio como agente de branqueamento também apresenta-se como uma alternativa bastante promissora. Ozônio é um dipolo do tipo 1,3 que pode ser representado por quatro formas mesoméricas (62):



Do estudo de ozônio com substâncias padrão, cujas estruturas químicas são relacionadas com a de lignina, quatro tipos de reações químicas são evidentes: i) substituição eletrofílica nas estruturas aromáticas resultando na hidroxilação dos anéis ou na desalquilação oxidativa; ii) ciclo-adição de ozônio à estruturas aromáticas, resultando na clivagem do anel ou ciclo-adição à duplas ligações, resultando na formação de grupamentos carbonílicos.; iii) oxidação de álcoois, aldeídos e éteres, via formação de hidroperóxido intermediário. O quanto cada uma das reações citadas é operante ou efetiva na deslignificação de polpas, quando tratadas com ozônio, não é bem claro (62).

O branqueamento de polpas com peróxido de hidrogênio parece ser uma das alternativas mais promissoras e já encontra-se em uso progressivo (13,62,111). É fato bem conhecido que peróxido de hidrogênio degrada lignina com grande eficiência. Diferentemente dos agentes de branqueamento discutidos anteriormente, peróxido de

hidrogênio, em meio alcalino, promove reações nucleofílicas, através das quais ocorre a modificação química dos cromóforos existentes na polpa, sem que necessariamente ocorra a degradação e dissolução dos mesmos (62). Em meio ácido, o íon hidroxônio  $\text{HO}^+$  formado é a espécie reativa e portanto as mesmas reações eletrofílicas já mencionadas podem ser operantes. Portanto, para que se obtenha os efeitos desejados no branqueamento, as condições de reação, com relação a pH, temperatura, concentração de peróxido de hidrogênio, devem ser cuidadosamente controladas (13). Por outro lado, a decomposição de peróxido de hidrogênio na presença de metais é um fator limitante neste caso. A adição de quelantes de metais como por exemplo EDTA tem sido empregado para contornar este problema, com ótimos resultados (62,111).

Diversos estudos mostram que o uso combinado de ozônio ou dióxido de cloro, como pré-tratamento, com peróxido de hidrogênio constitui uma alternativa extremamente eficiente para o branqueamento de polpas. Assim sendo, seqüências tipo QZQP\* , AZQP\* e QPZP são descritas com rendimentos bastante satisfatórios com relação a redução de Kappa, aumento da alvura e viscosidade da polpa produzida. De uma maneira geral, o tratamento de polpas com peróxido de hidrogênio produz polpas com maior alvura e maior estabilidade térmica, para um dado valor de Kappa, comparado com processos convencionais (13).

Tais metodologias alternativas de branqueamento estão inseridas em uma das duas linhas tecnológicas que consolidam a “filosofia” atual de produção de polpas com menor impacto ambiental, sendo elas genericamente denominadas: i) ECF, “Elemental Chlorine-Free”, ou seja a produção de polpas branqueadas sem a utilização de cloro molecular e ii) TCF, “Totally Chlorine-Free”, produção de polpas sem o uso de qualquer forma de cloro (31,111,112). Polpas ECF já são efetivamente produzidas ao passo que a produção de polpas TCF ainda é incipiente, sendo que a produção mundial de ECF e TCF combinadas é estimada em 28 milhões de toneladas, das quais aproximadamente 85% são tipo ECF. Por outro lado, um objetivo ainda longe de ser alcançado, pelo menos como metodologia de uso generalizado, é o processo tipo TEF, “Totally Effluent-Free”, processo de produção de polpas branqueadas que operaria em sistema fechado, ou seja sem a emissão de efluentes (111).

### **1.2.3. - Efluentes de indústrias de papel e celulose.**

#### **1.2.3.1. - Composição química dos efluentes de processos convencionais.**

Como já mencionado anteriormente, o efluente gerado durante a produção de polpas celulósicas branqueadas vem basicamente da fase de branqueamento, uma vez que a fase de polpação é operada praticamente em sistema fechado (95,111). Também já foi mencionado, que nos processos convencionais de branqueamento, com seqüências tipo CEDED ou OCEDED por exemplo, as etapas C e  $E_1$  respondem por 80% da matéria orgânica (DBO e DQO) dissolvida no efluente final e particularmente o estágio  $E_1$  é o grande responsável pela cor escura apresentada por tal efluente (85,102,109).

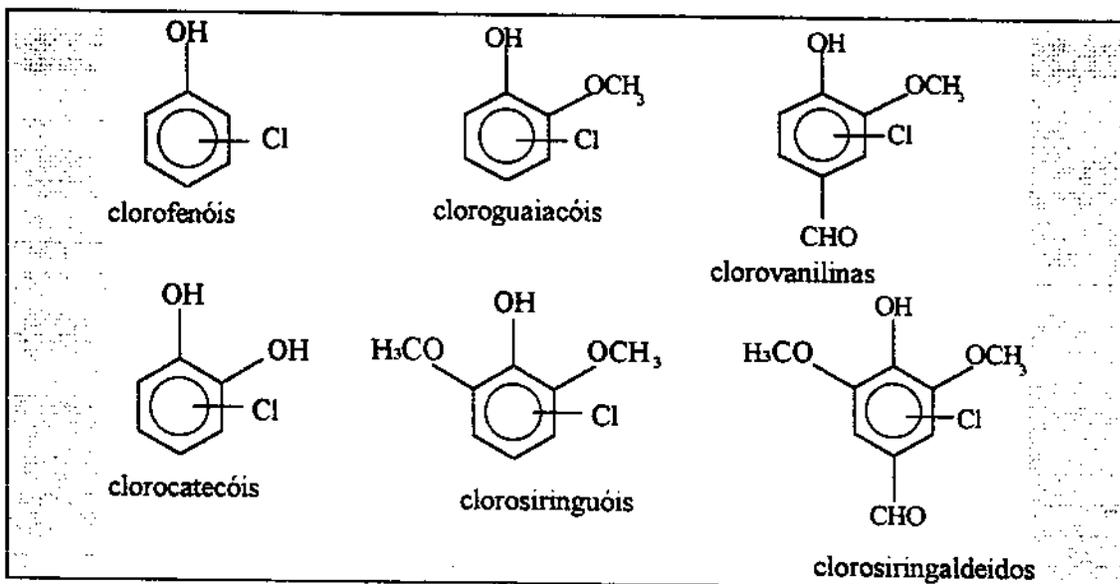
A quantidade e a composição química dos efluentes tipo Kraft variam especialmente em função das condições do branqueamento, do tipo de madeira utilizada, seqüência e concentração de agentes químicos empregados, entre outros fatores. A variação nas estruturas químicas de ligninas e hemiceluloses, de um tipo de madeira para outro e mesmo entre madeiras da mesma espécie, é um dos fatores responsáveis pela flexibilidade da composição química observada.

Por outro lado, as constantes modificações tecnológicas introduzidas nos últimos anos acarretaram uma evolução em termos de composição química bastante significativa, a qual estendeu-se também ao volume de efluente gerado (111,121). Assim por exemplo, plantas de branqueamento mais antigas, operando em condições estabelecidas na década passada, produziam algumas centenas de metros cúbicos de efluentes por tonelada de polpa (95). Hoje, é possível, nos processos mais eficientes, operar em condições cuja produção de efluentes fique em torno de 40 m<sup>3</sup> por tonelada de polpa (111,121). A tendência atual é reduzir ao máximo, sendo que a condição ideal seria obtida se o processo fosse operado em sistema fechado, com o reaproveitamento de alguns dos constituintes destes efluentes.

A complexidade e diversidade de estruturas químicas presentes nestes efluentes ficam evidentes pelas reações descritas para o branqueamento, o qual, como já foi dito, consome consideráveis quantidades de cloro (em torno de 45 kg/tonelada de polpa) e produz uma enorme variedade e quantidade de substâncias organocloradas (em torno de 2,0-1,5 kg/tonelada de polpa, para os processos mais eficientes)(111). A quantidade de substâncias cloradas é normalmente expressa pelo parâmetro AOX (adsorbable organic halogen)(7,31,112). Tais efluentes possuem ainda um alto conteúdo de substâncias que consomem oxigênio, portanto apresentam altos valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio), além de exibirem uma coloração bastante escura (7).

Dentre as centenas de substâncias químicas diferentes, identificadas em efluentes da fase de branqueamento, lignina de baixa massa molecular e seus produtos de degradação parcial, tais como clorolignina, clorofenóis, ácidos carboxílicos aromáticos, clorados e não clorados, constituem, quantitativamente, os principais componentes. Os tipos de clorofenóis mais frequentemente encontrados podem ser esquematizados como na Figura 11. Além destes, também resinas ácidas, clorofórmio, metanol, açúcares, açúcares ácidos, ácidos carboxílicos não aromáticos e derivados clorados, dentre outros, estão presentes (85,95,102,109,135,154,155,161).

A distribuição de massas moleculares (MM) também é bastante heterogênea, predominando estruturas com MM >1000 Da, as quais constituem de 75-85 % das estruturas totais (85,102,109,153). Dada a grande heterogeneidade química destas substâncias, a matéria orgânica contida nos efluentes pode ser dividida em várias frações, assim temos as frações ditas acídica, neutra e fenólica, tanto de alta-MM (MM > 1000) quanto de baixa-MM (MM <1000), cujas propriedades físico-químicas tais como solubilidade, estado de agregação molecular, etc., são diferentes. As frações de alta-MM detêm o maior percentual do cloro total (organoclorados) presente nestes efluentes, além de serem as grandes responsáveis pela já mencionada coloração escura dos mesmos (102).



**Figura 11 - Fenóis e seus derivados clorados, provenientes da degradação parcial de lignina, mais freqüentemente encontrados em efluentes de processos de branqueamento de polpas celulósicas.**

#### 1.2.3.2. - Efluentes de processos de branqueamento tipo ECF e TCF.

O número de estudos sobre as características destes efluentes é bem reduzido, particularmente com relação a sua composição química. Os dados disponíveis indicam que o processo de produção de polpas tipo ECF produz não apenas uma menor quantidade de clorofenóis totais, mas, particularmente, também menor quantidade de policlorofenóis, ou seja fenóis com três ou mais átomos de cloro (31,112). Este fato, do ponto de vista ambiental, é bastante relevante, desde que a toxicidade de clorofenóis parece aumentar com o número de cloros substituintes (95). Adicionalmente, os organoclorados (como AOX) gerados em processos tipo ECF são mais facilmente eliminados durante tratamento biológico do que os gerados em processos convencionais. A coloração escura do efluente é bem menos intensa que a de processos convencionais (31,111).

Processos tipo TCF que utilizam peróxido de hidrogênio como agente de branqueamento empregam também agentes quelantes de metais tais como EDTA e DTPA, os quais permanecem dissolvidos nos efluentes gerados nestes casos, inclusive após tratamento biológico com lodo ativado (148). Por outro lado a quantidade de AOX produzida é extremamente baixa (< 0,3), assim como também a coloração do efluente (31,111,112).

#### 1.2.3.3. - Impacto ambiental - Efeitos biológicos de efluentes da produção de polpas

##### 1.2.3.3.1. - Metodologia de avaliação de efeitos biológicos

Várias abordagens têm sido empregadas para avaliar os possíveis efeitos biológicos de efluentes industriais. A avaliação de toxicidade pode ser feita levando-se em consideração os efeitos tóxicos a curto prazo (em geral de 48 a 96 h), caracterizando-se assim a toxicidade aguda, ou os efeitos a médio (de 96 a 144 h) e longo prazo (mais de 144 h), onde são avaliadas a toxicidade subcrônica e crônica,

respectivamente (150). Tal avaliação de toxicidade pode ser realizada em laboratório, inclusive como análise de rotina, ou pode ser desenvolvida como um estudo de campo.

Uma grande variedade de técnicas utilizando organismos vivos, células isoladas, organelas, sistemas enzimáticos, etc. têm sido desenvolvidas. Como avaliação de rotina, em geral são utilizados testes cujo objetivo é a determinação da dose letal ( $LD_{50}$ ) ou concentração letal ( $LC_{50}$ ) do agente em estudo, que é capaz de provocar a redução de 50% do efeito avaliado, o qual na maioria dos testes, é a sobrevivência de um determinado organismo. No caso de efluentes industriais, pesquisa-se o fator de diluição do mesmo, em lugar de concentração (dose) letal. Neste contexto, têm sido empregados testes com microorganismos, microcrustáceos, algas, minhocas, peixes, etc. (219). Os testes de rotina mais freqüentemente utilizados são:

- i) Sistema Microtox - Avalia toxicidade baseado na relação concentração do agente/redução da bioluminescência ( $CE_{50}$ ) da bactéria marinha *Photobacterium phosphoreum*, cuja emissão luminescente é resultado da atividade geral do seu metabolismo oxidativo. Este teste é automatizado e emprega bactérias biofilizadas, constituindo-se hoje num dos principais testes de toxicidade aguda (27,150);
- ii) Testes com *Spirillum volutans* - Avalia o efeito tóxico agudo com base na relação concentração do agente/perda da motilidade reversa ( $MEC_{90}$ , 30 min.) desta bactéria extremamente móvel (150);
- iii) Testes com *Daphnia similis* - Também avalia toxicidade baseado na relação concentração do agente/perda da motilidade ( $CE_{50}$ ) deste microcrustáceo, podendo ser avaliada tanto a toxicidade aguda (48 h), quanto a toxicidade crônica (21 dias) (150);
- iv) Testes com peixes - Avalia a mortalidade destes organismos em função da concentração do agente tóxico. Os principais peixes ou os mais freqüentemente utilizados são *Brachydanio rerio* (paulistinha), *Oreochromis niloticus* (tilapia), (carpa), *Oncorhynchus mykiss* (truta, rainbow trout) (83,150).

Por outro lado, o desenvolvimento de indicadores bioquímicos de toxicidade (biomarcadores) em organismos-teste tem ganhado grande espaço não só em termos de trabalhos acadêmicos de pesquisa, mas também já a nível de legislação em países como por exemplo o Canadá (120). Indicadores bioquímicos são parâmetros bastante sensíveis, baseados em alterações metabólicas de determinados organismos "sensibilizados" por agentes poluentes, que podem indicar condições de sobrevivência adversas, de uma maneira precoce, ou seja, antes que manifestações clínicas mais drásticas comecem a surgir. Estudos visando a caracterização de biomarcadores em animais aquáticos, particularmente em peixes, têm sido intensamente desenvolvidos, com resultados bastante promissores (158,150).

Dentre o grande número de indicadores estudados e descritos na literatura, citocromo P450 e enzimas que indicam estresse oxidativo, tais como catalase, superóxido dismutase e glutathione redutase podem ser citadas (120,150). Citocromo P450 é um conjunto de enzimas de desintoxicação, constituído por várias formas isoenzimáticas, tais como  $P450_{SCC}$  (CYP11A1),  $P450_{11\beta}$  (CYP11B1),  $P450_{ALDO}$  (CYP11B2),  $P450_{AROM}$  (CYP19), etc.. Sua ocorrência, com relação ao tipo de tecido em que está presente, é bastante diversificada, tendo sido detectadas e caracterizadas nos rins, fígado, pulmão e células sanguíneas, entre outros tecidos (158). Diversos estudos demonstraram que o nível de atividade enzimática de Cit P450 é bastante sensível a presença de concentrações residuais de certos poluentes e que certas frações respondem especificamente a alguns tipos particulares de agentes tóxicos (120,150). Assim por exemplo a fração CYP1A1, em fígado de peixes, responde especificamente a hidrocarbonetos aromáticos (PAHs), bifenil policlorados (PCBs), dibenzo(p)dioxinas

policloradas (PCDDs) e dibenzofuranos policlorados (PCDFs), alguns dos quais estão presentes em efluentes de indústrias de papel e celulose (120,150).

#### 1.2.3.3.2. - Toxicidade de efluentes de indústria de papel e celulose

Do ponto de vista ambiental, a indústria de produção de polpas celulósicas e papel a partir de madeira é considerada uma das mais problemáticas. Como já bem caracterizado, tais indústrias descarregam no meio ambiente uma enorme variedade de substâncias químicas reconhecidamente tóxicas como clorofenóis, cloroligninas, além de resinas ácidas, dioxinas-derivados clorados e outros. Muitos destes compostos apresentam grande resistência para degradação biológica e química, que associada a natureza hidrofóbica dos mesmos, potencializa os efeitos tóxicos, via efeito de bioacumulação (95). Assim, em ambientes aquáticos, onde os sedimentos podem ser enriquecidos em concentração de compostos clorados, especialmente de clorofenóis, os efeitos biológicos decorrentes de bioacumulação via cadeia alimentar são de extrema importância.

O conceito dominante é que dentre as várias frações de diferentes massas-moleculares, as frações de baixa-MM são as que detêm os agentes químicos responsáveis pela toxicidade apresentada pelos efluentes (95,148). As principais substâncias apontadas como de alta toxicidade nestas frações são os clorofenóis, que são produtos de degradação parcial de lignina, destacando-se os derivados di e tricloreguaiacol, tri, tetra e pentaclorofenol, além de resinas ácidas, um grupo derivado de terpenos, como ácido abiético, dehidroabiético e pimárico. As frações de alta-MM são consideradas inertes e não tóxicas, desde que, em tese, não são capazes de penetrar nas células de organismos vivos, dado ao seu tamanho. Por outro lado, alguns estudos mostram que cloroligninas de alta-MM podem ser degradadas, em condições semelhantes às ambientais, gerando clorofenóis de baixa-MM, potencialmente tóxicos (48,109). Adicionalmente, os efeitos deletérios da coloração escura destes efluentes, que se despejados em ambientes aquáticos dificulta a penetração da luz, são atribuídos às frações de mais alta-MM, como já mencionado anteriormente.

Diversos estudos mostram os efeitos deletérios, que efluentes de indústrias de papel e celulose podem causar sobre organismos aquáticos. Desde modificações de comportamento e de distribuição populacional, até efeitos mais drásticos como diminuição da taxa de crescimento individual, hipertrofia e disfunção hepática e renal (120), aumento do nível de certas oxidases hepáticas (158,166) desenvolvimento irregular ou atrofia de gonadas, maturação sexual irregular e comprometimento da reprodução em peixes, deformação vertebral (131), alterações morfológicas em células sanguíneas (131), alteração do nível de esteróides sanguíneos (120), modificações fisiológicas e histopatológicas (83,131). Além do que, a capacidade mutagênica de alguns compostos existentes nestes efluentes, tais como cloroguaiacóis, clorocatecóis e outros, está claramente evidenciada (95).

A discussão destes resultados tem gerado muita polêmica entre indústrias, cientistas e instituições governamentais, em países como o Canadá, Estados Unidos, Suécia e Finlândia, proporcionando subsídios para que uma grande pressão seja exercida sobre as indústrias de papel e celulose, nos países citados (101,112). Embora já tenha sido comentado anteriormente, vale ressaltar que tal pressão tem sido a mola propulsora para investimentos em novas tecnologias nesta área de produção de polpas celulósicas e papel. Assim, importantes modificações têm sido introduzidas na linha de processamento como por exemplo a otimização do processo de polpação com a deslignificação estendida, uso de O<sub>2</sub> como agente deslignificante em adição ao

processo convencional (pré-tratamento), substituição de  $\text{Cl}_2$  por dióxido de cloro ou por outros agentes de branqueamento, sem a utilização de qualquer derivado de cloro (111,121).

Todas as modificações implementadas visam em última instância alterar parâmetros relacionados com a natureza dos efluentes a serem produzidos, tais como DBO, DQO e AOX, tornando o processo de produção de polpas celulósicas compatível com as exigências de um padrão de qualidade ambiental mais alto. Dentre os citados, o parâmetro AOX (adsorbable organic halogen) constitui-se hoje a referência na qual tem se baseado todas as discussões, ou seja, o objetivo é produzir efluentes com o menor teor de substâncias cloradas, uma vez estas são consideradas o grande fator responsável pela toxicidade destas emissões (112). Embora este parâmetro seja de extrema importância, existem dados concretos, a partir de estudos de toxicidade de efluentes e seus componentes, que têm permitido a alguns especialistas questionarem tal critério (112). Assim, em complementação ao grande número de trabalhos sobre os efeitos tóxicos de organoclorados em efluentes de processos químicos de produção de polpas convencionais, diversos estudos mostram que certos componentes da madeira, clorados ou não clorados, podem apresentar toxicidade (120). Por exemplo, estudos com efluentes de processos mecânicos de polpação, que não envolvem a produção de substâncias cloradas, têm demonstrado efeitos de toxicidade na mesma proporção que os processos convencionais. Adicionalmente, resultados obtidos em estudos sobre a possível correlação entre AOX e toxicidade indicam que para níveis de AOX superiores a 2 kg/por tonelada de polpa, a correlação entre estes é mais evidente, fato este que não é observado para valores de AOX inferiores (112). Um outro aspecto importante é que o tipo de madeira utilizada define a quantidade e especialmente a natureza de AOX produzido. Portanto, avaliar ou tentar prever a toxicidade de efluentes de indústrias de papel e celulose simplesmente em função de AOX pode representar um grande equívoco (112). Neste sentido, parâmetros indicados por técnicas que utilizam biomarcadores, sensíveis a possíveis modificações metabólicas nos organismos existentes nas áreas ambientais abrangidas por tais indústrias, parecem ser mais adequados e oportunos (158).

Por outro lado, os efeitos biológicos dos novos tipos de efluentes criados, provenientes de processos ECF e TCF, não têm sido devidamente estudados, principalmente com a alegação de que, em função da possibilidade de se operar em sistema fechado, não haveria sentido para estes estudos. Portanto, pouco é conhecido a respeito do impacto ambiental destes efluentes (31,148). Dentro deste quadro, não existem dados relatados com relação a toxicidade aguda de efluentes ECF ou TCF. Já em relação a toxicidade crônica, os resultados disponíveis sugerem que efluentes TCF possuem toxicidade superior a ECF (112).

Com base nos dados e considerações realizadas acima, pode-se dizer que, em que pese o grande esforço que tem sido feito, a nível mundial, no sentido de otimizar as tecnologias existentes para a produção de polpas, visando eliminar ou minimizar a utilização de cloro e a conseqüente produção de compostos poluentes, ainda hoje, os efeitos de poluição decorrentes da produção de polpas celulósicas, embora atenuados, continuam sendo um problema a ser estudado e debatido, inclusive a nível de legislação.

Por outro lado, é oportuno dizer ainda que a despeito da tendência observada a nível mundial, a utilização de cloro, especialmente  $\text{Cl}_2$ , continua sendo preponderante no Brasil.

#### 1.2.3. 4. - Tratamentos convencionais de efluentes

Os métodos de tratamento de efluentes mais freqüentemente empregados são os de lodo ativado e lagoa de aeração, porém outras técnicas, tais como ultrafiltração, ozonização, irradiação, tratamento têm sido propostas e utilizadas (68,105).

Lagoa de aeração é sem dúvida o método mais utilizado. Este processo requer uma grande área, um tempo de retenção ou permanência em torno de 7 dias e um custo de implantação relativamente alto, especialmente em função da energia gasta pelos aeradores mecânicos (65).

Como um processo aeróbio, o seu principal objetivo é a redução de DBO, exibindo, neste aspecto, taxas de 55-80 %. Promove ainda a redução de TOCl (substâncias organocloradas totais) em 25%, sendo que, particularmente alguns organoclorados, como tri e dicloroacético e alguns clorofenóis são reduzidos em até 90 % (65,95,157,177). Além de que, estabiliza ou minimiza as variações das características dos efluentes, geradas especialmente em função do uso alternativo de diferentes tipos de madeira. As principais desvantagem deste sistema são: i) como as substâncias são eliminadas por volatilização, a eficiência do processo depende do clima do local, assim, em épocas ou regiões de baixas temperaturas, esta é reduzida consideravelmente; ii) a fração de substâncias de alta massa molecular e a cor do efluente são ineficientemente reduzidas; iii) a biomassa gerada neste processo, em sua grande maioria, bactérias gram-negativas, não é recirculada (65).

Um outro processo bastante utilizado é o tratamento com lodo ativado, o qual por ser um processo que requer menos espaço e produz resultados mais uniformes no tratamento, pode ser preferido, do que lagoas de aeração. O tempo de retenção bem menor, em torno de 8-24 h, também é uma das vantagens deste método (38,95,106).

Taxas de redução de BDO de 90 % e de substâncias cloradas (TOCl) em torno de 40 %, portanto mais altas do que as obtidas para lagoa de aeração, podem ser obtidas pelo tratamento com lodo ativado. Neste caso, argumenta-se que o principal fator responsável pela remoção de TOCl é a absorção destas substâncias pela elevada quantidade de biomassa produzida por este processo, que ao ser retirada do sistema, arrasta-as consigo. Por outro lado, este processo gera um volume muito alto de resíduos sólidos, os quais devem ser tratados adequadamente para evitar que os organoclorados adsorvidos não sejam novamente disseminados no ambiente. Esta é a grande desvantagem deste método. Em complementação, este processo também é ineficiente em remover a cor e as substâncias de alta massa molecular (47).

### 1.3. - Biodegradação dos componentes da madeira

Vários organismos, como bactérias e fungos, são capazes de atacar e degradar a madeira, em ecossistemas terrestres naturais, porém sem dúvida alguma, fungos superiores, especialmente os da classe Basidiomycetes, são os mais eficientes degradadores (18,47,74,80,93,135,171).

Os fungos basidiomicetos são geralmente classificados com base nas diferenças dos respectivos padrões de degradação da madeira que apresentam, levando-se em consideração características macroscópicas da degradação. Assim, podem ser divididos em fungos de degradação clara (white-rot), degradação parda (brown-rot) e degradação macia (soft-rot) (18,74,171).

Fungos de degradação clara preferencialmente colonizam madeiras da subdivisão *Angiospermae* (folhosas, madeira dura) e degradam os três componentes principais, celulose, hemicelulose e lignina, deixando a região da madeira degradada com uma coloração clara.

Fungos de degradação parda em geral colonizam madeiras da subdivisão *Gymnospermae* (coníferas, madeiras duras) e preferencialmente degradam os polissacarídeos celulose e hemicelulose, deixando não degradada parte da lignina inicialmente existente, a qual é então responsável pela coloração escura observada nas regiões da madeira degradadas pelo fungo.

Dentre os componentes da madeira, lignina é o que apresenta maior resistência a biodegradação. Neste contexto, a biodegradação de lignina é um dos mais importantes fatores determinantes da degradação de madeira e conseqüentemente do ciclo de carbono na biosfera.

Lignina, diferentemente de processos hidrolíticos, comuns aos demais biopolímeros de ocorrência natural na madeira, sofre degradação através de reações oxidativas, envolvendo diretamente  $O_2$  molecular ou peróxidos como  $H_2O_2$ , gerando assim compostos de baixa massa molecular, solúveis em meio aquoso. Tal característica se deve ao fato de que as ligações, entre as várias unidades recorrentes formadoras de lignina, não são hidrolizáveis (55,80,93).

Embora existam ainda muitas lacunas, bem como muitos dados discrepantes, os dados disponíveis atualmente evidenciam que a eficiência de degradação da madeira por estes fungos depende das suas capacidades de produzir enzimas celuloligninolíticas extracelulares, as quais são as responsáveis diretas pela disponibilização de nutrientes contidos na madeira, necessários para a manutenção e crescimento dos micélios (74,171).

### 1.3.1. - Enzimas ligninolíticas extracelulares produzidas por fungos

Dentre o vasto arsenal de enzimas extracelulares, tanto hidrolíticas quanto oxidativas, que os fungos degradadores de madeira exibem (Tabela 1), particularmente o grupo das fenoloxidasas é tido como o de maior importância ou determinante da capacidade degradativa destes organismos. (74,132,171). Fazem parte deste grupo enzimas como lignina peroxidase, Mn-peroxidase e lacase, as quais estão diretamente envolvidas na biodegradação de lignina.

#### 1.3.1.1. Lacase

Lacases (EC 1.10.3.2, benzenodiol:oxigênio oxidoreductase) constituem um grupo de enzimas encontradas principalmente em fungos e plantas superiores, onde são abundantes.

A maioria das diferentes lacases (diferentes fontes) conhecidas apresentam: i) massa molecular (MM) de 60-70 kDa, sendo conhecidas lacases com MM no intervalo de 60-100 kDa (164); ii) apresentam-se na forma de 2 ou 3 isoenzimas, em geral denominadas La (ou *lcc*) I, II e III. (22,119,138); iii) possuem estrutura de glicoproteína, com 15-20% de conteúdo relativo de carboidratos (164); iv) todas as lacases conhecidas contêm cobre, em geral 4 átomos de cobre por molécula, os quais apresentam um número de oxidação  $2^+$ . Tais átomos de cobre estão diferentemente coordenados, podendo assim ser distinguidos três tipos ou estado de coordenação denominados tipo I, II e III, sendo que este último é constituído por um par de átomos de cobre (113,138,164). Estudos da estrutura cristalina de lacases mostraram que existe uma proximidade entre os átomos de cobre tipo II e tipo III, formando uma estrutura trinuclear, coordenada por oito resíduos de histidina e envolvida na ligação do átomo de oxigênio (113). Os átomos do tipo I estão coordenados por um resíduo de cisteína e dois resíduos de histidina. A estrutura tipo I participa do processo de

Tabela 1. Visão geral das possíveis enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de degradação branca.

Enzima	EC-No	Reações catalisadas	Origem	Referência
Lignina Peroxidase	1.11.1.7	Oxidação do álcool benzílico	<i>P. chrysosporium</i> todos fungos white-rot(?) <i>Streptomyces sp.</i>	(130)
		Clivagem de ligações C-C Clivagem de ligações C-O Abertura de anel aromático Polimerização de fenóis		(245) (130) (130)
Mn(II) - peroxidase dependente	1.11.1.7	Oxidação de fenóis Clivagem de ligações C-C Clivagem de ligações C-O	<i>P. chrysosporium</i> alguns fungos white-rot	(130) (130)
Lacase	1.10.3.2	Similar a Mn(II) peroxidase dependente	<i>T. versicolor</i>	(238)
Dioxigenase	1.1.1.91	Clivagem de anel aromático	<i>P. chrysosporium</i>	(65)
Ari-álcool dehidrogenase		Redução de $\alpha$ -aldeídos em sintonia com LiP (?)	<i>P. chrysosporium</i> <i>P. radiata</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	(130) (245) (192)
NAD(P)H: quinona oxireductase	1.6.99.2	Redução de quinonas	<i>P. chrysosporium</i> todos fungos white-rot (?)	(50) (50)
Celobiose: quinona oxireductase		Redução de quinonas Degradação de celobiose	<i>P. chrysosporium</i>	(65)
Redutase de ácido aromático vanilato hidroxilase		Redução de ácidos aromáticos	<i>P. chrysosporium</i>	(245)
Ari-álcool oxidase	1.1.3.7	Descarboxilação oxidativa do ácido vanílico Oxidação de $\alpha$ -álcoois aromáticos Produção de $H_2O_2$	<i>P. chrysosporium</i> <i>P. sajor-caju</i> <i>B. adusta</i>	(38) (28) (245)
Glicose oxidase	1.1.3.4	Produção de $H_2O_2$	<i>P. chrysosporium</i>	(122)
Glioxal oxidase		Produção de $H_2O_2$	<i>P. chrysosporium</i>	(125)

captura de elétrons e transferência dos mesmos para a estrutura trinuclear (tipo II e III). O ciclo catalítico desta enzima envolve, portanto, sucessivas transferências de um elétron entre os átomos de cobre, podendo ser distinguidas duas etapas; uma anaeróbia (reduzora) e outra aeróbia (oxidante) (113,138).

Poucos estudos mostram com precisão a estrutura cristalina tridimensional e a topologia do sítio ativo de lacases, assim, grande parte das inferências feitas para o sítio ativo destas enzimas é baseada nos estudos realizados para a enzima ascorbato oxidase, com a qual lacases mostram uma grande similaridade (113,164).

Em suma, lacase é tipicamente uma oxidase que catalisa reações de oxidação, na ausência de  $H_2O_2$ , utilizando portanto oxigênio ( $O_2$ ) como oxidante, o qual é reduzido a  $H_2O$  num processo de oxidação envolvendo no total quatro elétrons (93,164). Não apresenta uma especificidade muito estrita quanto a estrutura do substrato, podendo catalisar a oxidação de uma grande variedade de estruturas aromáticas, especialmente estruturas fenólicas, como mono, di e polifenóis e metoxifenóis. Estudos mais recentes demonstraram que lacase também foi capaz de degradar estruturas não fenólicas, na presença de mediadores específicos (23,84). O mecanismo de oxidação do substrato é via retirada de um elétron com a formação inicial de fenoxiradical e cation radical, os quais, subsequentemente, podem reagir através de mecanismos não enzimáticos (Figura 12)(23,89,164,171). Neste caso, são frequentes as reações de acoplamento radical-radical, disproporcionamento, retirada de próton e ataque nucleofílico à  $H_2O$ , resultando em polimerização, clivagem de ligações tipo alquil-aryl,  $C_\alpha$ -oxidação e desmetoxilação das estruturas fenólicas (74,93).

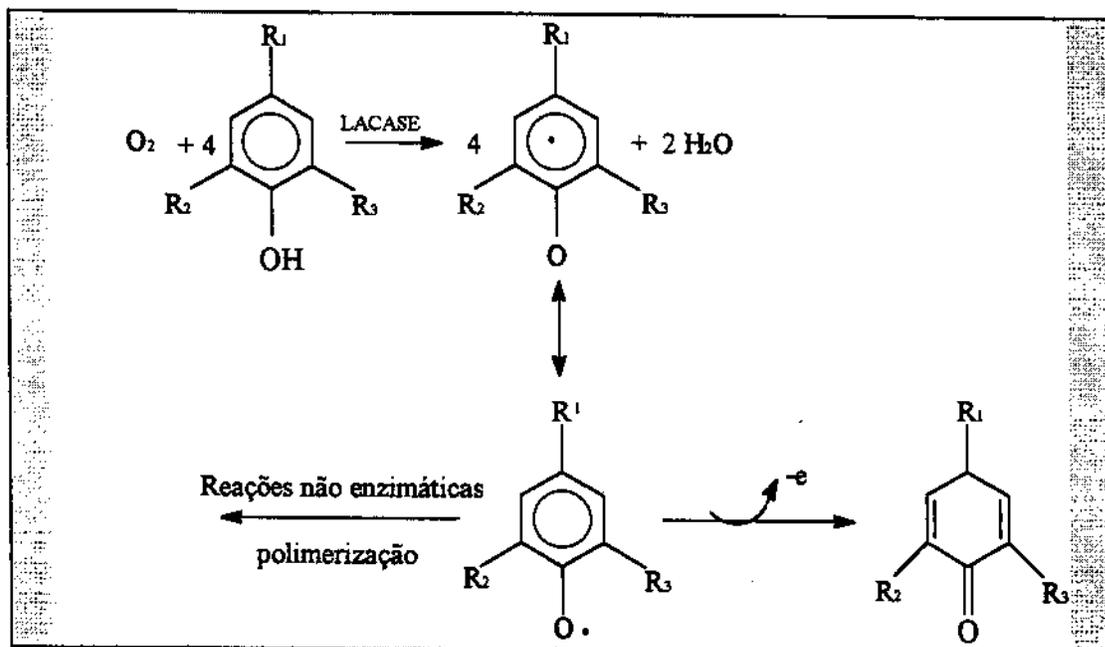


Figura 12. Mecanismo de reação catalisada por lacase, envolvendo a formação de fenoxiradicais.

Diversos estudos com substâncias modelos de subestruturas de lignina mostraram que lacases podem catalisar a clivagem de ligações tipo  $C_\alpha-C_\beta$  das cadeias laterais de estruturas diméricas tipo  $\beta-1$  e  $\beta-O-4$  (88), bem como catalisar a clivagem de anéis aromáticos de estruturas como 4,6-di(tert-butil)guaiacol (87). Estes resultados demonstraram que lacases poderiam degradar e despolimerizar lignina.

Estudos com várias isoenzimas de lacase de *T. versicolor* demonstraram que todas as formas foram capazes de degradar os diversos clorofenóis existentes em efluentes tipo E<sub>1</sub>, promovendo a descloração destes substratos (10,143). Neste caso, a reação com diferentes clorofenóis padrões demonstrou que a reatividade relativa destes substratos depende do número de cloro-substituintes, sendo que policlorofenóis foram mais reativos ou mais rapidamente metabolizados do que os respectivos derivados monoclorados (143,81). Em complementação, os mesmos estudos demonstraram que a degradação destes clorofenóis foi mais eficiente na presença de estruturas de alta massa molecular, obtidas a partir de efluente tipo E<sub>1</sub> (143). A formação de estruturas poliméricas também foi observada.

Outros autores relataram que lacase isolada de *T. versicolor* catalisou a degradação de tetracloroguaiacol, através da desmetilação inicial e subsequente formação de um cation radical intermediário, o qual por substituição nucleofílica perde Cl<sup>-</sup> reagindo com H<sub>2</sub>O. Portanto, pelo mecanismo proposto, este substrato sofre descloração, gerando quinonas intermediárias, sem envolver o acoplamento de fenoxiradicais intermediários e conseqüentemente sem polimerização (81).

A capacidade polimerizante de lacase tem sido utilizada para justificar outras possíveis funções para esta enzima, diferentes da degradação de lignina, na ação de fungos degradadores de madeira. Como exemplo, pode ser citada a função de desintoxicação do meio, pela retirada (via polimerização e precipitação) de intermediários do processo de degradação, que seriam potencialmente tóxicos para os fungos (10,143,164).

Embora bioquimicamente seja possível distinguir pelo menos dois tipos de atividade catalítica de lacases de fungos, o que poderia sugerir a existência de várias famílias de genes, somente uma família foi clonada para a maioria dos fungos estudados, como por exemplo para *Neurospora crassa*, *Cryphonectria parasitica*, *Aspergillus nidulan*, *Agaricus bisporus*, *Coriolus hirsutus*, *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor* e *Trametes villosa* (181). Dentre estes fungos, lacases de *T. versicolor* são as mais intensamente estudadas em função da eficiência de degradação de materiais ligninocelulósicos e do grande potencial de aplicação biotecnológica apresentado por este fungo.

A utilização de lacases em processos biotecnológicos, particularmente em processos de biobranqueamento de polpas, tem demonstrado resultados extremamente promissores (8).

### 1.3.1.2. Lignina peroxidase

Este grupo ou família de enzimas tem sido intensamente estudado e sua ocorrência, extração e caracterização tem sido relatada em um grande número de fungos tais como, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Phlebia tremellosa*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Junghuhnia seprabilima*, *Phlebia ochraceofulva* (74,80,93,132).

Lignina peroxidase constitui um grupo de glicoproteínas contendo um grupamento heme; Fe(III)-protoporfirina IX, como grupo prostético, por molécula. Requer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para sua atividade catalítica e apresenta massa molecular em torno de 38-43 KDa (93,97,171). Na grande maioria dos organismos é expressa na forma de múltiplas isoenzimas, tendo sido caracterizadas LiP contendo de 3 a 15 isoenzimas (74,93). A multiplicidade de formas parece depender do tipo de organismo, das condições do meio e idade da cultura, entre outros fatores (74,93). Em que pese o fato de que diversos estudos de composição de aminoácidos e sequenciamento dos mesmos

terem demonstrado que a homologia entre as diversas formas é muito alta, características cinéticas e de especificidade de substrato distintas tem sido observadas entre estas (21,93).

Embora inicialmente tenha sido caracterizada como uma oxidase (97), as suas características de típica peroxidase são bem conhecidas, onde à semelhança da enzima HRP (horse radish peroxidase), apresenta um ciclo catalítico envolvendo as formas de composto I e II, as quais exibem estados de oxidação diferentes, como descrito na Figura 13 (139).

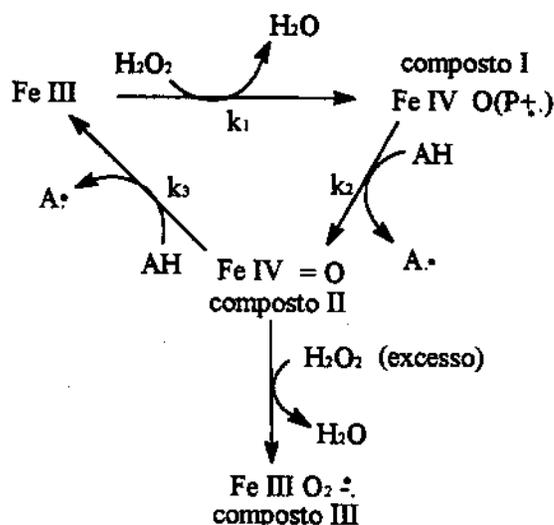


Figura 13. Ciclo catalítico de lignina peroxidase, envolvendo as diversas formas intermediárias do grupamento heme, de diferentes números de oxidação.

AH representa um substrato aromático, o qual age como um doador de elétrons para o grupamento heme, formando um cátion radical. A forma III de LiP, formada na presença de um excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , é cataliticamente inativa.

A estrutura eletrônica e o estado de coordenação do grupamento heme de LiP é muito similar a respectiva estrutura de HRP, sendo que ambos os grupamentos são  $\text{Fe(III)}$ -heme de alto-spin, pentacoordenados, onde o quinto ligante é uma histidina. Em complementação, as similaridades podem também ser estendidas para a sequência de aminoácidos em torno do heme (93).

Diversos estudos com substâncias modelo demonstraram que LiP é capaz de oxidar tanto estruturas fenólicas, quanto estruturas aromáticas não fenólicas, apresentando uma grande flexibilidade com relação a estrutura dos substratos (21,93). O mecanismo proposto para estas reações é via formação de cátion radical ou fenoxiradical, pela retirada de um elétron do respectivo substrato (70,89,93). Em função do seu alto potencial de oxido-redução, LiP é capaz de oxidar estruturas não fenólicas, metoxiladas, que as demais enzimas, como lacase e Mn-peroxidase, não são capazes de oxidar (89). A figura 14 ilustra as principais reações catalisadas por LiP, as quais podem ser resumidas como: reações de oxidação de álcoois benzílicos, clivagem de ligação carbono-carbono, hidroxilação, dimerização ou polimerização de fenóis e desmetilação. A natureza dos substituintes no anel aromático afeta drasticamente a reatividade dos substratos com relação a oxidação por lignina peroxidase. Substituintes que retiram elétrons tendem a desestimular estas reações e substituintes que cedem elétrons, como por exemplo grupamentos metoxilas, tendem a potencializa-las (21,93).

Assim a ordem de reatividade esperada para a oxidação das subestruturas de lignina é: siringil > guaiacil > *p*-hidroxifenil. A natureza dos substituintes também afeta as reações subseqüentes do cation radical intermediário, fato este que explica a grande susceptibilidade destas reações em gerar uma enorme variedade de produtos, cuja composição depende das condições do meio.

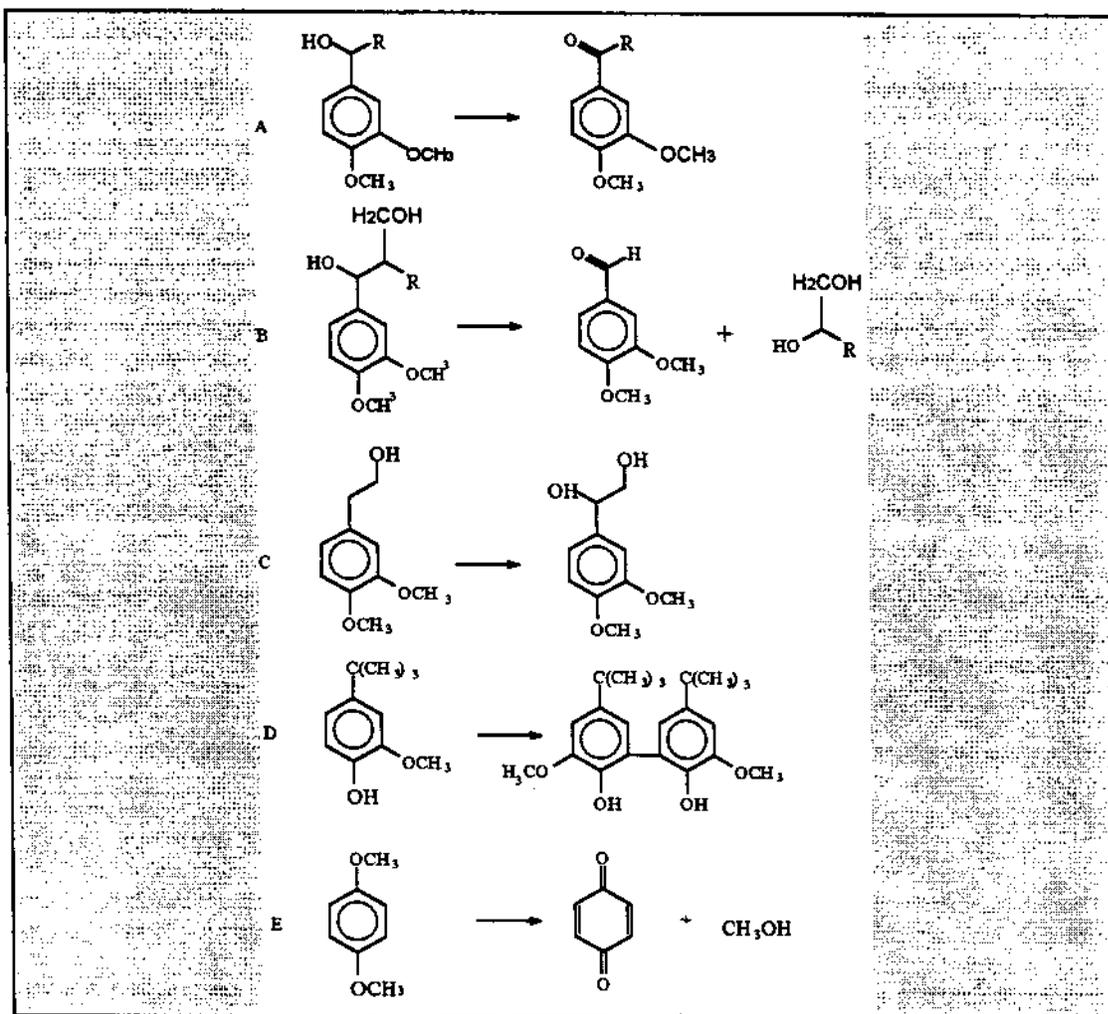


Figura 14. Principais tipos de reações catalisadas por lignina peroxidase, observados em estudos com substratos "modelos".

A participação desta enzima na biodegradação de madeira e particularmente na biodegradação de lignina é sugerida por diversos estudos *in vitro*, utilizando-se tanto ligninas isoladas como ligninas sintéticas, bem como uma grande variedade de substâncias de baixa massa molecular que representam subestruturas de lignina (21,24,80,134,217). Assim, tem sido demonstrado que LiP catalisa a clivagem de ligações tipo  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  em estruturas diméricas  $\beta-1$ , produzindo radicais intermediários, os quais reagem rapidamente com oxigênio para formar peroxirradicais (Figura 15)(93). Por outro lado, também foi demonstrado que LiP degrada estruturas tipo  $\beta-1$  na ausência de  $O_2$ , utilizando apenas  $H_2O_2$  como agente oxidante, num típico processo peroxidativo (93). Estruturas fenólicas contendo unidades siringil são oxidadas e degradadas e as contendo guaiacil são polimerizadas (166). Também estruturas diméricas não fenólicas do tipo  $\beta-O-4$  podem ser degradadas (Figura 17)(93), gerando produtos que indicam clivagem de ligação tipo  $\beta$ -arileter,  $C_{\alpha}$ -

oxidação, clivagem de anel aromático, clivagem das cadeias laterais, desmetoxilação e rearranjos intramoleculares. As reações e produtos descritos nas Figuras 15 e 16, foram observados tanto em reações catalisadas por LiP isolada, como também em culturas intactas de *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, sugerindo a importância desta enzima na degradação de lignina e demais substratos.

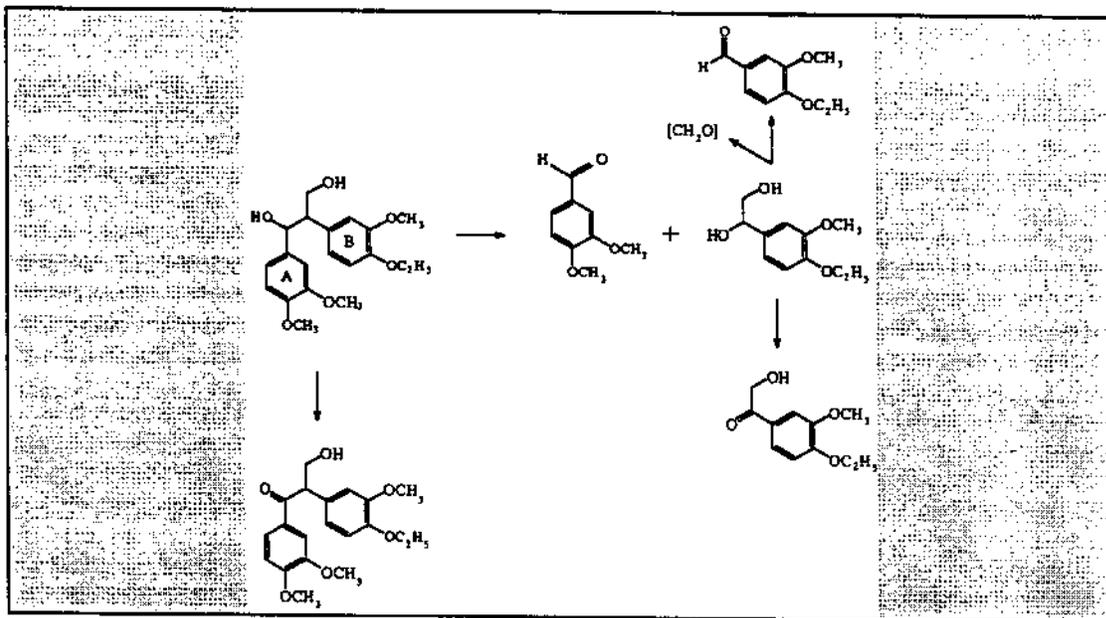


Figura 15. Representação esquemática da oxidação de um substrato com estrutura β-1, catalisada por LiP, resumindo os principais produtos gerados.

Por outro lado, também tem sido demonstrado que LiP catalisa reações de polimerização de substratos fenólicos, via acoplamento de fenoxi radicais intermediários. Com relação a este ponto, existe uma grande divergência de dados, os quais tanto indicam polimerização quanto despolimerização (147).

### 1.3.1.3. Manganês Peroxidase (MnP)

MnP (peroxidase-manganês dependente, EC.1.11.1.7.) é uma heme-enzima contendo um grupamento prostético tipo Fe(III)-protoporfirina IX, em que Fe III apresenta alto-spin e é pentacoordenado, tendo histidina como quinto ligante, portanto muito similar a LiP (21,63,93,97). A diferença é que, além de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esta peroxidase requer Mn<sup>2+</sup> como cofator e sua atividade é potencializada ou estabilizada por α-cetoácidos como lactato, malonato e outros (114,116,133). Também à semelhança de LiP, o seu ciclo catalítico envolve diversas formas intermediárias, composto I, II e III, com diferentes estados de oxidação (Figura 17)(174). Porém, neste caso, ocorre a oxidação de Mn II para Mn III, que atua como a espécie ativa nos processos de oxidação catalisados por MnP (93). Dada a alta reatividade de Mn III, a disponibilidade desta espécie para oxidar os substratos de MnP depende da presença de ácidos orgânicos que atuam como quelantes de Mn III, formando um complexo estável de alto potencial de oxido-redução (116,133). Como consequência, o potencial de oxido-redução do sistema oxidante é diferente do apresentado por LiP, determinando diferenças na especificidade, entre as duas enzimas, com relação as estruturas aromáticas dos substratos. Assim por exemplo, MnP oxida apenas estruturas fenólicas.

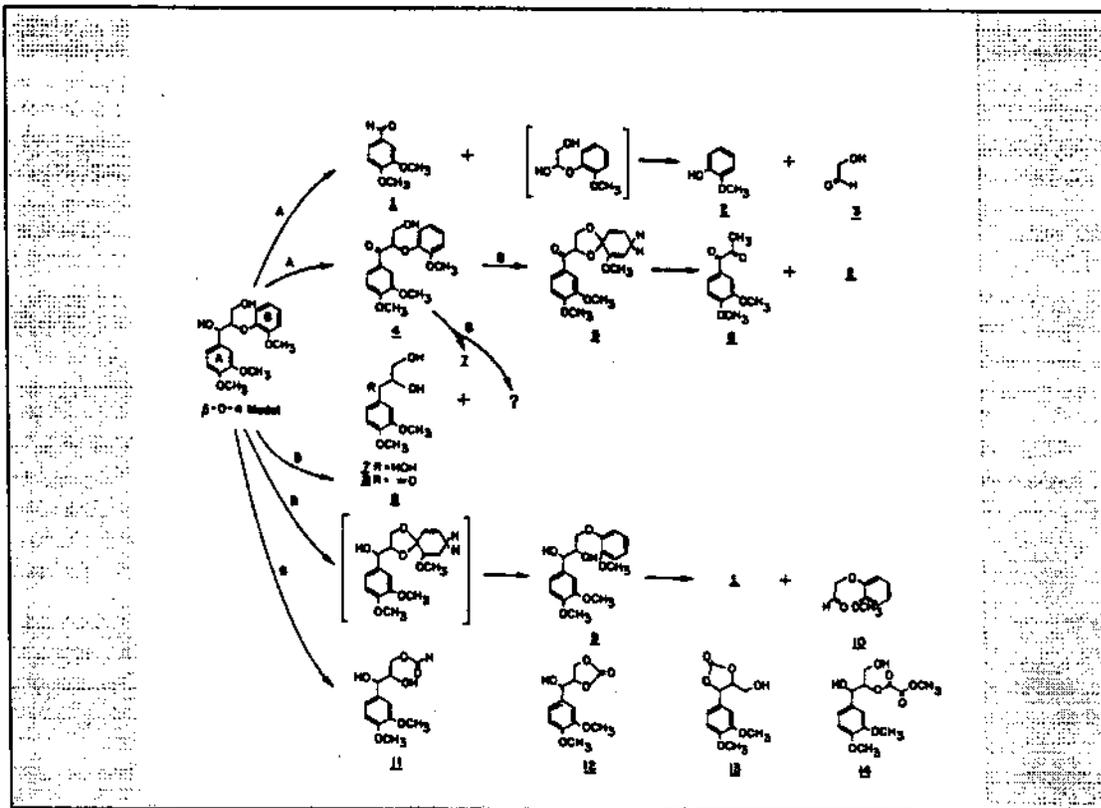


Figura 16. Representação esquemática da oxidação, catalisada por LiP, de um substrato "modelo" com uma típica estrutura β-O-4, resumindo as observações de diversos estudos.

Por outro lado, a inativação de MnP por  $H_2O_2$ , via formação do composto III, parece requerer concentrações mais altas de peróxido, indicando uma maior estabilidade desta enzima (174).

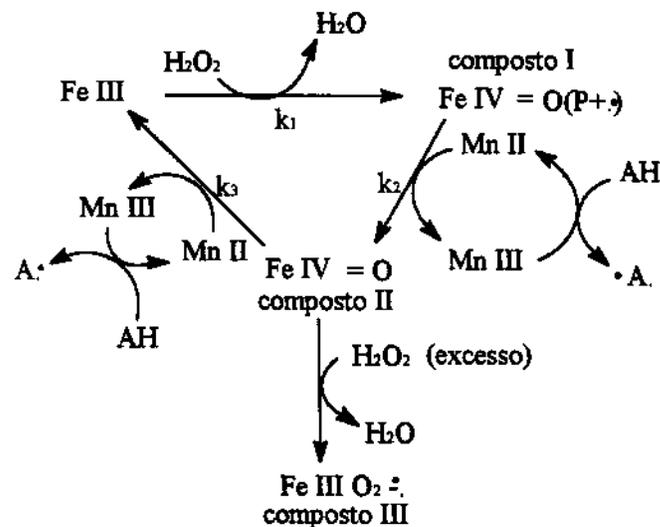


Figura 17. Ciclo catalítico de manganês peroxidase, envolvendo as diversas formas intermediárias do grupamento heme, de diferentes números de oxidação.

É uma glicoproteína de massa molecular em torno de 45-47 kDa.

MnP também é produzida na forma de diferentes isoenzimas, em geral de 4 a 6 formas isoenzimáticas, cujas características dependem do tipo de organismo em estudo (74,93,171).

Um papel de destaque na biodegradação de madeira e também na biodegradação de lignina por fungos basidiomicetos tem sido atribuído a MnP (74,171). A razão para isto é que a atuação proposta para MnP poderia elucidar uma das questões cruciais destes processos, qual seja; a produção de enzimas extracelulares por estes organismos, por si só não explica os efeitos degradativos observados, desde que enzimas são estruturas de alta massa molecular, cuja difusão ou acesso aos seus substratos, na madeira, deveria ser bastante restrita. Neste sentido, o papel atribuído a MnP ganha importância uma vez que este sistema enzimático gera espécies oxidantes pequenas, de fácil penetração na madeira, o que explicaria o ataque inicial a estes substratos. Por outro lado, o fato de que esta enzima oxida apenas estruturas fenólicas impõe uma limitação a sua capacidade de degradar integralmente ligninas de alta massa molecular (93,171).

#### 1.3.1.4. Importância relativa de cada enzima na biodegradação de lignina

Em que pese a enorme quantidade de trabalhos relativos a degradação de lignina, não existe um consenso sobre o papel e a importância de cada uma das enzimas neste processo.

Estudos com *P. chrysosporium* e *Phlebia brevispora* demonstraram que a taxa de mineralização de uma lignina sintética, tipo DHP (dehydrogenation polymer of coniferyl alcohol) marcada com  $^{14}\text{C}$ -anel aromático, medida pela liberação de  $^{14}\text{CO}_2$ , foi mais alta na presença de baixas concentrações de Mn(II) e apresentou correlação temporal com a produção de níveis elevados de LiP e não com MnP ou lacase (134). Resultados similares foram obtidos para os fungos *Phlebia radiata* e *Phlebia tremellosa* (74,116,172). Estudos posteriores com *P. chrysosporium* sugeriram que MnP poderia estar envolvida nas modificações químicas iniciais, que levariam a despolimerização de lignina e que uma degradação mais intensa deste substrato seria realizada por LiP (133). Em complementação, o mesmo tipo de estudo com lignina sintética (DHP) realizado com *Cerioporiopsis subvermispora*, o qual não produz LiP e apresenta uma baixa capacidade de mineralização de lignina, mostrou que o passo limitante deste processo degradativo não é catalisado por MnP ou lacase (144). Entretanto, resultados relatados por outros autores sugeriram que a falta de correlação entre MnP e as taxas de mineralização de ligninas sintéticas pode ser decorrente de variações de alguns parâmetros do meio como por exemplo pH (170).

Resultados bastante elucidativos foram obtidos quando o estudo de mineralização foi realizado para ligninas isoladas de vidoeiro (birch), marcadas com  $^{14}\text{C}$ , onde, paralelamente a produção de  $^{14}\text{CO}_2$ , também foi avaliada a produção de intermediários de mais baixa massa molecular (contendo  $^{14}\text{C}$ ), solúveis em água (24). Estes estudos demonstraram que a produção de tais intermediários e a produção de  $\text{CO}_2$  são dois processos distintos, sendo regulados separadamente, embora existam mecanismos que coordenam os dois processos. Desta maneira, é possível estabelecer condições que inibem a produção de  $\text{CO}_2$ , sem que a produção dos intermediários também o seja. Estudos realizados nestas condições (24), sugeriram que LiP pode estar envolvida na formação dos intermediários solúveis em água e que MnP pode ser mais importante na produção de  $\text{CO}_2$ , contrariamente ao proposto pelos estudos anteriores de Perez e Jeffries (134).

Os resultados citados acima demonstram claramente a dificuldade de acessar os detalhes dos mecanismos de degradação de lignina, bem como estabelecer uma relação inequívoca entre as reações observadas e o nível e natureza da atividade enzimática extracelular.

Assim, contrariamente as expectativas criadas inicialmente, onde supunha-se a degradação de lignina catalisada por uma certa enzima, especialmente LiP, a visão que se tem hoje é de um processo integrado, o qual depende da ação sinérgica de várias enzimas e envolve tanto reações de oxidação, quanto reações de redução (6,59,90,110,162). O processo global é oxidativo. A degradação completa de lignina por fungos, da sua despolimerização até a transformação em  $\text{CO}_2$  (mineralização), requer mecanismos complexos que parecem envolver uma compartimentalização entre os meios extracelular e intracelular (24,171). O ataque inicial à forma polimérica de lignina ou estruturas derivadas deve ocorrer no meio extracelular, promovido pela ação sincronizada de peroxidases ou lacases. A subsequente oxidação dos intermediários de baixa massa molecular deve ocorrer no meio intracelular, após absorção dos mesmos, como ilustrado pelas Figuras 18 e 19. Os possíveis produtos da degradação intracelular podem ser então liberados para o meio extracelular.

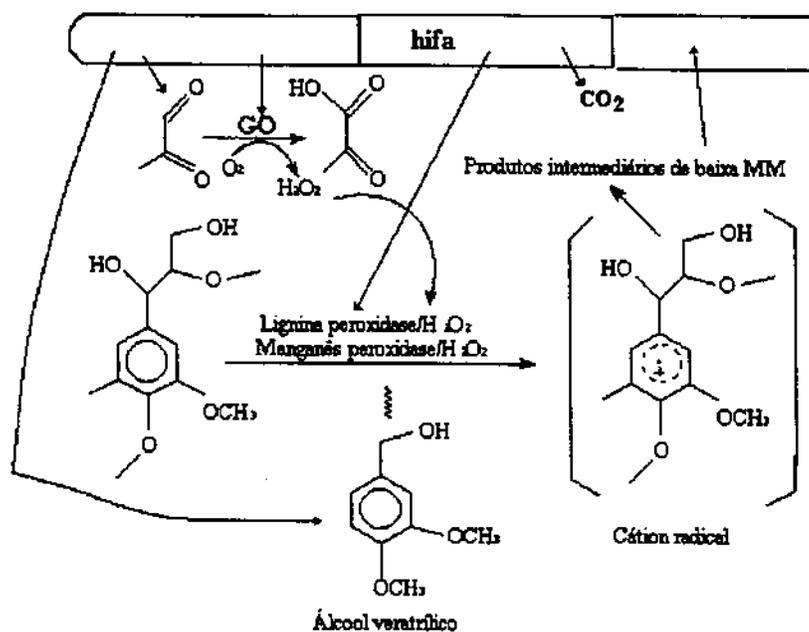


Figura 18. Representação esquemática da degradação de lignina por fungos, considerando-se a compartimentalização dos vários processos.

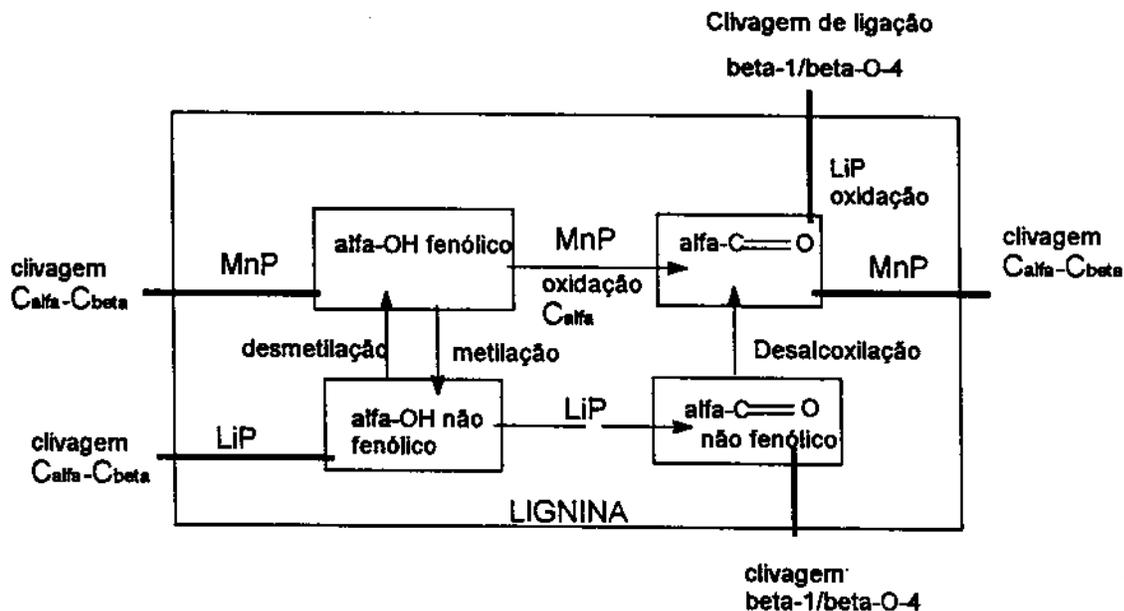


Figura 19. Representação esquemática da degradação de lignina, considerando-se a ação cooperativa entre as enzimas.

### 1.3.2. Mecanismos de degradação de lignina

No estudo dos mecanismos de biodegradação de lignina por fungos, diversas abordagens, utilizando técnicas diferentes, têm sido utilizadas. A figura 20 resume as estratégias mais frequentemente empregadas.

Um dos métodos mais empregados é a avaliação da taxa de liberação de  $^{14}\text{CO}_2$  durante a degradação de polímeros sintéticos (DHPs), contendo  $[^{14}\text{C}]$  e sintetizados a partir de precursores de lignina, como por exemplo álcool coniferílico (74,91,93). Uma metodologia alternativa envolve a biossíntese *in vivo* de ligninas marcadas com  $[^{14}\text{C}]$ , obtidas através da impregnação da madeira com as mesmas substâncias monoméricas, precursoras na biossíntese de lignina e subsequente estudo de degradação da madeira assim preparada ou das ligninas marcadas, após extração da madeira com solventes (156).

Com base neste parâmetro, taxa de liberação de  $\text{CO}_2$ , vários autores têm estudado as condições ou exigências nutricionais de diversos fungos, que determinam suas atividades enzimáticas ligninolíticas. A comparação dos resultados obtidos em estudos de "decaimento" ou biodegradação de madeiras *in natura* com os resultados obtidos em estudos de mineralização de polímeros sintéticos *in vitro*, particularmente para os fungos *P. chrysosporium* e *C. subvermispora*, têm demonstrado que os valores das taxas de degradação para ligninas sintéticas não podem ser diretamente extrapoladas ou estendidas às respectivas taxas de degradação na madeira (144). Neste sentido, estudos realizados por Srebotnik e colaboradores (156) demonstraram que as taxas de degradação de polímeros sintéticos obtidas quando se realiza estudos em solução aquosa são menores que as obtidas quando o mesmo estudo é realizado introduzindo-se ou na verdade impregnando-se tais polímeros na madeira.

Por outro lado, é evidente que este tipo de experimento; avaliação da taxa de liberação de  $\text{CO}_2$ , não proporciona uma visão detalhada dos mecanismos intermediários de degradação, particularmente com relação ao ataque inicial à estrutura da lignina. Com este objetivo, técnicas tais como IR,  $^{13}\text{C}$ -RNM e H-RNM têm se

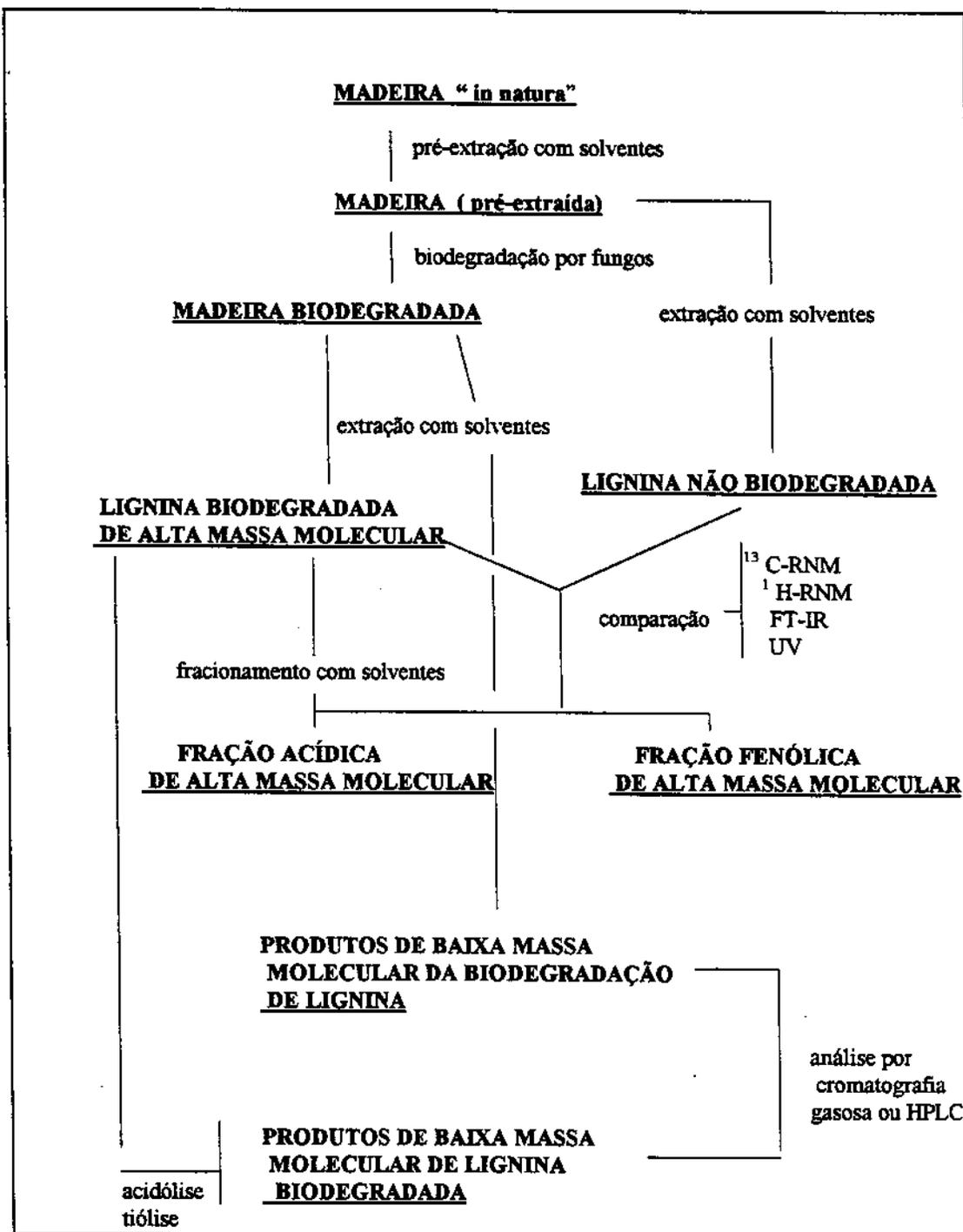


Figura 20. Estratégias para o estudo dos mecanismos de biodegradação de lignina *in situ* por fungos e outros microorganismos.

mostrado de grande importância, muito mais elucidativas e têm sido usadas no estudo de biodegradação de lignina em madeira e também de polímeros sintéticos.

Estudos de degradação de lignina em madeira, pelos fungos *Coriolus versicolor* e *Polyporus anceps*, utilizando UV e IR espectroscopia, em condições controlados de laboratório, (93) revelaram que as modificações químicas, provocadas pela ação do fungo, são limitadas apenas a uma certa fração da lignina total, permanecendo, portanto, uma outra fração inalterada. As modificações químicas na

estrutura da lignina, provocadas nessas condições e avaliadas por IR na região de 1500  $\text{cm}^{-1}$ , se caracterizam pelo surgimento de um maior conteúdo relativo de oxigênio, menor teor de grupamentos metoxila e de anéis aromáticos. O teor de grupamentos hidroxílicos, tanto fenólicos quanto alifáticos, diminui durante a biodegradação. A formação de grupamentos carboxílicos conjugados foi bem caracterizada tanto por UV quanto por RNM, sendo que, aproximadamente metade destes grupamentos carboxílicos são conjugados com anéis aromáticos e outra parte provavelmente é  $\alpha, \beta$  insaturados. Também a formação de grupos  $\alpha$ -carbonílicos foi observada.

O fato de que o conteúdo de metoxilas e grupamentos fenólicos diminuem e não se observa a formação de estruturas *orto*-difenólicas correspondentes a desmetoxilação, associado a diminuição do número de prótons aromáticos, indica que a biodegradação de lignina envolve a clivagem das subestruturas aromáticas da lignina, ainda na forma polimérica. (93).

Por outro lado, a clivagem das ligações tipo  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  entre as subunidades recorrentes formadoras da cadeia polimérica de lignina foi apontada como a reação mais importante do processo de biodegradação por fungos (93,171).

Chua e colaboradores (34) realizaram estudos de degradação de lignina em madeira pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, utilizando  $^{13}\text{C}$  RNM. Resultados semelhantes aos já relatados para outros fungos foram observados (93). Estes autores identificaram uma fração polimérica fenólica como sendo a fração de lignina menos modificada quimicamente pela ação do fungo, ao passo que a fração polimérica ácida foi intensamente atacada. Da mesma maneira a ruptura das ligações  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  foi caracterizada como a reação de clivagem mais importante. Tais estudos evidenciaram ainda que subestruturas como ácido vanílico e vanilil álcool ligados por ligação aril-eter, bem como aroxietanol, aroxiacético e grupamentos  $\alpha$ -carbonílicos ocorrem na forma polimérica de ligninas degradadas.

Estudos conduzidos por Haider e colaboradores (69), combinando a avaliação da liberação de  $^{14}\text{CO}_2$  com espectroscopia  $^{13}\text{C}$ -RNM, demonstraram que na degradação oxidativa de DHP-lignina por *Sporotrichum pulverulentum*, *Pleurotus ostreatus* e *Xanthomonas sp.* a forma polimérica é atacada e modificada quimicamente em condições onde a liberação de  $\text{CO}_2$  não é observada. Neste caso, os sinais obtidos nos espectogramas de  $^{13}\text{C}$ -RMN para as ligninas degradadas, durante o período em que a liberação de  $\text{CO}_2$  está suprimida, de uma maneira geral (para os diversos tipos de C), evidenciaram mais claramente as modificações químicas ocorridas, do que a fase onde a liberação é observada. Os resultados obtidos em tais estudos sugerem ainda que a etapa inicial da degradação de lignina não depende da disponibilidade de  $\text{O}_2$ . A introdução de grupamentos carboxílicos e hidroxílicos torna a forma polimérica mais solúvel.

Estudos posteriores realizados por Robert e colaboradores (140), utilizando análise quantitativa por  $^{13}\text{C}$ -RNM, reavaliaram os resultados obtidos por Chua e colaboradores (34) com relação a degradação de lignina na madeira pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Tais estudos também confirmaram que a degradação oxidativa das cadeias laterais de lignina, particularmente a clivagem das ligações  $C_{\alpha}-C_{\beta}$ , é a principal reação promovida pelo ataque do fungo e que a ruptura dos anéis aromáticos é uma reação secundária. Também a reação de desmetoxilação de anéis aromáticos foi caracterizada como pouco significativa. Neste caso, a análise das diferentes frações de lignina mostraram que a fração fenólica obtida após degradação pelo fungo, exibiu modificações químicas diferentes da fração ácida, obtida nas mesmas condições. Tais modificações químicas sugeriram que a degradação de lignina

pode não ser apenas resultado da ação enzimática, mas também envolver reações de auto-oxidação via radicais livres, gerados durante o processo enzimático (93)

Por outro lado, Chen e colaboradores (32) através da identificação de produtos de degradação parcial de lignina em madeira pela ação do fungo *Phanerochaete chrysosporium*, particularmente os ácidos carboxílicos produzidos, obtiveram evidências que lhes permitiram fazer diversas considerações: i) A presença de estruturas como por exemplo I e II na figura 21, como produtos de degradação parcial de lignina, indicam a ocorrência de clivagem de ligações tipo  $C\alpha-C\beta$  e de reações de desmetilação; ii) certas ligações  $C\alpha-C\beta$  quando presentes em estruturas contendo grupamentos  $\alpha$  ou  $\gamma$ -carbonílicos são menos susceptíveis a ruptura; iii) produtos como III, na figura 21, são resultantes da clivagem de anéis aromáticos, ainda na forma polimérica, posteriormente liberados pela clivagem de ligações tipo éter- $C_4$ ; iv) provavelmente a reação de clivagem de anéis aromáticos é precedida da formação de estruturas  $C_3$  e  $C_4$  difenólicas (tipo catecol).

Tais estudos evidenciaram ainda a presença de um número razoável de ácidos carboxílicos fenólicos entre os produtos de degradação de lignina. Considerando-se que estas substâncias são facilmente oxidadas pela ação de fenoloxidasas, produzidas pelos fungos, é de se esperar que um mecanismo de proteção de grupos fenólicos fosse operante neste caso. Estes resultados reafirmaram a disparidade observada entre a fácil degradação de estruturas fenólicas modelos em reações *in vitro* e a maior resistência à degradação das mesmas quando presentes em lignina *in natura*. Os autores argumentam que em adição a possibilidade de ter ocorrido um efeito de proteção, via metilação enzimática (hipótese considerada pouco provável) ou oxidação/redução em função da ação combinada de outras enzimas como celobiose-quinona redutase, uma possível explicação seria supor que os ácidos fenólicos seriam produzidos quando ainda ligados à estrutura polimérica de lignina através de ligação tipo éter ( $R-O-C_4$ )(32). Em complementação, estudos comparativos de degradação de lignina pelos fungos *Coriolus versicolor* e *Polyporus anceps*, (93) utilizando derivados de lignina, metilados com diazometano e lignina não modificada, sugeriram ainda que estas subestruturas, originalmente estavam ligadas como aril-glicerol  $\alpha$  ou  $\beta$ -éter.

A degradação oxidativa das cadeias laterais vicinais às subestruturas aromáticas da estrutura polimérica da lignina, especialmente a clivagem da ligação tipo  $C\alpha-C\beta$  entre as subunidades formadoras da forma polimérica, é assumida como uma das principais fontes de produção de ácidos aromáticos conjugados monoméricos (32,33). A produção de ácido vanílico como um dos principais compostos de degradação oxidativa de lignina poderia assim ser explicada.

Por outro lado, uma abordagem alternativa, ou na verdade complementar, no estudo da biodegradação de lignina e derivados é avaliar a degradação de substâncias químicas modelo ou padrão, estruturalmente relacionadas com lignina. Tais estudos podem ser realizados na presença de enzimas fúngicas isoladas ou do caldo bruto, obtido após incubação do fungo com um determinado meio de cultura. Neste aspecto, as principais reações estudadas foram descritas na seção 1.3.1.- Enzimas ligninolíticas produzidas pelos fungos.

#### 1.4. Fungos e suas aplicações biotecnológicas

Biotechnology, como ciência, tem emergido como uma área de grande potencial. O uso eficiente da maquinaria microbiana para produzir os mais variados tipos de metabólitos (enzimas, vitaminas, farmacos,..), tornou-se um campo de pesquisa inalienável. Os conhecimentos obtidos nestas pesquisas estão sendo utilizados



destes microrganismos visando a produção de metabólitos em larga escala e principalmente de enzimas de interesse industrial, tornar-se-á cada vez mais acessível.

#### 1.4.1. Biotecnologia-Indústria Papeleira-Meio Ambiente

Desde que a degradação de produtos lignocelulósicos é um dos maiores e mais importantes bioprocessos de ocorrência natural, a aplicação de métodos biotecnológicos à indústria de produção de polpas celulósicas e papel apresenta múltiplas possibilidades e portanto enorme potencial.

Atualmente as principais pesquisas visando a aplicação de biotecnologia a madeira e seus produtos derivados, concentram-se em três pontos centrais (21,44,47,93,111,168):

I) Propor métodos alternativos ou melhorar os processos atuais de produção de polpas celulósicas. O uso de técnicas microbiológicas para o pré-tratamento da madeira para a produção de polpas é chamado de biopolpação;

II) A utilização de enzimas fúngicas para o branqueamento de polpas celulósicas, biobranqueamento, é hoje um dos processos biotecnológicos mais promissores, particularmente utilizando-se lacases na presença de certos mediadores (8,29);

III) Tratamentos não convencionais de efluentes de indústrias de papel e celulose.

Como consequência das desvantagens apresentadas pelos métodos tradicionalmente utilizados hoje para o tratamento deste tipo de efluente, o estudo de métodos alternativos, principalmente os que envolvam técnicas biológicas, mostra-se bastante oportuno e atraente.

Neste contexto, a descoloração biológica de efluentes de indústrias de papel e celulose foi estudada inicialmente 1977(21), tendo sido relatadas taxas de descoloração de efluentes da fase de branqueamento de 90%, em 4 dias de tratamento, com o fungo *Tintoporia borbonica*. Sundman e colaboradores (160) usando *P. chrysosporium* demonstraram que em condições ótimas este fungo foi capaz de remover em torno de 80% da cor inicial do efluente em 48 hs. Livernoche e colaboradores (104) realizaram estudos semelhantes com o fungo *Coriolus versicolor*, o qual foi imobilizado em alginato de cálcio, sendo que 80% da cor foi removida em 3 dias, a pH 5,0. Estudos mais recentes também demonstraram que este fungo é capaz de descolorir efluentes de várias fases do processamento de polpas (10).

A partir destes trabalhos, inúmeros grupos de pesquisa tem se dedicado a estudos que permitam entender a fisiologia e bioquímica dos processos de degradação não só de efluentes, mas de poluentes ambientais de uma maneira geral (10,12,21,44,47).

Diversas enzimas, tais como lignina peroxidase, Mn-peroxidase e lacase, as quais já têm sido caracterizadas na degradação de lignina, parecem estar também envolvidas nestas transformações, embora não exista um consenso com relação a importância relativa de cada uma delas. Um dos pontos positivos, evidenciado por estes estudos, é o fato de que todas estas enzimas são extracelulares, o que aumenta o potencial de utilização biotecnológica das mesmas.

O fungo *P. chrysosporium* é capaz de degradar indistintamente tanto estruturas de alta massa molecular, quanto de estruturas de baixa massa molecular, especialmente os clorofenóis derivados de lignina. O processo de degradação requer O<sub>2</sub> e não necessita adição externa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou Mn<sup>2+</sup> (21,160) Utilizando-se culturas em

diferentes condições, como por exemplo com alta e baixa disponibilidade de N, alta e baixa concentração de Mn e particularmente utilizando-se uma linhagem mutante do fungo que não produz LiP, constatou-se que a capacidade de descoloração do efluente pelo fungo *P. chrysosporium* depende da atividade enzimática ligninolítica extracelular de MnP e não de LiP (115). Estudos mais recentes com o mesmo fungo, realizado por Jaspers e colaboradores (82), não só ratificaram os resultados anteriores, como também mostraram que o tipo de inóculo e a forma dos “pellets” afetam drasticamente a produção das enzimas e a capacidade de descoloração do efluente. Lackner e colaboradores também mostraram a importância de MnP na degradação de cloroligninas de alta massa molecular (99).

Um processo contínuo de tratamento de efluente da fase de branqueamento foi desenvolvido e patenteado, denominado MyCor (mycelial color removal), o qual utiliza o fungo *P. chrysosporium* (92). Este processo é baseado na construção de um biorreator que utiliza o fungo imobilizado em discos rotatórios e que é suplementado com glicose ou celulose como fonte de carbono e energia, necessários para o processo de biodegradação do efluente. Nestas condições, resultados significativos têm sido obtidos, como por exemplo a redução de até 80%/dia da coloração do efluente, redução de DQO e DBO e a redução substancial da quantidade total de compostos organoclorados (92). A principal limitação técnica, neste caso, foi a curta vida média do fungo, em torno de 7 dias.

Experimentos realizados combinando um pré-tratamento de “black liquor” com o fungo *P. chrysosporium* e um tratamento anaeróbio com bactérias, demonstraram que a degradação de estruturas de alta massa molecular, contidas neste tipo de efluente, foi intensificada em 79%, comparativamente ao tratamento anaeróbio isolado (54).

Estudos com fungo *T. versicolor* (10) demonstraram que também para este fungo o processo de descoloração requer  $O_2$  e não necessita adição de  $H_2O_2$ . A presença de espécies consideradas seqüestradoras (*scavengers*) de radicais como superóxido ânion radical e radical hidroxil, bem como de  $H_2O_2$ , não afetam o processo. Em condições ótimas de descoloração do efluente, o fungo não produziu MnP, produziu LiP e lacase, porém não foi observada uma correlação entre este processo e as atividades destas enzimas.

Estudos com o mesmo fungo *T. versicolor*, porém utilizando-se efluentes da polpação alcalina de palha de cereais, demonstraram que este tipo de efluente é capaz de induzir níveis mais elevados de lacase e MnP. Embora a remoção de fenóis neste caso, tenha apresentado correlação com o nível de lacase, o processo de descoloração parece não depender essencialmente desta enzima, segundo conclusão dos autores (108).

Estudos de descoloração com *Lentinus edodes* demonstraram que após 5 dias de incubação, o fungo promoveu uma redução de 60% de DQO e 73% da cor inicial, mostrando-se altamente eficiente no tratamento de efluentes tipo  $E_1$  (45,46)

Outros fungos, não pertencentes a classe dos basidiomicetos, também têm sido estudados, como por exemplo o coelomiceto *Stagonospora gigaspora*, o qual promoveu a redução de 90% da cor de um efluente de branqueamento tipo CEH, em 5 dias (16). Também o fungo ascomiceto *Chrysonilia sitophila* TFB-27441 demonstrou capacidade de descolorir um efluente tipo  $E_1$  (43,46).

Por outro lado, também tem sido demonstrado que tanto MnP como LiP isoladas e/ou imobilizadas são capazes de descolorir efluentes da fase de branqueamento de polpas ou seus componentes isoladamente (41,44,56,143).

Embora os estudos de biodegradação de produtos lignocelulósicos estejam bem adiantados e o número de informações disponíveis neste sentido seja bastante grande, alguns problemas permanecem sem solução e o nosso entendimento dos mecanismos que operam tais transformações apresentam muitas lacunas. Este quadro se deve a vários fatores, tanto de ordem prática, quanto de ordem metodológica. Por exemplo, não se tem integralmente caracterizado o perfil enzimático destes microrganismos e quais as reais condições ou fatores que determinam a sua capacidade de biodegradação. Portanto não se sabe com clareza, qual composição de enzimas é essencial para operar tal biodegradação e em que condições. Mais do que isto, pelos resultados obtidos para os vários fungos estudados isoladamente, parece que este quadro se altera de fungo para fungo, que, como já foi dito, pode ou não ser apenas uma questão metodológica.

Por outro lado, uma das limitações da utilização biotecnológica destes organismos é o fato de que nenhum dos fungos estudados, até o momento, degrada lignina e derivados sem uma fonte suplementar de energia, ou seja a todo produto lignocelulósico a ser tratado, devem ser acrescentados outros nutrientes, o que torna tais procedimentos não econômicos em larga escala.

Se os mecanismos pelos quais os fungos, ou na verdade suas enzimas degradam lignina e seus derivados forem bem entendidos, nós poderemos construir biorreatores que realizem a biopolpação, biobranqueamento de polpas ou o tratamento de efluentes com grande eficiência, o que poderá tornar estes processos viáveis em larga escala.

#### 1.4.2. Biodegradação de poluentes industriais

O sistema enzimático de fungos basidiomicetos apresenta uma grande versatilidade na degradação de xenobióticos, o que confere aos mesmos um enorme potencial na área de biorremediação. A grande vantagem destes sistemas enzimáticos é que em geral eles podem ser induzidos ou potencializados por condições ambientais em que existe limitação de nutrientes.

Os dados disponíveis na literatura mostram que dentre a enorme quantidade de fungos citados, particularmente dois podem ser destacados com relação a eficiência de degradação de xenobióticos e quantidade de informações relatadas, que são os fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*.

Diversos estudos mostraram que *P. chrysosporium* degrada diferentes tipos de PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons). Alguns autores demonstraram que este fungo foi capaz de degradar 22 tipos de PAHs, promovendo a remoção de 70-100% destes compostos em 27 dias (28). Outros estudos demonstraram que LiP de *P. chrysosporium* oxidou benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, antraceno, pireno e perileno, através de mecanismos parecidos com os observados na degradação de lignina e derivados (14,137). *P. chrysosporium* também degradou uma mistura de naftaleno, fenantreno, antraceno, *p*-cresol, pentaclorofenol (PCB) e fenol (137).

Também foi demonstrado que fungos como *T. versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Chrysosporium lignorum* foram capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos (117,137).

A degradação de clorofenóis por fungos como *P. chrysosporium* e *Trametes versicolor* tem sido exaustivamente citada neste texto.

Estes resultados são extremamente interessantes desde que tais tipos de substâncias, nitroaromáticos, são largamente empregados na produção de pesticidas, explosivos e outros produtos farmacêuticos, podendo se constituir em grandes poluentes de solos. Os resultados de estudos com *Phanerochaete chrysosporium*

demonstraram que 2,4-dinitrotolueno foi degradado por este fungo via clivagem de anel aromático e que ambas as enzimas MnP e LiP poderiam estar envolvidas nesta reação (12).

PCBs (polychlorinated biphenyl) são intensamente utilizados em atividades industriais sob os mais diversos nomes como Aroclor, Clophen e outros. Tem sido demonstrado que *Phanerochaete chrysosporium* eficientemente degrada este tipo de poluente (179). A degradação de substâncias como atrazina, aldrin, dieldrin, heptachlor, lindano e mirex, utilizando-se *Phanerochaete chrysosporium* também tem sido relatada (137).

## 2.1. OBJETIVOS GERAIS

2.1.1. Assimilar técnicas de laboratório na área de Biotecnologia, em especial, a manipulação de culturas fúngicas.

2.2.2. Consolidar a linha de pesquisa “Tratamento Biológico de Efluentes”, na área de Biotecnologia, na Universidade Federal de Santa Catarina.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Selecionar fungos degradadores de madeira, com potencial para utilização biotecnológica.

2.2.2. Identificar os principais componentes do efluente da fase de branqueamento, primeira extração alcalina (E<sub>1</sub>), de polpas tipo Kraft, utilizando HPLC de fase reversa e de exclusão.

2.2.3. Estudar a biodescoloração do efluente em questão, utilizando fungos selecionados, particularmente; *Trametes villosa*, *Panus crinitus*, *Phellinus flavomarginatus* e *Ganoderma sp-70*.

2.2.4. Identificar os possíveis mecanismos de biodegradação de efluentes pelos fungos selecionados, utilizando técnicas espectroscópicas como UV, IR.

2.2.5. Caracterizar o perfil do sistema enzimático extracelular ligninolítico dos fungos citados no item 2.2.3.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Efluente

Os efluentes testados são de indústrias de papel e celulose do estado de Santa Catarina. Após a coleta, estes foram imediatamente congelados e estocados até o uso. Representam a fração da primeira extração alcalina ( $E_1$ ) de uma sequência de branqueamento OCED, de polpas de eucalipto, não tratados pela indústria.

#### 3.2. Culturas

As culturas de fungos foram obtidas da micoteca mantida no Laboratório de Micologia do Departamento de Botânica da UFSC, gentilmente cedidas pela Profra Dra Clarice L. Leite. Foram mantidas em meio sólido de extrato de malte ou caldo de batata /ágar (12g extrato de malte ou 120 g de batata cozida, 18 g de ágar/1000 ml de  $H_2O$ ). Foram utilizados: *Trametes villosa* K-10, *Panus crinitus* M-10, *Phellinus flavomarginatus* K-10 e *Ganoderma* sp-70.

#### 3.3. Experimentos de descoloração do efluente

Os experimentos foram realizados com 125 ml de efluente diluído (absorbância inicial de 0,80 medida a 465 nm e pH = 7,6), pH inicial 9,5, acondicionados em frascos de 250 ml. e sem a adição de qualquer nutriente. Os experimentos foram realizados utilizando-se o método de culturas submersas, sob agitação constante (150 rpm) e a temperatura de 29° C. As culturas de fungo foram crescidas antes da incubação com o efluente, tendo sido utilizados em torno de 400 mg de micélio de culturas de 7-10 dias (ou com as idades indicadas).

A medida da cor do efluente foi avaliada corrigindo-se o pH das amostras para 7,6 e fazendo-se a leitura de absorbância a 465 nm, segundo normas descritas pelo método padrão APHA(8).

#### 3.4. Determinação de atividades enzimáticas

As amostras de efluentes foram incubadas com os fungos como descrito no item anterior. Foram retiradas alíquotas de 3 ml de cada amostra em estudo para a avaliação de atividade enzimática, sendo que as mesmas foram previamente centrifugadas a 10000 rpm por 7 min.

Avaliação do efeito indutivo do próprio efluente sobre a produção de enzimas ligninolíticas pelos fungos, em meio líquido (120 ml), foi realizada utilizando-se meio contendo diferentes proporções de efluente mais extrato de malte e glicose (1,44 g e 1,2 g para 120 ml, respectivamente), nas seguintes concentrações : 0, 5, 15, 45 e 60% de efluente. Foram inoculadas culturas previamente crescidas em extrato de malte/ágar, em placas de Petri, com idade de 7-10 dias.

##### 3.4.1. Fenoloxidasas (Lacases e Peroxidasas )

**Método de Ander e Eriksson modificado (5)** - O método baseia-se na oxidação de siringaldazina para sua forma de quinona, que apresenta absorção a 525 nm ( $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Para determinação de atividade de lacase utiliza-se:

0,5 ml de caldo de cultura filtrado

0,44 ml de tampão tartarato a pH= 4,2

25  $\mu\text{l}$  de siringaldazina. Eleva-se o volume para 1,5 ml de volume final.

Para determinação de peroxidase utiliza-se:

0,5 ml de caldo de cultura filtrado

0,44 ml de tampão tartarato a pH = 4,2

0,5 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$

Sol. de siringaldazina - 5 mg / 10 ml de etanol

Sol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  - 4,5 mM

### 3.4.2. Lignina peroxidase (LiP)

**Método de Tien-Kirk modificado (165)** - A atividade de lignina peroxidase é determinada pela oxidação de álcool veratrílico a aldeído veratrílico, acompanhada a 310 nm ( $\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Utiliza-se o seguinte procedimento:

550  $\mu\text{l}$  de caldo de cultura filtrado

200  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$

250  $\mu\text{l}$  de sol. Álcool veratrílico

Uma unidade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima necessária para oxidar 1,0  $\mu\text{M}$  de substrato / min.

Sol.  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,0 mM

Sol. Álcool veratrílico 8,0 mM em tampão tartarato 0,4 M a pH= 3,0

### 3.4.3. Manganês-Peroxidase (MnP)

**Método de Kuwahara e colaboradores modificado (97)** - A atividade enzimática é medida pela oxidação de vermelho de fenol acompanhada a 610 nm ( $\epsilon = 4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Utiliza-se o seguinte procedimento:

0,5 ml de caldo de cultura filtrado

0,1 ml sol. Vermelho de fenol 0,1 %

0,1 ml de lactato de sódio 250 mM

0,2 ml albumina bovina 0,5 %

50  $\mu\text{l}$  de sulfato de manganês 2 mM

50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM

1,0 ml tampão succinato de sódio 20 mM a pH = 4,5

Incubar a mistura de reação por 5 min. a 30° C, interromper a reação pela adição de 40  $\mu\text{l}$  de NaOH 2 M.

Uma unidade de manganês-peroxidase é definida como a quantidade de enzima que oxida 1,0  $\mu$  M de vermelho de fenol / litro min.

- Sol. vermelho de fenol 0,1 % - 0,1 g / 100 ml
- Sol. lactato de sódio 250 mM -
- Sol. albumina bovina 0,5 % - 0,5 g / 100 ml
- Sol. sulfato de manganês 2 mM-
- Sol. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM

#### 3.4.4. $\beta$ - Glicosidase

**Método de Tan e colaboradores modificado (163)** - O método é baseado na hidrólise de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo, com a conseqüente liberação de *p*-nitrofenil acompanhada a 410 nm ( $\epsilon = 18,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). O seguinte procedimento foi utilizado :

- 0,1 ml de caldo de cultura filtrado
- 0,4 ml de sol. de *p*NPG 0,2 % em tampão acetato 50 mM a pH = 4,8
- Incubar a 50 ° C por 30 min.. Após este período interromper a reação pela adição de 1,0 ml de sol. de bicarbonato de sódio 10 % ( p/v).

Uma unidade de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1,0  $\mu$  M de *p*NPG / min. ml .

### 3.5. Medidas Analíticas

#### 3.5.1. Determinação de fenóis totais

**3.5.1.1. Método de Folin-fenol modificado (7).** O método baseia-se na reação do reagente de Folin, contendo ácido fosfomolibdico e fosfotungstico com estruturas fenólicas formando um complexo de cor azul, que absorve na região de 750-780 nm.

- 2,5 ml de amostra \*
- 50  $\mu$ l de reagente de Folin
- 500  $\mu$ l carbonato de sódio 15%
- Incubar a 37° C por 30 min. Ler absorbância a 760 nm.

\* Para determinação de fenóis em efluentes coletar 0,5 ml de amostra, centrifugar, diluir para 2,5 ml. Fazer o "branco" com 2,5 ml de água.

**3.5.1.2. Método de 4-aminoantipirina (4-AAP)(180)** - O método baseia-se na reação de 4-AAP com estruturas fenólicas oxidadas com ferricianeto de potássio, acompanhada a 505 nm.

- 1 ml de amostra
- 0,1 ml de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5%, em tampão glicina, pH= 9,7 - 0,1 M
- 1 ml de 4-AAP 0,25%, em tampão glicina, pH= 9,7 - 0,1 M
- Esperar um minuto e fazer a leitura a 505 nm.

### 3.5.2. Determinação de proteínas totais

**Método de Bradford (25)** O método baseia-se na reação com Comassie Blue acompanhada a 540 nm. Utilizou-se o seguinte procedimento:

0,5 ml de amostra centrifugada

4,5 ml de reagente de Bradford

Esperar 10 min. e ler ABS a 540 nm.

A curva de calibração foi elaborada utilizando-se albumina bovina como padrão.

### 3.6. Análise cromatográfica

#### 3.6.1. Análise de composição dos efluentes

Os efluentes foram analisados por HPLC, utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu, equipado com um detetor SPD-10A-UV-VIS e com uma coluna de fase reversa tipo  $\mu$ -Bondapak-C<sub>18</sub> da Waters. O eluente utilizado foi acetonitrila/água (60:40) com um fluxo de 1,0 ml/min. e as eluições foram monitoradas a 280 nm. A amostra para análise foi inicialmente centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. e o sobrenadante obtido filtrado através de membrana de 0,45  $\mu$  de poro.

As concentrações absolutas dos componentes do efluente não foram calculadas.

Todos os valores de concentração referem-se aos valores de suas respectivas áreas, medidas diretamente nos cromatogramas, sem fator de correção. As concentrações relacionadas na Figura 71 representam valores normalizados para os seus respectivos valores de área (de cada substância) na amostra de efluente não tratado, a qual foi arbitrariamente considerada como sendo igual a 1,0.

#### 3.6.2. Análise da distribuição de massas moleculares

As análises de distribuição de massas moleculares foi realizada por HPLC de exclusão semi-preparativa, utilizando-se o mesmo equipamento citado no item anterior. A coluna utilizada foi uma Assaypack-Waters e o eluente H<sub>2</sub>O/0,05 M NaOH, com um fluxo de 1,0 ml/min. As amostras de efluente a serem analisadas foram centrifugadas previamente a 12000 rpm por 7 min.

Os valores de conteúdo relativo relacionados nas Tabelas 3 e 4 foram calculados com base na relação de áreas entre cada fração e a área total (somatória das áreas de todas as frações) medida em cada cromatogramas.

#### 3.6.3. Análise CG-MS

Aliquotas de 20 ml de amostras de efluente, não tratado e após tratamento, foram extraídas com três porções de 20 ml de acetato de etila, com o auxílio de um funil de separação. Os extratos obtidos foram concentrados para um volume de 3 ml utilizando-se um evaporador rotativo e a amostra assim obtida foi analisada por CG-MS. Utilizou-se um cromatógrafo modelo GCMS-QP2000 A da Shimadzu, equipado com uma coluna capilar CBP5-M25 de 25 m da Shimadzu. As condições de análises empregadas foram; 3 minutos

a 90° C, elevou-se a temperatura para 250 ° C a uma razão de 10 °C/min. , permanecendo nesta temperatura por 15 min. Os espectros de massa foram obtidos utilizando-se 70 eV (178). A identificação das substâncias detectadas foram feitas com base nas características descritas na literatura (105,136,143,149,172,177-183,195,231) e pela injeção de padrões.

### **3.7. Análises espectrofotométricas**

#### **3.7.1. Análise por UV.**

As análises espectrofotométricas foram realizadas utilizando-se um equipamento HP- e cubetas de 3 ml e/ou 400 µl. Os espectros diferenciais foram obtidos pela subtração do espectro de amostras de efluente a pH 4,0, utilizada como referência, do respectivo espectro da amostra a pH 11. As correções de pH foram realizadas utilizando-se soluções 0,1 M de HCl ou NaOH.

As reações com borohidreto de sódio foram realizadas utilizando-se 3 ml de amostra, 80 mg de agente redutor a pH 10,5 e 45° C , por 50 minutos (57).

#### **3.7.2. Análise por FT-IR**

Para obtenção dos espectros FTIR, amostras (5 ml) de efluente tratado e sem tratamento foram centrifugadas, 12000 rpm por 7 min., e filtradas. As amostras foram então congeladas, liofilizadas e a partir deste material foram preparadas pastilhas de KBr. Os espectros foram medidos utilizando-se um espectrômetro Bomem Michelson, com resoluções de 4 cm<sup>-1</sup> , 5 repetições e suas linhas base foram corrigidas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Otimização das condições para biodegradação do efluente pelos fungos

Dos 22 fungos testados quanto a capacidade de descoloração do efluente da primeira extração alcalina da fase de branqueamento de polpas ( $E_1$ ), 2 em particular apresentaram ótimos resultados, que são os fungos *Trametes villosa* e *Panus crinitus*. Um outro fungo, *Ganoderma sp-70*, o qual apresentou moderada capacidade de descoloração, também foi selecionado para estudos posteriores. Um quarto fungo, *Phellinus flavomarginatus*, também foi selecionado, apenas para fins de um estudo mecanístico comparativo, uma vez que este não foi capaz de descolorir o efluente. O estudo sistemático de parâmetros tais como mecanismos de biodegradação, sistema enzimático ligninolítico, fatores condicionantes da eficiência de biodegradação, etc, foram efetivamente realizados para os fungos *Trametes villosa* e *Panus crinitus*. Os demais fungos foram utilizados em alguns experimentos específicos, como já foi dito, apenas para fins de estudo comparativo.

#### 4.1.1. Biodegradação do efluente pelo fungo *Trametes villosa*

O fungo *Trametes villosa* promoveu a descoloração de 70-80% da intensidade inicial da cor do efluente, no período 35-50 hs de incubação com o mesmo (Figura 22.). Diferentemente de outros fungos estudados, não se observou um período longo de adaptação do fungo ao efluente, uma vez que o processo de descoloração ocorreu já nas primeiras horas de incubação. Concomitantemente ao processo de descoloração, a concentração total de fenóis (derivados de lignina e demais subprodutos), medida por dois métodos químicos independentes, método de Folin e método 4-aminoantipirina (4-AAP), decresceu ao longo do período de incubação. A curva de desaparecimento de fenóis, medida pelo método de 4-AAP, apresentou uma correlação mais estreita com a curva de descoloração do que a obtida pelo método de Folin, além de que a taxa de desaparecimento de fenóis, evidenciada pelo primeiro método, é bem maior do que a obtida para este último. Tal diferença se deve provavelmente às diferenças na seletividade química de cada um dos métodos, além de possíveis interferências, particularmente no método de Folin. Os resultados obtidos pelo método Folin indicaram que o processo de descoloração foi mais rápido do que o consumo de fenóis totais (Figura 21). Tal resultado, a princípio, parece indicar que modificações químicas nas subestruturas dos componentes do efluente, particularmente nas de maior massa molecular, podem contribuir para o processo de descoloração, concomitantemente, ou antes mesmo que estas sofram um processo de mineralização total (transformação a  $CO_2$ ).

A natureza do meio de cultura, extrato de malte ou ágar-batata, usado para crescer o fungo antes de incubá-lo com o efluente, não afetou drasticamente a capacidade do fungo em descolorir o efluente, como se pode ver pelas taxas de descoloração para ambos os meios, descritas na Tabela 2. Da mesma maneira, o tempo de pré-cultivo do fungo, para culturas produzidas sob condições em que a disponibilidade de nutrientes era limitada, não afetou a eficiência de descoloração, para culturas de até vinte dias. Após este tempo, observou-se um decréscimo na habilidade de descoloração, sendo que, culturas de 60 dias foram inativas. Por outro lado, um resultado bastante interessante foi o de que, após a primeira incubação com o efluente, as culturas do fungo ainda puderam ser reutilizadas, sem que a capacidade de descoloração tivesse sido drasticamente modificada. Tal resultado é bastante

estimulante, desde que aponta para a possibilidade de utilização biotecnológica das culturas fúngicas.

**Tabela 2.** Efeito da natureza do meio<sup>a</sup> e da idade<sup>b</sup> da cultura sobre a taxa de descoloração do efluente pelo fungo *T. villosa* e variação de pH ao longo do processo.

Parâmetro	Tempo de incubação (h)				
	0	24	48	72	96
pH	9,5	6,12	4,4	3,2	3,0
		taxa de descoloração (%)			
extrato de malte/ágar <i>a</i>	0	11	73	80	84
batata/ágar <i>a</i>	0	12	75	78	83
15 dias- extrato de malte <i>b</i>	0	9	71	78	82
40 dias-idem <i>b</i>	0	6	45	52	55
60 dias-idem <i>b</i>	0	1	2	2	5

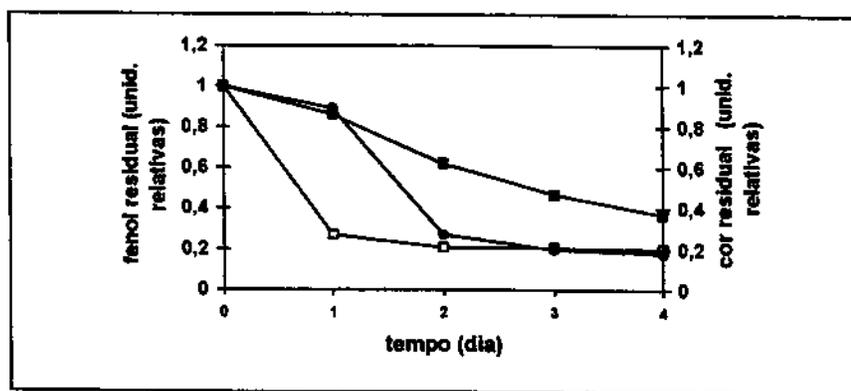
*a* meio de cultura usado para crescer o fungo antes da incubação com o efluente

*b* idade da cultura antes da incubação

A observação mais surpreendente, que emerge dos dados da Tabela 2, é a de que o maior percentual de redução de cor do efluente ocorreu no intervalo de pH de 7,0 para 5,0. As implicações deste fato serão ainda discutidas neste texto.

A agitação das culturas incubadas com o efluente foi essencial para o processo de descoloração, indicando a natureza oxidativa do mesmo. Este é um resultado esperado, desde que o envolvimento de O<sub>2</sub> no processo de biodegradação de lignina e derivados, como é o caso dos componentes do efluente, é fato bem conhecido.

O pH inicial do efluente não foi um fator limitante da ação do fungo, pelo menos para valores menores que 9,5, para efluentes não tamponados. As taxas de descoloração obtidas tanto a pH 9,5 quanto para 5,0, embora tenham sido diferentes, ambas foram taxas altas. Assim os experimentos de descoloração foram realizados com efluentes sem correção de pH, ou seja a pH inicial 9,0 (Figura 23.). Em contrapartida, experimentos realizados com efluentes tamponados demonstraram que valores mais baixos de pH inicial possibilitaram uma maior eficiência de descoloração (Figura 24). A capacidade do fungo de descolorir efluentes, não tamponados, de pH inicial elevado, provavelmente, veio do fato de que o fungo foi capaz de promover a acidificação do meio, durante o período de incubação, sendo que, neste caso, o pH do efluente em tratamento variou de 9,5 para 3,2, em um período de 0-72 hs, como



**Figura 22.** Descoloração e biodegradação de fenóis durante o período de incubação do efluente Kraft da fase de branqueamento-E<sub>1</sub> com o fungo *T. villosa*, sob agitação constante e pH inicial de 9,5. Cor monitorada a 465 nm, pH= 7, 6 e concentração de fenóis pelos métodos de Folin e 4-AAP. -■- método de Folin, -□- método de 4-AAP, -●- descoloração.

descrito pela Tabela 2. Adicionalmente, os resultados obtidos nos experimentos realizados com efluentes tamponados parecem indicar que a natureza do tampão afeta o processo de biodegradação, uma vez que a taxa de descoloração do efluente tamponado com tartarato foi maior do que o respectivo valor usando-se acetato (Figura 24). Há que se levar em consideração, que neste caso, é possível que o fungo tenha metabolizado o acetato.

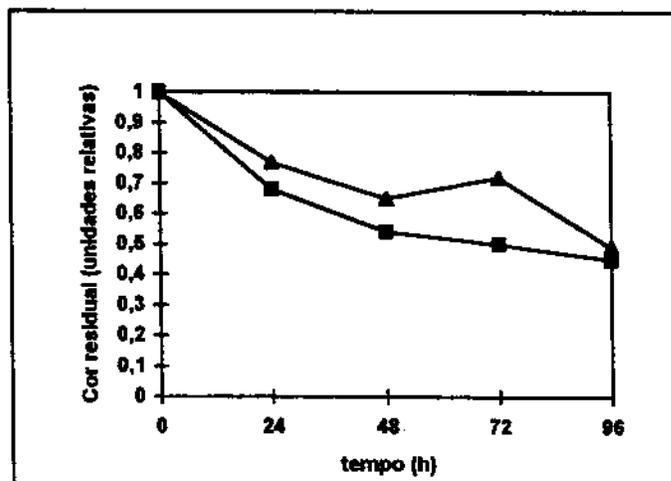


Figura 23. Efeito do pH inicial da amostra na taxa de descoloração relativa de efluentes não tamponados, durante o processo de biodegradação pelo fungo *T. villosa*, a 25° C e sob agitação constante, 150 rpm. Os valores de cor residual foram normalizados em relação aos respectivos valores das amostras no efluente antes do tratamento, o qual foi definido como sendo igual a 1,0.  
 ■- pH inicial 9,5 -▲- pH inicial 5,0

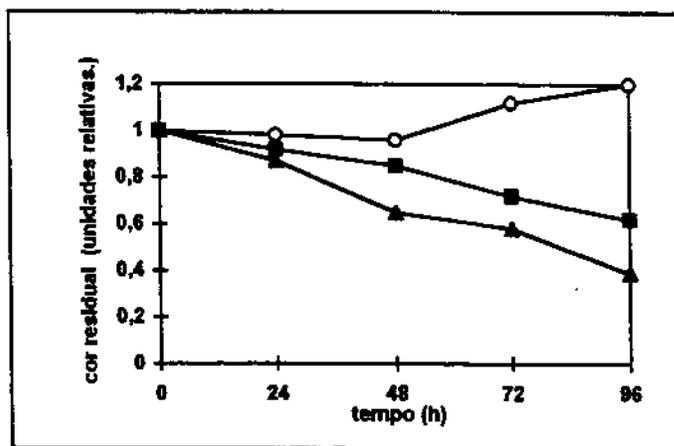


Figura 24. Efeito do pH inicial da amostra na taxa de descoloração relativa de efluentes tamponados, durante o processo de biodegradação pelo fungo *T. villosa*, a 25° C e sob agitação constante, 150 rpm. Os valores de cor residual foram normalizados em relação aos respectivos valores das amostras no efluente antes do tratamento, o qual foi definido como sendo igual a 1,0.  
 -▲- tampão tartarato pH= 5,0 ; -○- tampão glicina pH= 9,5 e -■- tampão acetato, pH= 5,0 .

Com o objetivo de se avaliar o desaparecimento e/ou a formação de grupamentos ionizáveis nas estruturas contidas no efluente, foram realizadas titulações tanto potenciométrica quanto condutométrica. A curva de titulação potenciométrica obtida para o efluente sem tratamento (Figura 25), evidenciou a presença de duas

espécies de grupamentos ionizáveis. Uma espécie com valor de pK em torno de 6,5-7,5 e outra com o respectivo valor a 2-3. O tratamento do efluente com o fungo *T. villosa*, promoveu a destruição das espécies iônicas de valor de pK mais elevado e o aumento das espécies com valor de pK mais baixo.

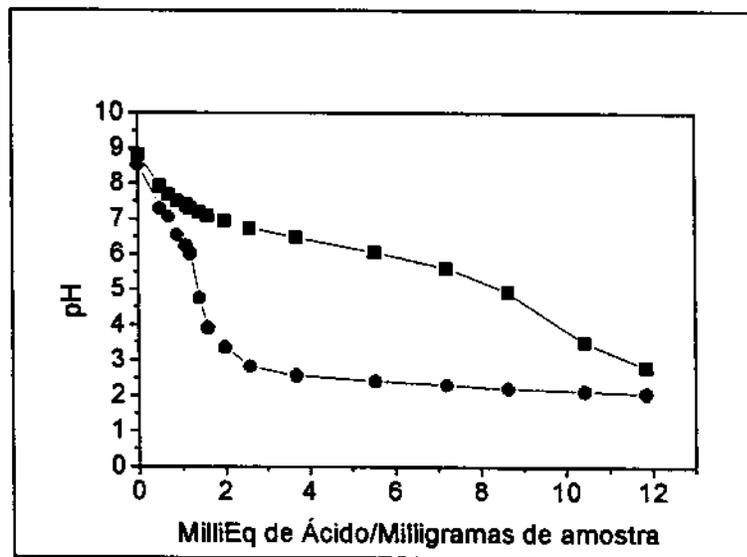


Figura 25 . Curvas de titulação potenciométrica de amostras de efluente não tratado e tratado com o fungo *T. villosa*, obtidas pela titulação de soluções alcalinas do efluente, usando 0.01N de HCl como titulante. - ■ - efluente não tratado , - ● - efluente com 144 hs de tratamento.

#### 4.1.2. Biodegradação do efluente pelo fungo *Panus crinitus*

O efluente tratado com o fungo *Panus crinitus* apresentou uma taxa de descoloração de 60-70% no período de 45-55 hs. Também neste caso ocorreu a redução acentuada da concentração total de fenóis, medida por ambos os métodos já citados (Figura 26). Porém, os perfis das curvas de consumo de fenóis com o tempo de incubação, neste caso foram diferentes dos apresentados pelo fungo *Trametes villosa* (Fig. 22). A formação de fenóis intermediários, provavelmente de baixa massa molecular e provenientes da degradação parcial de estruturas poliméricas derivadas de lignina, foi claramente evidenciada pelo aumento do percentual de fenóis residuais no tempo de 48 hs, o qual foi também acompanhado por ligeiro aumento da cor do efluente. Os perfis das curvas de consumo de fenóis, obtidas pelos dois métodos, Folin e 4-AAP, foram semelhantes, embora a mesma discrepância entre os valores apresentados pelos dois métodos, já observadas para *T. villosa*, também tenha sido observada neste caso. Estes resultados sugerem um mecanismo de degradação do efluente diferente do mecanismo apresentado pelo fungo *Trametes villosa*. A variação de pH promovida pelo fungo *Panus crinitus* foi mais lenta e menos acentuada do que a observada para o fungo *Trametes villosa*.

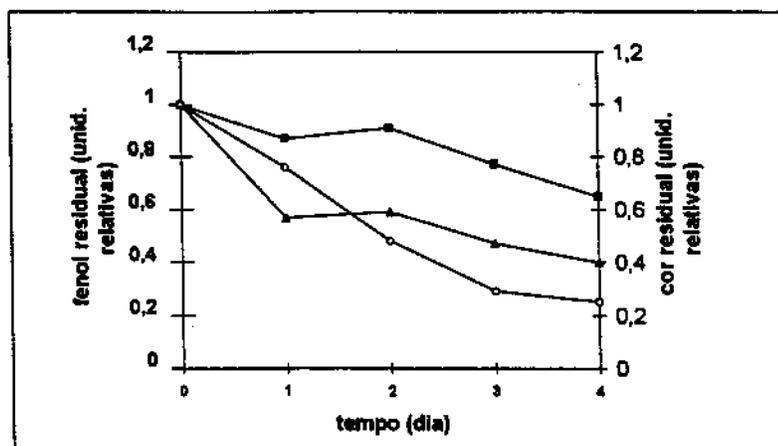


Figura 26. Descoloração e biodegradação de fenóis durante o período de incubação do efluente Kraft (da fase de branqueamento- $E_1$ ) com o fungo *P. crinitus*, a 25° C, sob agitação constante, 150 rpm, e pH inicial de 9,5. Cor monitorada a 465 nm, pH=7,6 e concentração de fenóis pelos métodos de Folin e 4-AAP. - ■ - método de Folin, - ▲ - método de 4-AAP, - ○ - descoloração

#### 4.2. Atividade enzimática durante o processo de biodegradação

Foram avaliados os fungos, *T. villosa*, *P. crinitus* e *Phellinus flavomarginatus*.

Como já descrito anteriormente, os fungos foram previamente crescidos antes da sua incubação com os efluentes, e uma vez incubados, procedeu-se, periodicamente, às medidas de atividade enzimática em pequenas alíquotas, retiradas do meio de incubação. Assim sendo, foram avaliadas as atividades enzimáticas extracelulares.

O fungo *T. villosa* produziu quantidades apreciáveis das enzimas lacase, peroxidase totais, lignina peroxidase e de  $\beta$ -glicosidase, superior a todos os demais fungos testados (Figuras 27-32). Não foi detectada atividade de Mn-peroxidase. A atividade das enzimas avaliadas aumentou durante o período de incubação, atingindo um máximo em torno de 30 hs de incubação e diminuindo gradativamente após este período.

Como mencionado anteriormente, é possível reutilizar culturas de *T. villosa*, após uma primeira incubação, sem que as mesmas percam substancialmente suas capacidades de descolorir o efluente. Experimentos realizados nestas condições, demonstraram que culturas que já haviam sido incubadas durante 5 dias com efluente, após serem levadas e novamente incubadas com efluente novo, rerepresentaram, após um período de 24 hs, níveis elevados de atividade de lacase, bem próximos dos valores da primeira incubação.

Já o fungo *P. crinitus* produziu quantidades ligeiramente inferiores das citadas enzimas, nas primeiras 48 hs de incubação, demonstrando um processo de liberação das enzimas mais lento (Figuras 27-32). Os níveis máximos de atividade enzimática, particularmente os de lacase e lignina peroxidase, foram observados no intervalo de 48 a 72 hs. de incubação do efluente com o fungo. Em seguida, observou-se um ligeiro decaimento e subsequente aumento da atividade enzimática, mantida por um tempo mais prolongado, diferentemente do observado para o fungo *T. villosa*. Da mesma maneira não foi detectada atividade de Mn-peroxidase.

Curiosamente para o fungo *Phellinus sp* não foi detectada nenhuma atividade enzimática relativa a lacase e somente quantidades desprezíveis de atividade para  $\beta$ -glicosidase. Por outro lado, este fungo produziu quantidades moderadas de peroxidases e altas quantidades de Mn-peroxidase, mantidas durante todo período de

incubação (20 dias). Como já mencionado anteriormente, o fungo *T. villosa* é capaz de promover a descoloração do efluente Kraft ( $E_1$ ) em 80 % da cor inicial em 48 hs.

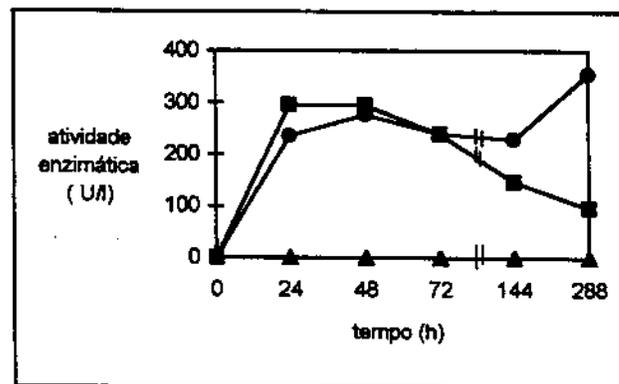


Figura 27. Atividade enzimática extracelular de Lacase durante o processo de biodegradação do efluente pelos fungos basidiomicetos, *T. villosa*, *P. crinitus* e *Phellinus flavomarginatus*, a 25° C, sob agitação constante e pH inicial de 9,5 - ■- *T. villosa*, - ▲- *P. flavomarginatus*, - ●- *P. crinitus*

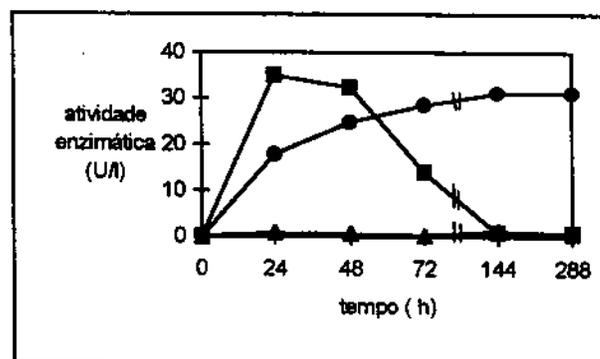


Figura 28. Atividade enzimática extracelular de beta-glicosidase durante o processo do biodegradação de efluente pelos fungos basidiomicetos, *T. villosa*, *P. crinitus* e *Phellinus flavomarginatus*, a 25° C, sob agitação constante e pH inicial de 9,5. - ■- *T. villosa*, - ▲- *P. flavomarginatus*, - ●- *P. crinitus*

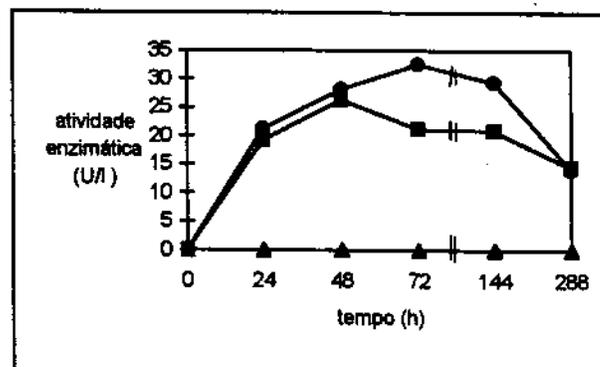


Figura 29. Atividade enzimática extracelular de lignina peroxidase durante o processo do biodegradação de efluente pelos fungos basidiomicetos, *T. villosa*, *P. crinitus* e *Phellinus flavomarginatus*, a 25° C, sob agitação constante e pH inicial de 9,5. - ■- *T. villosa*, - ▲- *P. flavomarginatus*, - ●- *P. crinitus*

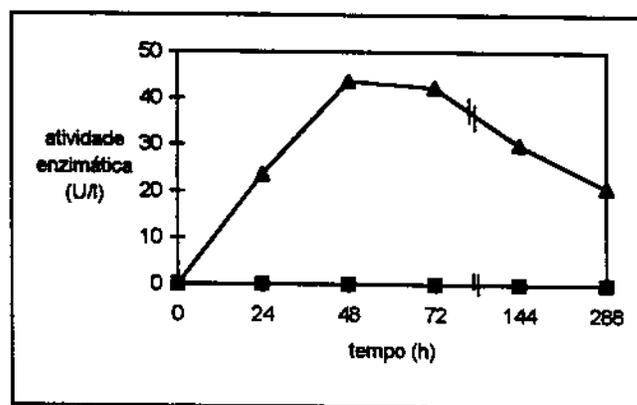


Figura 30. Atividade enzimática extracelular de Mn-peroxidase durante o processo do biodegradação de efluente pelos fungos basidiomicetos, *T. villosa*, *P. crinitus* e *Phellinus flavomarginatus*, a 25° C, sob agitação constante e pH inicial de 9,5  
 - ■- *T. villosa* , - ▲- *P. flavomarginatus* , - ●- *P. crinitus*

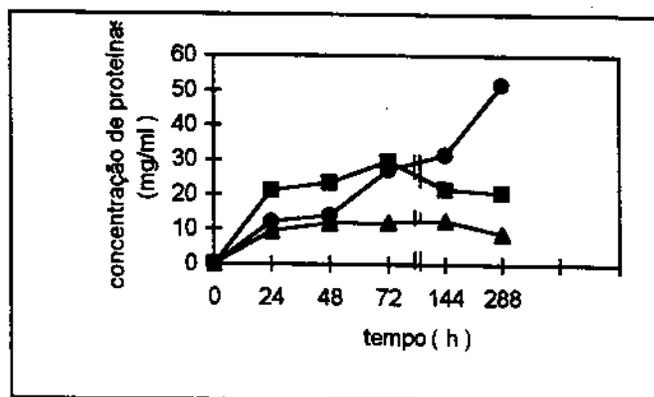


Figura 31 . Produção de proteínas extracelulares durante o processo de biodegradação do efluente pelos fungos basidiomicetos, a 25° C, sob agitação constante e pH inicial de 9,5.  
 - ■- *T. villosa* , - ▲- *P. flavomarginatus* , - ●- *P. crinitus*

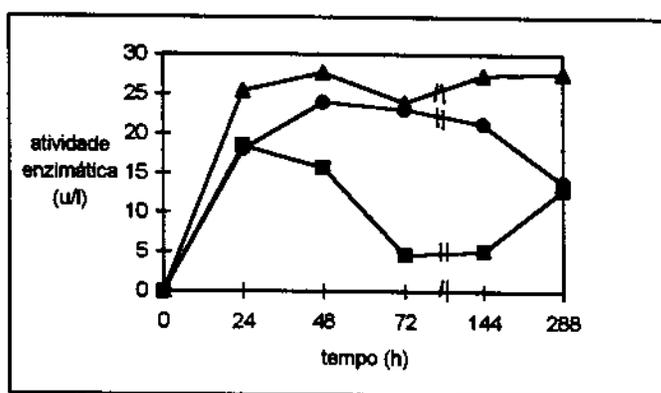


Figura 32. Atividade enzimática extracelular de peroxidases totais durante o processo de biodegradação do efluente pelos fungos basidiomicetos, *T. villosa*, *P. crinitus* e *Phellinus flavomarginatus*, a 25° C, sob agitação constante e pH inicial de 9,5.  
 - ■- *T. villosa* , - ▲- *P. flavomarginatus* , - ●- *P. crinitus*

O fungo *P. crinitus* reduz 65 % da cor inicial em 72 hs. Por outro lado o fungo *Phellinus sp* não descolore apreciavelmente o efluente. Estes resultados parecem sugerir que a enzima Mn-peroxidase não é importante ou determinante da capacidade de descoloração e biodegradação do efluente, contrariamente aos resultados já relatados para outros fungos (167).

### 4. 3. Efeito indutivo na atividade enzimática

Os estudos foram realizados em meio líquido básico (extrato de malte + glicose), contendo concentrações diferentes de efluente tipo E<sub>1</sub>, 0% , 5%, 15% e 45%, a temperatura de 29° C e pH 5,0. Os fungos foram inoculados neste meio e o nível de atividade enzimática foi periodicamente avaliado. Tais experimentos permitiram verificar o possível efeito indutivo sobre a produção das enzimas, decorrente da presença de efluente no meio de crescimento. As atividades enzimáticas foram medidas no caldo de cultura, ou seja foram avaliadas as atividades de enzimas extracelulares. Também foi avaliada a produção de proteínas totais extracelulares.

As Figuras 33-41 demonstram os efeitos de diferentes concentrações de efluente no meio de cultura sobre as atividades enzimáticas para os fungos *T. villosa*, *P. crinitus*, *Ganoderma sp-70*, escolhidos para este estudo. A escolha do fungo *Ganoderma sp-70* foi em função da similaridade no perfil de enzimas extracelulares produzidas que este fungo apresentou, relativamente aos outros dois fungos.

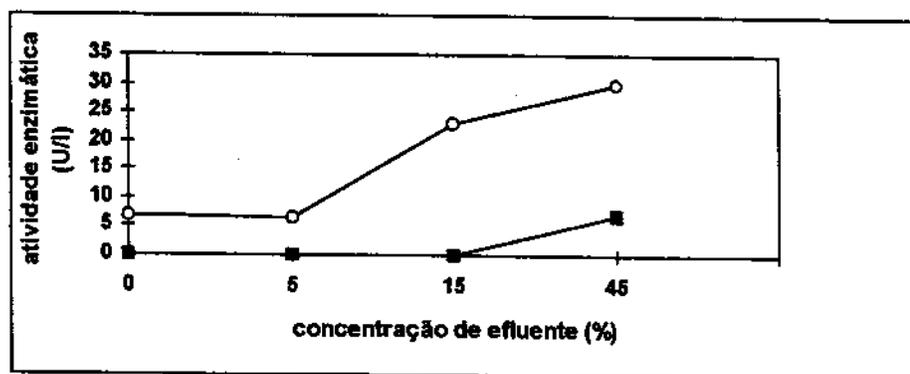


Figura 33. Efeito de concentrações crescentes de efluente no meio líquido de cultura (extrato de malte), sobre o nível de atividade enzimática de lacase extracelular para o fungo *T. villosa*, mantido a 29° C, sob agitação constante. -○- 7 dias de incubação ; -■- 14 dias de incubação

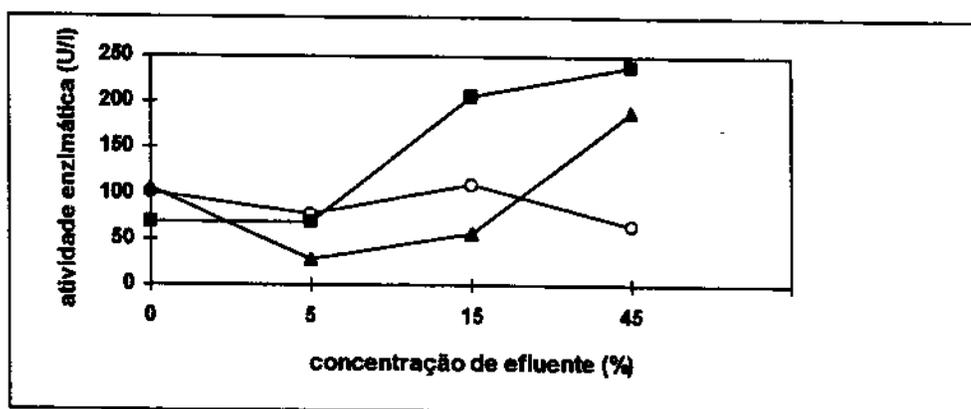


Figura 34. Efeito de concentrações crescentes de efluente no meio líquido de cultura (extrato de malte), sobre o nível de atividade enzimática extracelular de lacase para o fungo *Ganoderma sp-70*, mantido a 29° C, sob agitação constante, avaliado a diferentes intervalos de tempo. -○- 7 dias de incubação ; -■- 14 dias de incubação ; -▲- 21 dias de incubação

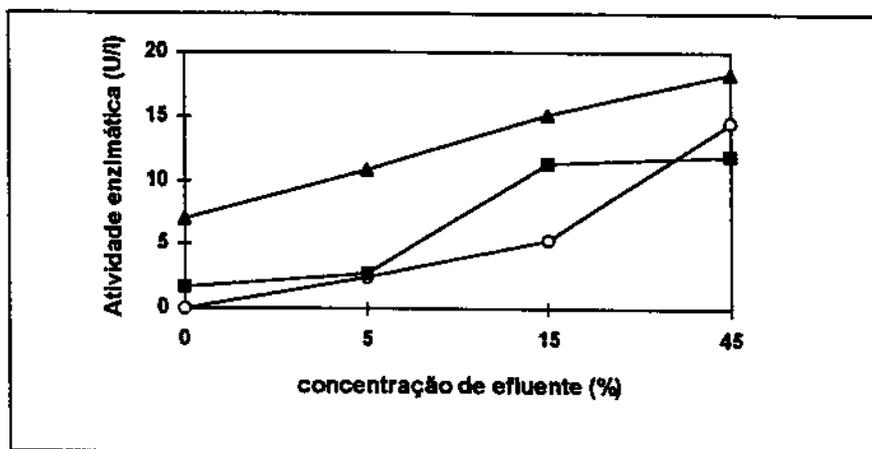


Figura 35. Efeito de concentrações crescentes de efluente no meio líquido de cultura (extrato de malte), sobre o nível de atividade enzimática extracelular de beta-glicosidase para o fungo *Ganoderma sp-70*, mantido a 29° C, sob agitação constante, avaliado em diferentes intervalos de tempo. -○- 7 dias de incubação ; -■- 14 dias de incubação ; -▲- 21 dias de incubação

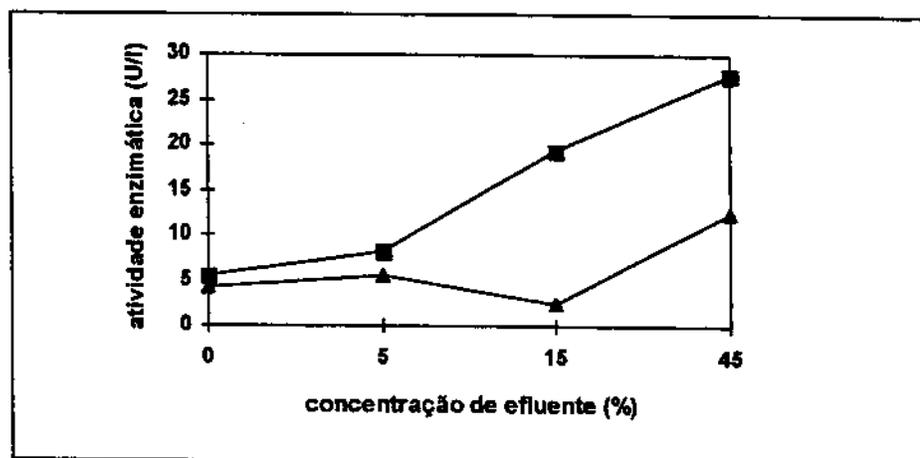


Figura 36. Efeito de concentrações crescentes de efluente no meio líquido de cultura (extrato de malte), sobre o nível de proteínas totais extracelulares para o fungo *Ganoderma sp-70*, mantido a 29° C, sob agitação constante, avaliado a diferentes intervalos de tempo. -■- 14 dias de incubação ; -▲- 21 dias de incubação

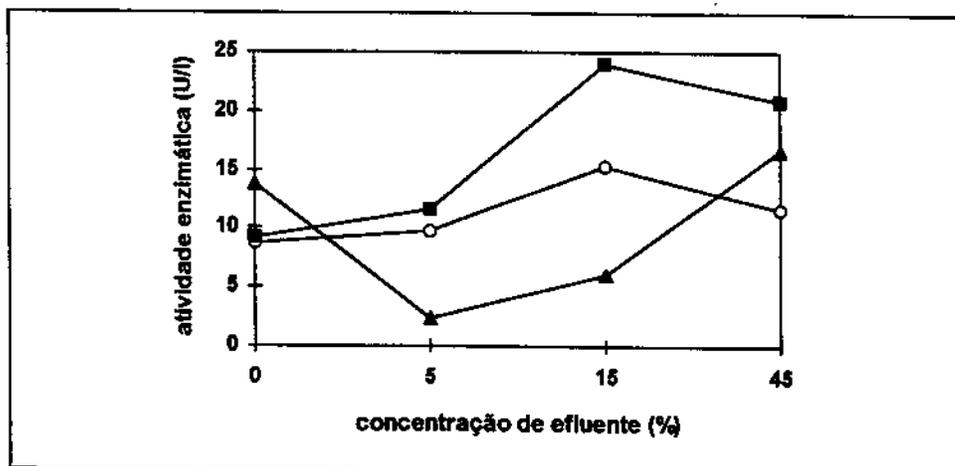


Figura 37. Efeito de concentrações crescentes de efluente no meio líquido de cultura (extrato de malte), sobre o nível de atividade enzimática extracelular de peroxidases totais para o fungo *Ganoderma sp-70*, mantido a 29° C, sob agitação constante, avaliado a diferentes intervalos de tempo. -○- 7 dias de incubação ; -■- 14 dias de incubação ; -▲- 21 dias de incubação

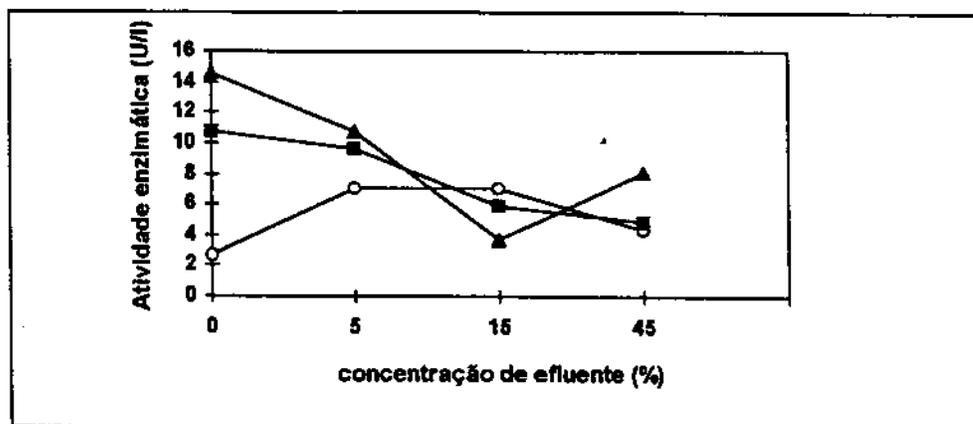


Figura 38. Efeito de concentrações crescentes de efluente no meio líquido de cultura (extrato de malte), sobre o nível de atividade enzimática extracelular de beta-glicosidase para o fungo *P. crinitus*, mantido a 29° C, sob agitação constante, avaliado em diferentes intervalos de tempo. -O- 7 dias de incubação ; -■- 14 dias de incubação ; -▲- 21 dias de incubação

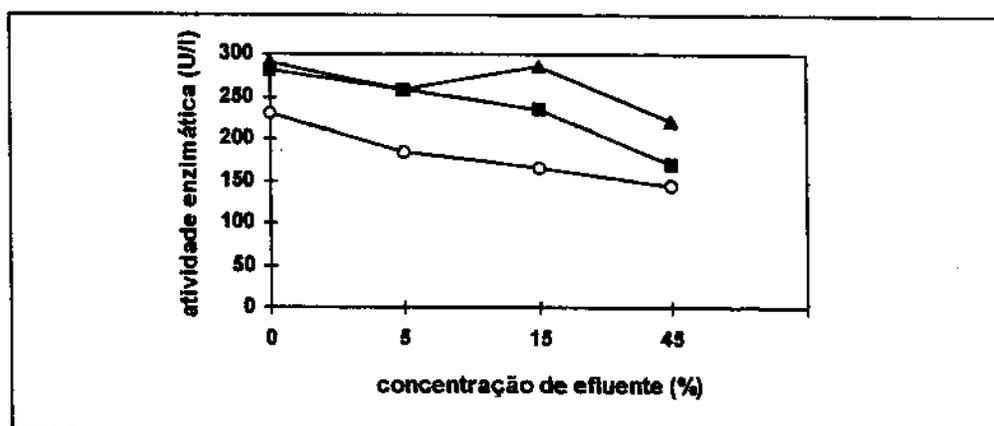


Figura 39. Efeito de concentrações crescentes de efluente no meio líquido de cultura (extrato de malte), sobre o nível de atividade enzimática extracelular de lacase para o fungo *P. crinitus*, mantido a 29° C, sob agitação constante, avaliado a diferentes intervalos de tempo. -O- 7 dias de incubação ; -■- 14 dias de incubação ; -▲- 21 dias de incubação

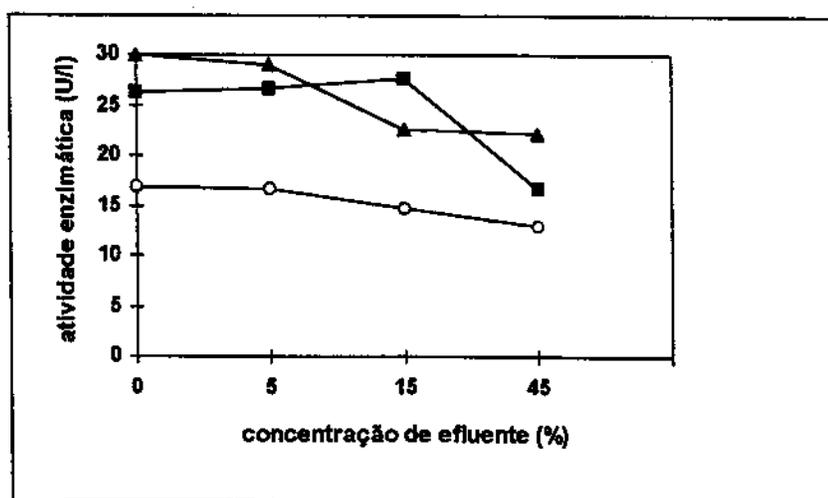


Figura 40. Efeito de concentrações crescentes de efluente no meio líquido de cultura (extrato de malte), sobre o nível de atividade enzimática extracelular de peroxidases totais para o fungo *P. crinitus*, mantido a 29° C, sob agitação constante, avaliado a diferentes intervalos de tempo. -O- 7 dias de incubação ; -■- 14 dias de incubação ; -▲- 21 dias de incubação

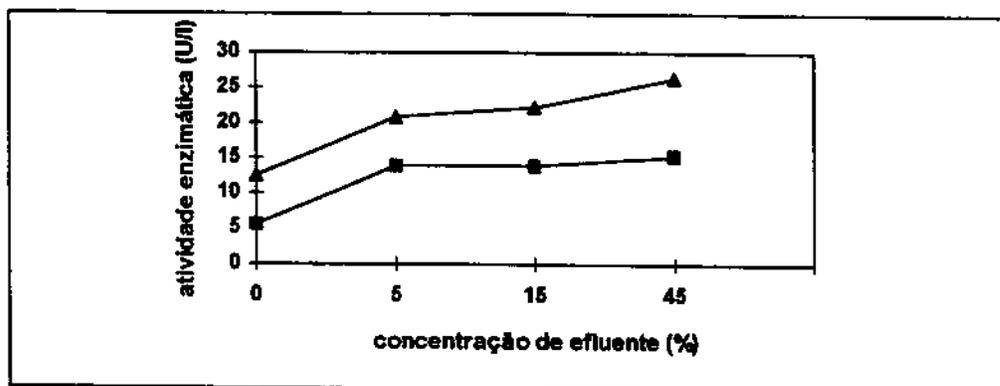


Figura 41. Efeito de concentrações crescentes de efluente no meio líquido de cultura (extrato de malte), sobre o nível de proteínas totais extracelulares para o fungo *P. crinitus*, mantido a 29° C, sob agitação constante avaliado a diferentes intervalos de tempo.

- ■ - 14 dias de incubação ; - ▲ - 21 dias de incubação

Para o fungo *T. villosa*, o nível de atividade enzimática extracelular durante o seu crescimento, em meio líquido, mostrou-se extremamente baixo para praticamente todas as enzimas, à exceção de lacase que apresentou níveis baixos-moderados. O nível de atividade para esta enzima aumentou em função do aumento da concentração de efluente no meio de crescimento (Figura 33). Também em meio líquido não foi observada a produção de Mn-peroxidase. Os níveis de atividade enzimática foram maiores na primeira semana de incubação, do que na segunda.

Para o fungo *Ganoderma sp-70* observou-se um efeito positivo de concentrações crescentes de efluente no nível de atividade enzimática, a partir da concentração de 5%, para as enzimas lacase e peroxidases totais (Figuras 34 e 37), e em todo o intervalo estudado para a enzima beta-glicosidase (Figura 35) e para proteínas totais. Neste caso, os aumentos de atividade com o aumento de concentração são razoavelmente pronunciados. Também neste caso, o nível de atividade enzimática aumentou da primeira para a segunda semana, decaindo na terceira semana.

Para o fungo *P. crinitus* a atividade enzimática extracelular respondeu inversamente ao aumento de concentração de efluente no meio de cultura, para todas as enzimas avaliadas (Figuras 38-41), porém observa-se um ligeiro aumento de proteínas totais. Embora indicando a mesma tendência, a resposta de beta-glicosidase à variação da concentração de efluente foi diferente da observada para as enzimas lacase e peroxidases totais. Da primeira para a segunda semana houve um aumento no nível de atividade enzimática, que decaiu na terceira semana.

Em complementação, foi avaliada a resistência do fungo *T. villosa* frente à concentrações crescentes de efluente em meio sólido, medindo-se crescimento radial em placas de Petri. O efeito da variação da concentração de efluente foi avaliada a diferentes valores de pH.

Os resultados obtidos nestes estudos de crescimento micelial revelaram que para os valores de pH 5,0 e 7,0 o efeito de diferentes concentrações de efluente apresentou aproximadamente o mesmo perfil ao longo da série 0%, 15% e 45%, tendo sido observado um crescimento aparentemente mais significativo nas culturas com 15% de efluente (Figuras 43 e 44). Para culturas com pH 3,5 e 9,0, extremos de pH, o meio com 0% de efluente foi o que apresentou o maior crescimento, embora para pH 9,0 o crescimento observado a 15% foi muito próximo ao observado a 0% (Figuras 42 e 45). Para todos os valores de pH as culturas que apresentaram menor crescimento foram as que estavam sob concentração de 40%.

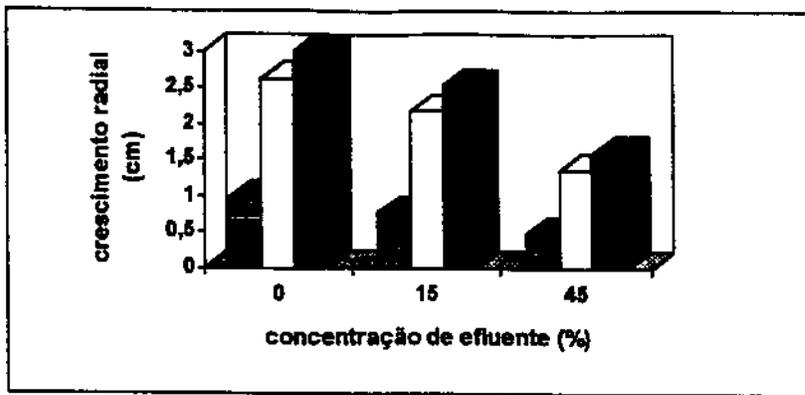


Figura 42. Efeito da concentração de efluente no meio de cultura sobre o crescimento radial do micélio para o fungo *T. villosa*, mantido a 29° C e a pH 3,5, medido a diferentes intervalos de tempo. ■ 3 dias ; □ 6 dias ; ■ 8 dias

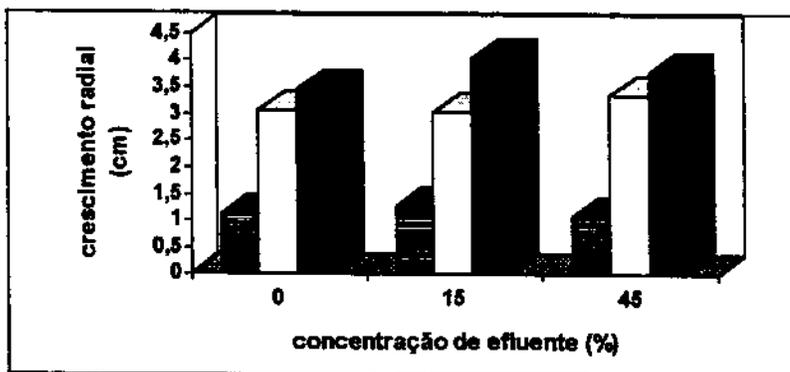


Figura 43. Efeito da concentração de efluente no meio de cultura sobre o crescimento radial do micélio para o fungo *T. villosa*, mantido a 29° C e a pH 5,0, medido a diferentes intervalos de tempo. ■ 3 dias ; □ 6 dias ; ■ 8 dias

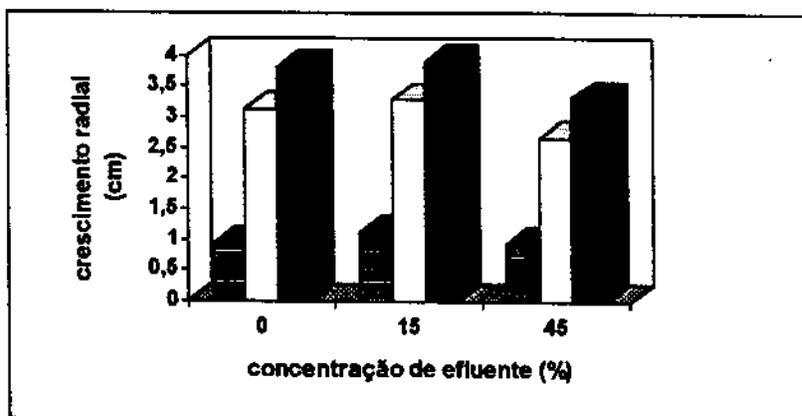


Figura 44. Efeito da concentração de efluente no meio de cultura sobre o crescimento radial do micélio para o fungo *T. villosa*, mantido a 29° C e a pH 7,0, medido a diferentes intervalos de tempo. ■ 3 dias ; □ 6 dias ; ■ 8 dias

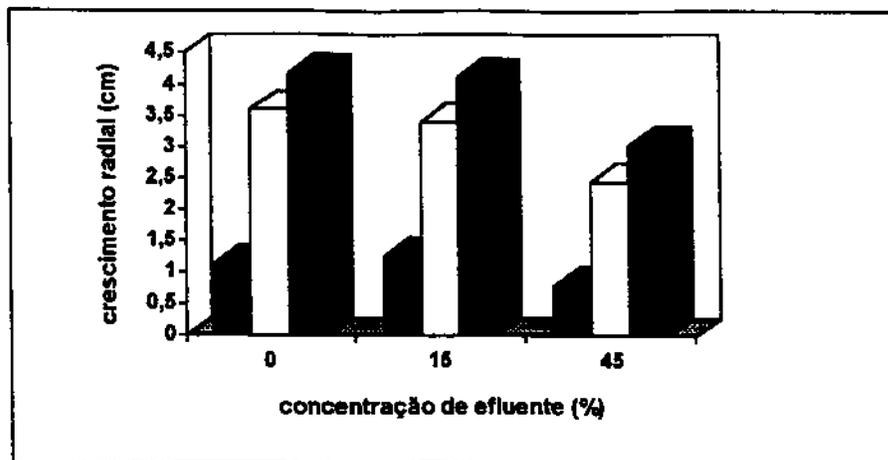


Figura 45. Efeito da concentração de efluente no meio de cultura sobre o crescimento radial do micélio para o fungo *T. villosa*, mantido a 29° C e a pH 9,0, medido a diferentes intervalos de tempo. 3 dias ; 6 dias ; 8 dias

#### 4.4 Estudo da distribuição de massas moleculares das várias frações de componentes do efluente, por cromatografia de exclusão, durante o processo de biodegradação.

O objetivo de se avaliar a distribuição de massas moleculares foi o de verificar quais tipos de estruturas, de alta, média ou baixa massa molecular, podem ser degradadas pela ação dos fungos e se existe alguma seletividade neste processo. Como a técnica cromatográfica utilizada foi a de HPLC de exclusão, monitorada por um detetor de UV, tornou-se possível também avaliar, ou na verdade obter indicações de possíveis modificações estruturais, ao longo do processo de biodegradação, indicadas pelas possíveis variações na absorvidade no UV, para cada uma das frações componentes do efluente. Desta maneira as eluições foram monitoradas concomitantemente em dois comprimentos de ondas diferentes, 210 e 280 nm, respectivamente.

Para uma mesma amostra, diferenças significativas puderam ser observadas entre as curvas de distribuição de MM obtidas a 210 e 280 nm (Figura 46), particularmente mais evidentes em amostras de efluentes tratados com os fungos (Figuras 47 e 48). A principal constatação a partir das diferenças nos perfis de eluição foi a de que a fração de componentes de baixa massa molecular pôde ser melhor caracterizada pela curva obtida a 210 nm, do que pela respectiva curva a 280 nm. Tal comportamento será melhor discutido mais adiante.

A partir da curva de distribuição de massas moleculares obtida para amostras de efluentes sem tratamento (Figura 44.), foi possível confirmar o fato bem conhecido de que o material orgânico dissolvido em efluentes tipo E<sub>1</sub> é bastante heterogêneo tanto em termos de estruturas químicas, como também com relação a distribuição de suas massas moleculares (MM). Estruturas oriundas da degradação parcial de lignina durante o processo de branqueamento da polpa, provavelmente são as predominantes, podendo ser encontradas frações com massa molecular maior que 15000, de alta MM (A-MM), frações de 15000 > MM > 1000, de média MM (Md-MM) e frações de MM < 1000, de baixa MM (B-MM).

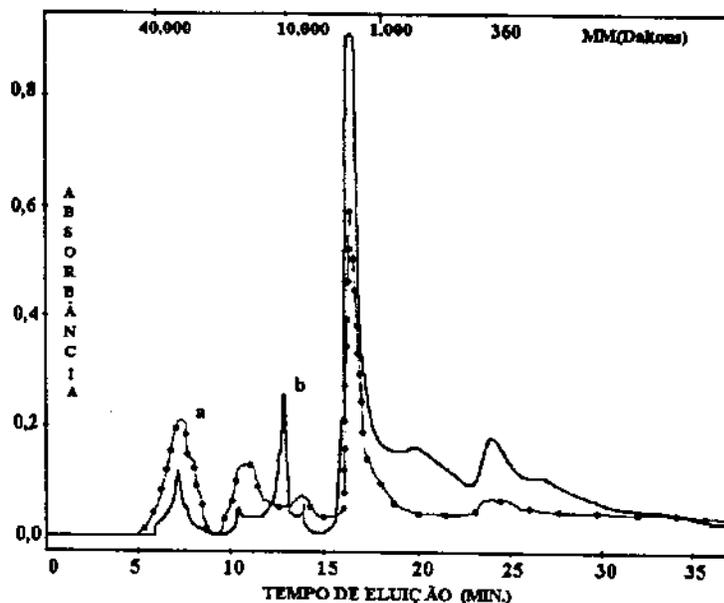


Figura 44. Variação da distribuição de massas moleculares das várias frações contidas no efluente  $E_1$  sem tratamento, obtida por HPLC de exclusão, utilizando-se 0,05M NaOH/H<sub>2</sub>O como eluente e monitorada com um detector de UV a: a. 280 nm ; b. 210 nm

As áreas de cada um dos picos nos cromatogramas foram somadas e a área total obtida representa a absorvância total da amostra ( $A_{280}$  e  $A_{210}$ ) no respectivo comprimento de onda. O conteúdo relativo de cada fração, relacionado na Tabela 3, foi calculado pela relação entre a área individual da respectiva fração e a área total do cromatograma, sem qualquer fator de correção.

Com base nestes cálculos, a fração Md-MM representou cerca de 52,0 % dos componentes totais do efluente, quando a curva foi monitorada a 210 nm e 57,2 % a 280 nm. Em adição, a fração B-MM representou 43,6 % e 1,8 %, a 210 nm e 280 nm, respectivamente, e a fração A-MM 4,0 e 41,0 %, conforme dados da Tabela 3. Portanto, as frações com MM > 1000 representam quase que a totalidade dos componentes do efluente.

Tabela 4. Variação do conteúdo relativo de cada fração durante o processo de biodegradação pelo fungo *T. villosa*, medida por HPLC de exclusão usando um detector de UV a 210 e 280 nm, respectivamente.

		TEMPO DE INCUBAÇÃO (h)							
		0	24		48		72		
		CONTEÚDO RELATIVO DE CADA FRAÇÃO (%)							
FRAÇÃO	$\lambda$ (nm)	$A_1/A_2$	$A_1/A_2$	$A_1/A_2$	$A_1/A_2$	$A_1/A_2$	$A_1/A_2$	$A_1/A_2$	$A_1/A_2$
$\Sigma$ fração	210	4,0	0,09	10,7	0,72	8,5	0,52	10,5	0,76
alta-MM	280	41,0		14,7		16,1		13,8	
$\Sigma$ fração	210	52,0	0,90	61,7	0,72	32,1	0,38	41,8	0,58
média-MM	280	57,2		84,9		83,1		71,9	
$\Sigma$ fração	210	43,6	24,22	27,5	152,72	59,4	98,9	47,6	3,25
baixa-MM	280	1,8		0,18		0,6		14,2	

EF, = efluente não tratado ;  $A_1 = A_{210\text{ nm}}$  ;  $A_2 = A_{280\text{ nm}}$   $\Sigma$  fração = somatória das áreas individuais das frações

As variações observadas nas curvas de distribuição de massas moleculares, durante o processo de biodegradação do efluente, indicaram que todas as frações; alta, média e baixa-MM, foram degradadas pela ação tanto do fungo *Trametes villosa* (Figuras 47 e 48), quanto a do fungo *Panus crinitus* (Figura 51).

Resultados obtidos para o fungo *Trametes villosa* mostraram que as várias frações foram modificadas a velocidades diferentes e, aparentemente, as modificações químicas observadas nas mesmas, também foram diferenciadas. Tal fato tornou-se evidente pela análise da evolução das áreas absolutas de cada pico no cromatograma (sem fator de correção) (Figura 49), durante o processo de biodegradação. Assim a fração de baixa-MM foi rápida e intensamente degradada durante todo o processo, diferentemente da fração  $M_2$ , de média-MM, cuja a área correspondente aumentou durante as primeiras 48 hs de incubação e em seguida diminuiu acentuadamente.

A variação do conteúdo relativo de cada fração durante o processo de biodegradação, descrita pela Tabela 3, também reflete ou confirma a seletividade, pelo fungo, na degradação das várias frações de diferentes massas moleculares. O conteúdo relativo da fração de alta-MM, após uma variação drástica no início do período de incubação, apresentou apenas ligeiras variações ao longo do tempo restante, embora uma tendência em diminuir tenha sido evidenciada. A fração de média-MM, ao contrário, apresentou aumento de conteúdo relativo. Por outro lado, a fração de baixa massa molecular, coerentemente com o fato de que esta pode ser produzida e consumida durante o processo, apresentou variações acentuadas no seu conteúdo relativo.

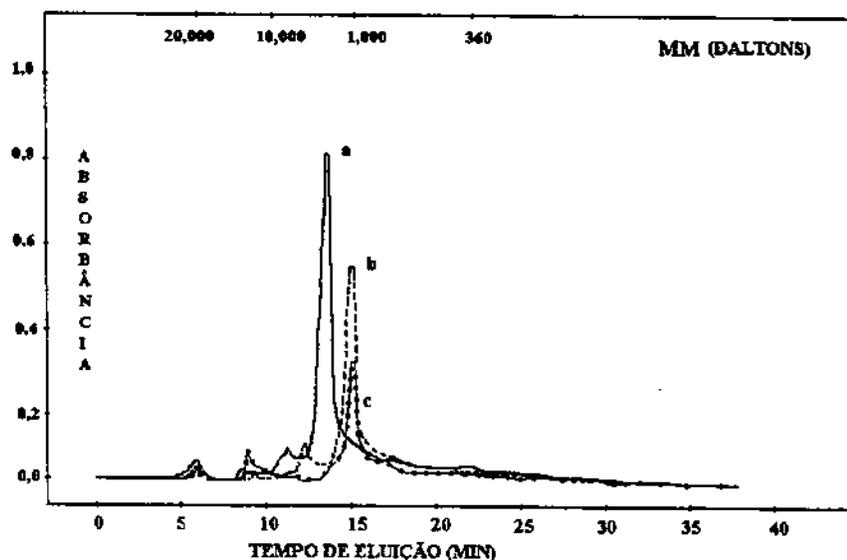


Figura 47. Variação na distribuição de massas moleculares das várias frações contidas no efluente  $E_1$  durante o processo de biodegradação pelo fungo *Trametes villosa*, obtida por HPLC de exclusão, utilizando-se 0,05M NaOH /H<sub>2</sub>O como eluente e monitorada a 280 nm, com um detector de UV e a diferentes intervalos de tempo. a. 24 hs ; b. 48 hs ; c. 72 hs

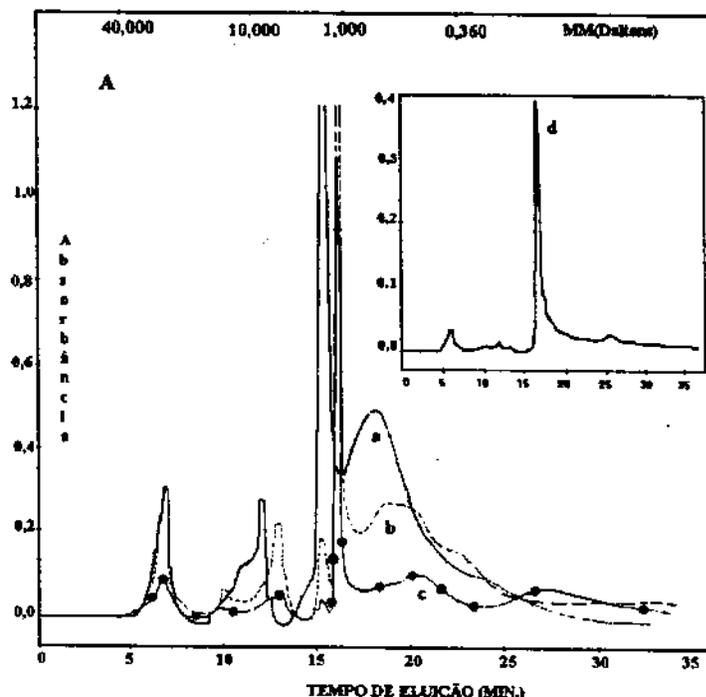


Figura 48. Variação na distribuição de massas moleculares das várias frações contidas no efluente  $E_1$  durante o processo de biodegradação pelo fungo *Trametes villosa*, obtida por HPLC de exclusão, utilizando-se 0,05M NaOH/H<sub>2</sub>O como chvente e monitorada a 210 nm, com um detector de UV e a diferentes intervalos de tempo. a. 12 hs ; b. 48 hs ; c. 120 hs ; d. 144 hs

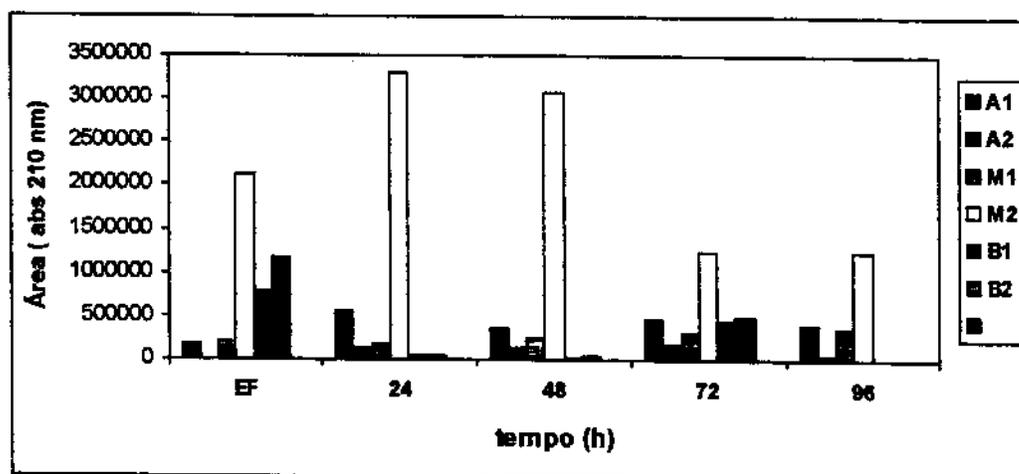


Figura 49. Distribuição de massas moleculares do efluente  $E_1$  durante o processo de biodegradação pelo fungo *Trametes villosa*, mostrando a evolução das áreas absolutas de cada uma das frações nos cromatogramas obtidos por HPLC de exclusão, utilizando 0,05M NaOH/H<sub>2</sub>O como eluente e monitorada a 210 nm, com um detector de UV. A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> = frações de alta-MM ; M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> = frações de média-MM ; B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> = frações de baixa-MM.

As áreas totais, medidas pela absorbância tanto a 210 nm quanto a 280 nm, diminuíram durante o processo de biodegradação, sendo que, especialmente a 280 nm, o decréscimo foi bem mais intenso do que a 210 nm (Figura 50). A curva de variação da absorbância a 465 nm, indicativa da intensidade da cor e portanto da quantidade de

cromóforos presentes no efluente, que absorvem na região do visível, apresentou boa correlação com a curva de variação da absorbância a 280 nm.

A relação das absorbâncias a 210 e 280 nm,  $A_1/A_2$ , relacionada na Tabela 4, foi usada como um indicativo de alterações espectrais e portanto estruturais das várias frações componentes do efluente, desde que mudanças de absorvidade refletem possíveis modificações químicas ocorridas nas mesmas durante a biodegradação.

A fração de alta-MM apresentou uma alteração significativa neste valor, particularmente nas primeiras 24 hs de incubação, passando de 0,09 para 0,72, para em seguida diminuir ligeiramente. Para a fração de média-MM, o valor de  $A_1/A_2$  decresceu razoavelmente ao longo do período de tratamento com o fungo. Já a fração de baixa-MM, como era de se esperar, dada a composição bastante heterogênea da mesma, apresentou variações drásticas nos valores deste parâmetro.

Embora em algumas fases da biodegradação, reações indesejáveis de polimerização puderam ser observadas (Figura 49), a reação predominante foi a de despolimerização de estruturas de alta MM, com a conseqüente formação de frações de baixa MM. Neste aspecto, como já mencionado, a curva obtida monitorando-se a absorbância a 210 nm foi muito mais elucidativa, desde que mostrou que as frações de baixa-MM, formadas durante a biodegradação, absorvem preferencialmente a 210 nm do que a 280 nm. Este resultado pode ser indicativo de que o caráter aromático destas estruturas foi bastante modificado.

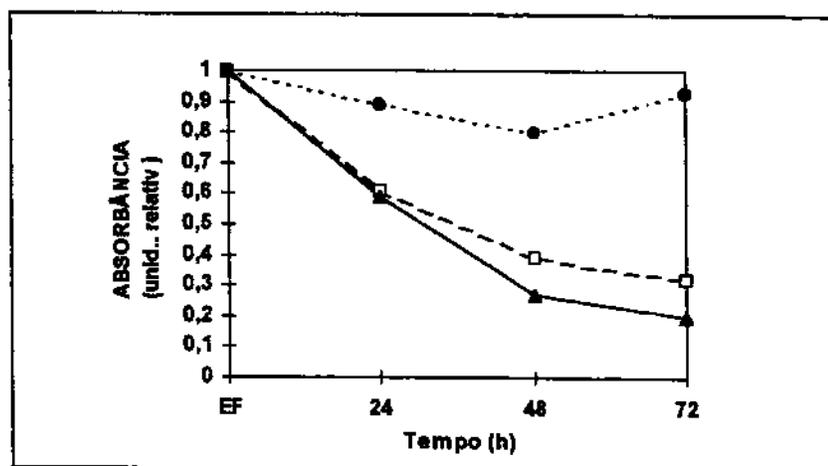


Figura 50. Variação das absorbâncias totais das amostras de efluente, durante o processo de biodegradação pelo fungo *T. villosa*, medidas em diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ).

□- absorbância a 280 nm ; ●- absorbância a 210 nm ; ▲- absorbância a 465 nm

A curva de distribuição de massas moleculares para o fungo *P. crinitus* (Figura 51) evidenciou um comportamento diferente do observado para o fungo *T. villosa*, embora também tenha demonstrado semelhanças. A presença de frações de baixa-MM não é tão pronunciada, porém, em contrapartida, a presença de frações de alta-MM originalmente não existentes no efluente sem tratamento, foram claramente evidenciada especialmente no período de 24 hs, demonstrando assim que as mesmas foram geradas durante o processo de biodegradação. Aumento e diminuição de área, para as frações de média-MM, alternaram-se ao longo do período de incubação. A cronologia das

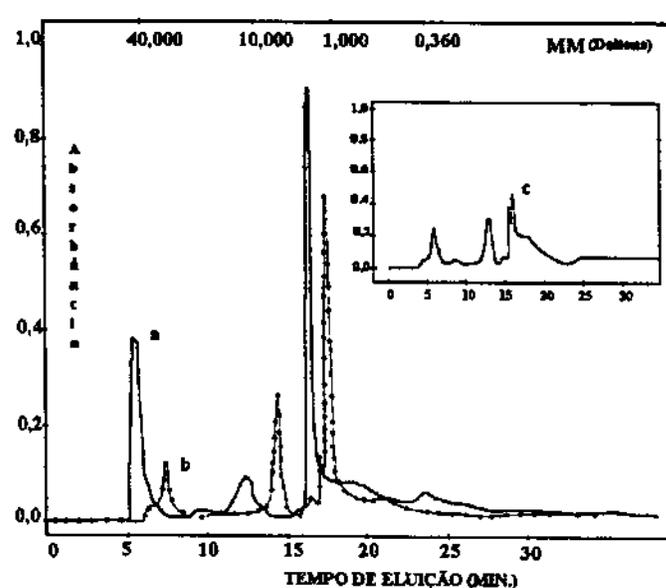


Figura 49. Variação da distribuição de massas moleculares das várias frações contidas no efluente  $E_1$  durante o processo de biodegradação pelo fungo *Panus crinitus*, obtida por HPLC de exclusão, utilizando-se 0,05M NaOH /H<sub>2</sub>O como eluente e monitorada a 210 nm, com um detector de UV a diferentes intervalos de tempo. a. 24 hs ; b. 48 hs ; c. 144 hs

modificações observadas na Figura 52, indica que à semelhança do efeito observado para a velocidade de descoloração, também a biodegradação dos componentes do efluente é temporalmente diferente para o fungo *P. crinitus*, quando comparada ao fungo *T. villosa*.

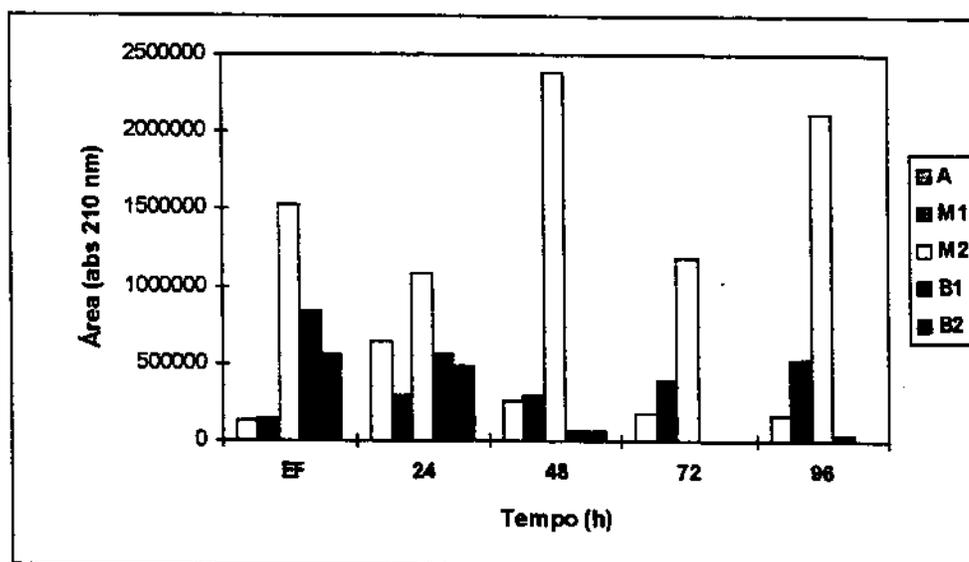


Figura 52. Distribuição de massas moleculares do efluente  $E_1$  durante o processo de biodegradação pelo fungo *P. crinitus*, mostrando a evolução das áreas absolutas de cada uma das frações nos cromatogramas obtidos por HPLC de exclusão, utilizando 0,05M NaOH/H<sub>2</sub>O como eluente e monitorada a 210 nm, com um detector de UV.

$A_1$  e  $A_2$  = frações de alta-MM ;  $M_1$  e  $M_2$  = frações de média-MM ;  $B_1$  e  $B_2$  = frações de baixa-MM .

O variação do conteúdo relativo de cada fração durante o tratamento do efluente com o fungo, como descrito na Tabela 5, demonstrou que o percentual da fração de alta-MM diminui progressiva e acentuadamente no período de 0-48 hs e aumentou ligeiramente no período seguinte. Também para o tratamento com o fungo *P. crinitus*, o conteúdo relativo da fração de média-MM aumentou nas primeiras 48 hs e diminuiu na fase seguinte.

**Tabela 4.** Variação no conteúdo relativo de cada fração na distribuição total de massa molecular do efluente, durante o processo de biodegradação pelo fungo *P. crinitus*.

fração	Tempo de incubação (hs)			
	EF	24	48	72
	Conteúdo relativo da fração (%)			
$\Sigma$ alta-MM	41,0	21,9	9,4	13,8
$\Sigma$ média-MM	57,2	44,6	89,6	77,89
$\Sigma$ baixa-MM	1,8	33,8	0,3	7,8

EF, efluente não tratado

$\Sigma$  fração = área total obtida pela somatória das áreas individuais de cada fração p.e.  $\Sigma$  baixa-MM = B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub>

#### 4.5. Mecanismos de biodegradação do efluente- Estudos espectroscópicos

##### 4.5.1. Modificações UV espectrais do efluente tipo E<sub>1</sub> durante o tratamento com os fungos basidiomicetos *Panus crinitus* e *Trametes villosa*.

O espectro diferencial de soluções alcalinas contra soluções neutras de efluente representa tipicamente a absorção de grupamentos fenólicos ionizáveis. Neste contexto, torna-se muito interessante avaliar os possíveis mecanismos operantes na descoloração de efluentes tipo E<sub>1</sub>, da fase de branqueamento, estudando-se as modificações espectrais na região de 200-400 nm, utilizando-se tais espectros diferenciais.

Embora exista uma grande quantidade de textos descrevendo o comportamento espectral de ligninas e substâncias relacionadas, deve ser destacado o fato de que a grande maioria dos textos são bastante antigos e nem sempre concordantes. Por outro lado, os efluentes em estudo contém, adicionalmente, uma variedade muito grande de substâncias, tornando a interpretação dos espectros bastante complexa. Assim sendo, tornou-se oportuno estudar as características espectrais de diversas substâncias fenólicas padrões, relacionadas com as estruturas básicas existentes na molécula de lignina e outras supostamente existentes em efluentes tipo E<sub>1</sub>. O objetivo foi o de tentar estabelecer uma correlação entre estrutura e espectro-UV, que nos permitisse não só visualizar as possíveis estruturas contidas no efluente, como também entender as modificações espectrais observadas durante o tratamento biológico do mesmo com os fungos. A Tabela 5 resume os principais resultados obtidos neste estudo.

Dos dados da Tabela 5 pode-se observar que estruturas fenólicas com anel di-substituído, sem grupamentos conjugados, apresentaram duas bandas de absorção, sendo caracteristicamente uma delas na região de 290-310 nm (banda B) e outra em 240-250 nm.

TABELA 5. Dados UV-espectrais de substâncias-padrões.

SUBSTÂNCIA	ESPECTRO DE ABSORÇÃO			INTENSIDADE RELATIVA		$\Delta\lambda_{\text{máx}}$	
	A	B	CD	B/A	B/C A/C B/D	B-A	B-C
FENOL	240	300	-	2,102	-	60	-
2-CLOROFENOL	244	308	-	1,713	-	64	-
CATECOL	246	302	-	1,236	-	56	-
RESORCINOL	244	296	-	1,197	-	52	-
HIDROQUINONA	252	318	-	1,339	-	66	-
GUAIACOL	240	294	214 (C)	0,405 2,465	0,49 1,211	54	80 26(A-C)
2,6-DIMETOXIFENOL	254	290	-	1,486	-	36	-
SERINGUALDEÍDO	252	-	362	-	0,937 (A/D)	-	110 (A-D)
ACETOSIRINGONA	250	-	360	-	0,885 (A/D)	-	100 (A-D)
ÁC. FERÚLICO	256	-	224 374	-	0,276 (A/D)	-	118(A-D) 32(A-C)
3,4-DIHI-DROXI-BENZALDEÍDO	254	-	220 370	-	0,655 (A/D) 1,700 (A/C)	-	116 (A-D) 34 (A-C)
VANILINA	250	-	360 216	-	0,789 (A/D) 9,586 (A/C)	-	110 (A-D) 34 (A-C)
ACETOVANILONA	248	-	340 356 216	-	0,720 (A/D) 5,954 (A/C)	-	108 (A-D) 92 (A-D) 36 (A-C)
VANILIL ALCOOL	254	300	-	1,334	-	46	-
4-HIDRÓXI-ACETOFENONA	238	-	352 332	-	0,024 (A/D)	-	114 (A-D) 94 (A-D)
3,4-DIMETÓXI-BENZILÁLCOOL E ANIZALDEÍDO	-	-	-	-	-	-	-
2-CUMARANONA	240	292	-	0,565 1,768	-	52	-
4-HIDRÓXI-CUMARINA	236	290	222 ©	1,009 0,990	1,186 (B/C) 1,174 (A/C)	54	14 (A-C) 68 (B-C)
EUGENOL	252	302	-	1,216 0,821	-	50	-
AC. SALICÍLICO	254	-	330 218	-	0,19(A/C) 3,728(A/D)	-	36(A-C) 76(A-D)
AC. 3,5 DIHI-DROXIBENZÓICO	236	274	334	9,15	0,925(B/D)	38*	98(A-D)
AC. <i>p</i> -HI-DROXI-	242	-	358	-	1,153(A/C)	-	32(A-C)

CINÂMICO			210 214		0,453(A/D)		116(A-D)
AC. <i>p</i> -HIDROXI FENILACÉTICO	-	-	276 226	- -			
2,5-DIHIDROXI FENILACÉTICO	242	-	318 214	- -	1,38(A/C) 1.211(A/D)	- -	28(A-C) 76(A-D)
TETRAHIDROXI 1,4 QUINONA	-	270	384 210	- -	0.234(B/C) 0.863(B/D)	- -	114(B-D) 60(B-C)
AC. RHODIZONICO	-	270	384 210	- -	0.338(B/C) 0.924(B/D)	- -	114(B-D) 60(B-C)
CATECHINA	246	296	412 228	0.416 2.400	0.627(B/C) 1.507(A/C) 1.629(B/D) 3.112(A/D)	50	68(B-C) 116(B-D) 18(A-C) 166(A-D)
LIGNINA DIOXANO	230	294	362	0.249 4.005	0.517(B/D) 2.072(A/D)	64	132(A-D) 68(B-D)

Estruturas fenólicas contendo anel conjugado com grupamento carbonila, do tipo R-CO-R<sub>1</sub>, onde R é um radical guaiacil ou seringil e R<sub>1</sub> é um radical alquila ou H, apresentaram espectro diferencial com absorção acima de 320 nm, especificamente na região de 350-360 nm. Se o grupo é de aldeído, a absorção é representada por uma banda simples. Se porém o grupamento é de cetona, ocorre um desdobramento da banda, podendo ser observado um ombro. Neste caso a banda B (290-310 nm) está ausente. Fenóis com grupamentos carboxílicos conjugados exibiram uma banda de absorção na região de 290-320 nm, cuja absorvidade molar foi menor, comparada com as respectivas estruturas de aldeídos ou cetonas. Por outro lado, exibiram também uma banda de absorção na região de 210 a 230 nm, cuja absorção foi bem mais pronunciada. O efeito de metoxilas na absorção também foi claramente evidenciado em estruturas tipo guaiacol, vanilina, 2,6-dimetoxifenol, seringaldeído, etc. A inserção de um grupamento metoxila desloca ligeiramente a banda secundária (B) para comprimentos de onda maiores, além de provocar o desdobramento da mesma. Assim estruturas fenólicas contendo um grupamento metoxila, como por exemplo guaiacol, apresentaram espectros diferencial com três bandas de absorção, sendo que todas as bandas se apresentaram abaixo de 300 nm e particularmente a banda em torno de 220 nm foi intensa. Por outro lado, 2,6-dimetoxifenol e seringaldeído apresentaram apenas duas bandas. Vanilina e seringaldeído caracteristicamente apresentaram bandas de absorção a 360 e 362 nm, respectivamente deslocadas em função do número diferente de metoxilas.

A solução de efluente tipo Kraft, estágio de extração alcalina (E<sub>1</sub>), apresentou espectros de absorção-UV, não diferenciais, na região de 200-500 nm como observados na Figura 53. Como era esperado, o espectro em solução de pH alcalino foi diferente do espectro em solução de pH neutro. Desta maneira, o espectro diferencial (obtido pela subtração do espectro a pH neutro (referência) do espectro a pH alcalino), Figura 54, apresentou bandas de absorção máxima a 220, 272, 310 e 360 nm, respectivamente.

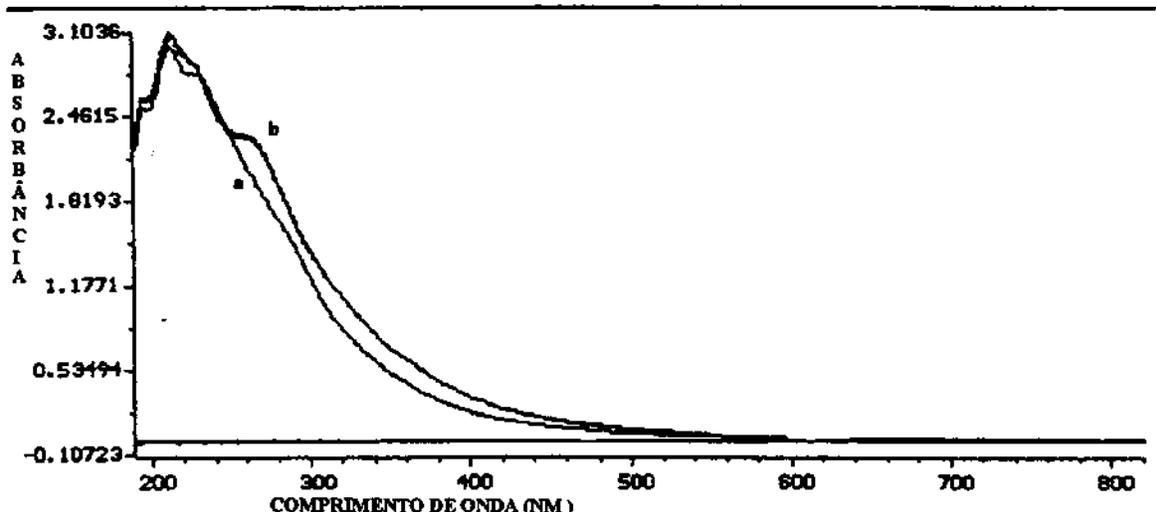


Figura 53. Espectro-UV não diferencial do efluente  $E_1$  sem tratamento, em meio ácido (a) e em meio básico (b).

Os resultados obtidos demonstraram que os grupamentos fenólicos foram responsáveis por 12,4 % da absorção total da amostra de efluente sem tratamento e que o caráter aromático em tais preparações mostrou-se bem menor do que o observado para extratos de lignina (Figura 54). Também o conteúdo relativo de grupos carbonílicos conjugados com as estruturas fenólicas, evidenciados pela absorção acima de 300 nm, foi menor. Outra observação a ser destacada, a partir do espectro diferencial do efluente não tratado é a de que, embora as absorções típicas de fenóis a 250 nm (banda A) e 300 nm (banda B) não estejam presentes, o  $\Delta\lambda$  máx. de 56 nm, entre as bandas de absorção observadas (220 e 276 nm), corresponde ou é semelhante aos valores encontrados para fenóis típicos, com anéis aromáticos di-substituídos, Tabela 5.

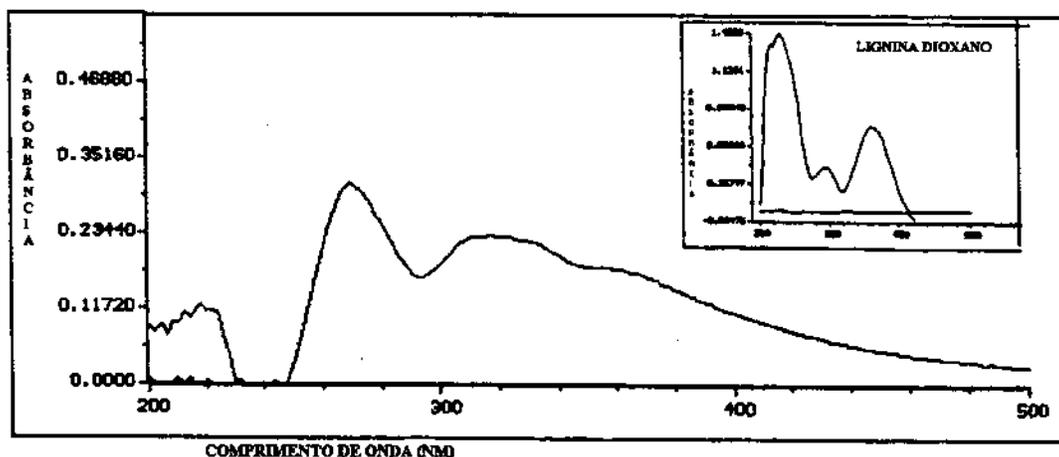


Figura 54. Espectro-UV diferencial do efluente  $E_1$  sem tratamento. A figura em destaque representa o espectro diferencial de uma preparação de lignina de palha de arroz, extraída com dioxano.

A natureza destes grupamentos conjugados foi avaliada utilizando-se a reação com borohidreto de sódio a 45 °C. Estudos cinéticos baseados na reação de redução do efluente com este agente redutor, monitorada a diferentes comprimentos de onda (Figura 55 e 56), indicaram que a redução de absorbância a 220 nm pôde ser correlacionada com a redução a 272 nm, porém, ambas as reduções de absorbância não apresentaram correlação com a redução a 310 nm e nem com a redução a 366 nm. Tal resultado sugere a presença de mais de um tipo de grupo carbonílico conjugado com grupamento fenólico. Por outro lado, após

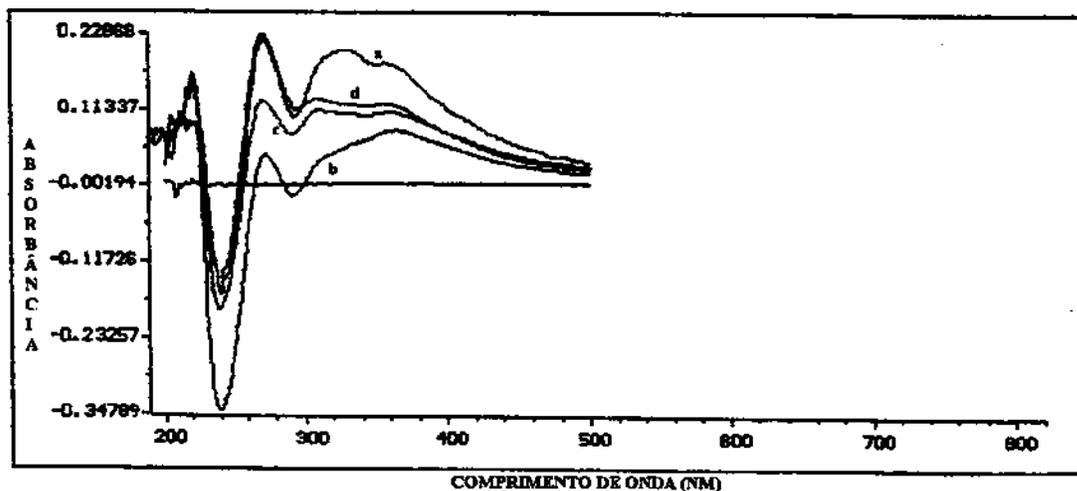


Figura 55. Espectro-UV diferencial do efluente E<sub>1</sub>, sem tratamento, durante a reação de redução com borohidreto de sódio ( 80 mg/5 ml) a 40 °C, pH 10,5 e monitorada a diferentes intervalos de tempo: a. 0 hs b. 4 hs c. 24 e d. 48

um período inicial de reação de 4 hs, deixando-se o sistema retornar a temperatura ambiente, observou-se o aumento das respectivas absorbância, como demonstrado pelas Figura 55 e 56. A absorbância a 272 nm foi a que mais rápida e intensamente retornou a níveis mais elevados.

Informações adicionais, também importantes, foram ainda obtidas a partir dos resultados das análises das amostras de efluente resultantes da extração com solventes. O espectro diferencial do extrato obtido da extração com acetato de etila apresentou uma banda de absorção na região de 220 nm e praticamente nenhuma absorbância acima de 250 nm, Figura 57(a). O efluente resultante, contendo a fração residual após a extração, curiosamente apresenta absorção predominantemente acima de 300 nm, Figura 57(b).

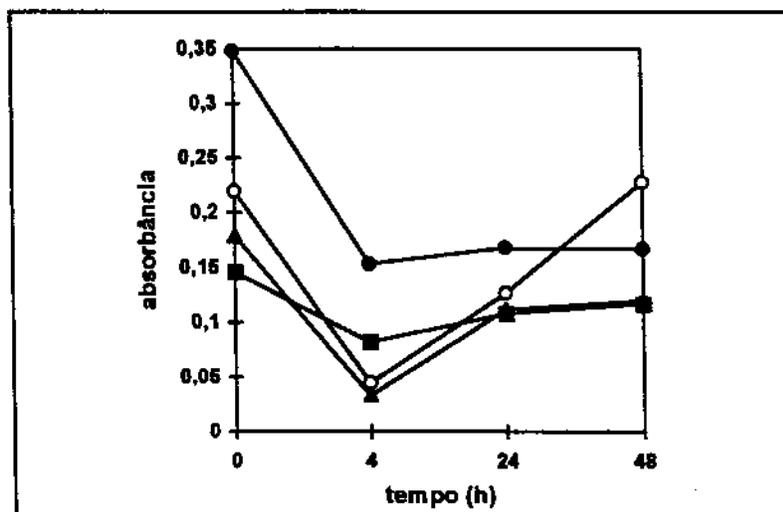


Figura 56. Evolução da reação de redução do efluente, sem tratamento biológico, com borohidreto de sódio, monitorada a diferentes comprimentos de onda, 220, 272, 310 e 366 nm, a partir dos espectros diferenciais, como na figura 55.

-■- 366 nm ; -▲- 310 nm ; -●- 220 nm ; -○- 272 nm

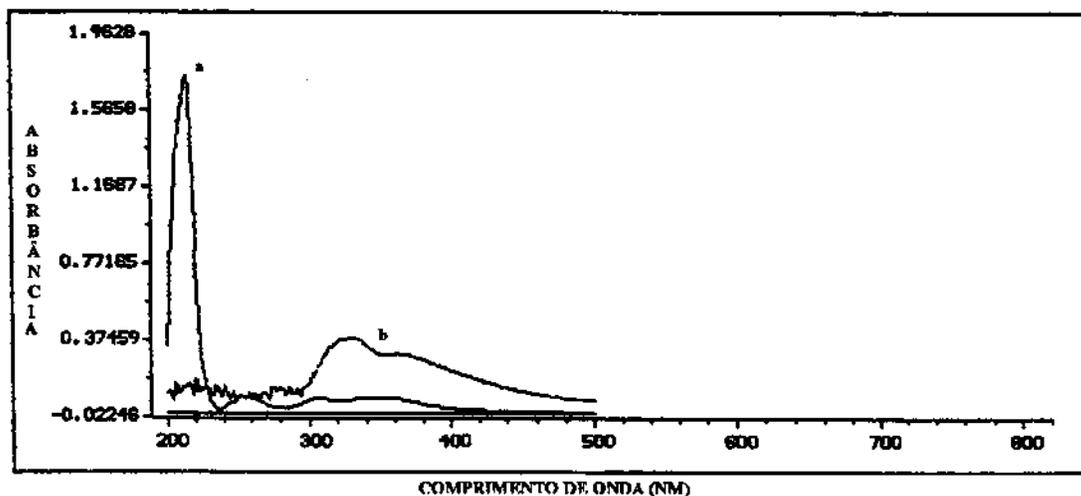


Figura 57. Espectro diferencial das frações obtidas após extração do efluente sem tratamento, com acetato de etila a. fração extraída com o solvente b. fração residual (restante no efluente) após extração.

Espectros diferenciais de efluentes tratados com os fungos *T. villosa* e *P. crinitus* apresentaram-se como nas Figura 58A e A' e 59 e Figura 62, respectivamente. Foi possível distinguir claramente as diferentes etapas da ação do fungo, de acordo com o efeito promovido ao longo do período de incubação. Assim, para o fungo *T. villosa*, numa etapa considerada inicial (primeiras 48 horas de incubação) notou-se o aumento acentuado de absorbância em torno de 312 nm, a qual se deslocou, com o tempo, para 318 nm (Figura 58 A). Tal aumento foi concomitantemente acompanhado também pela evolução da absorção a 364 nm, a qual apresentou-se inicialmente como um ombro, parcialmente sobreposto com a banda anterior. No tempo de 48 hs, ocorreu uma clara definição destas duas bandas, que atingiram então valores máximos de absorbância (Figura 58A'). Na

etapa seguinte, desapareceu a banda a 364 nm e mais lentamente, também a absorção a 315 nm, com o conseqüente aumento a 220 nm (Figura 59). A presença de um ponto isobéstico em torno de 250 nm, parece indicar a interconversão de espécies químicas.

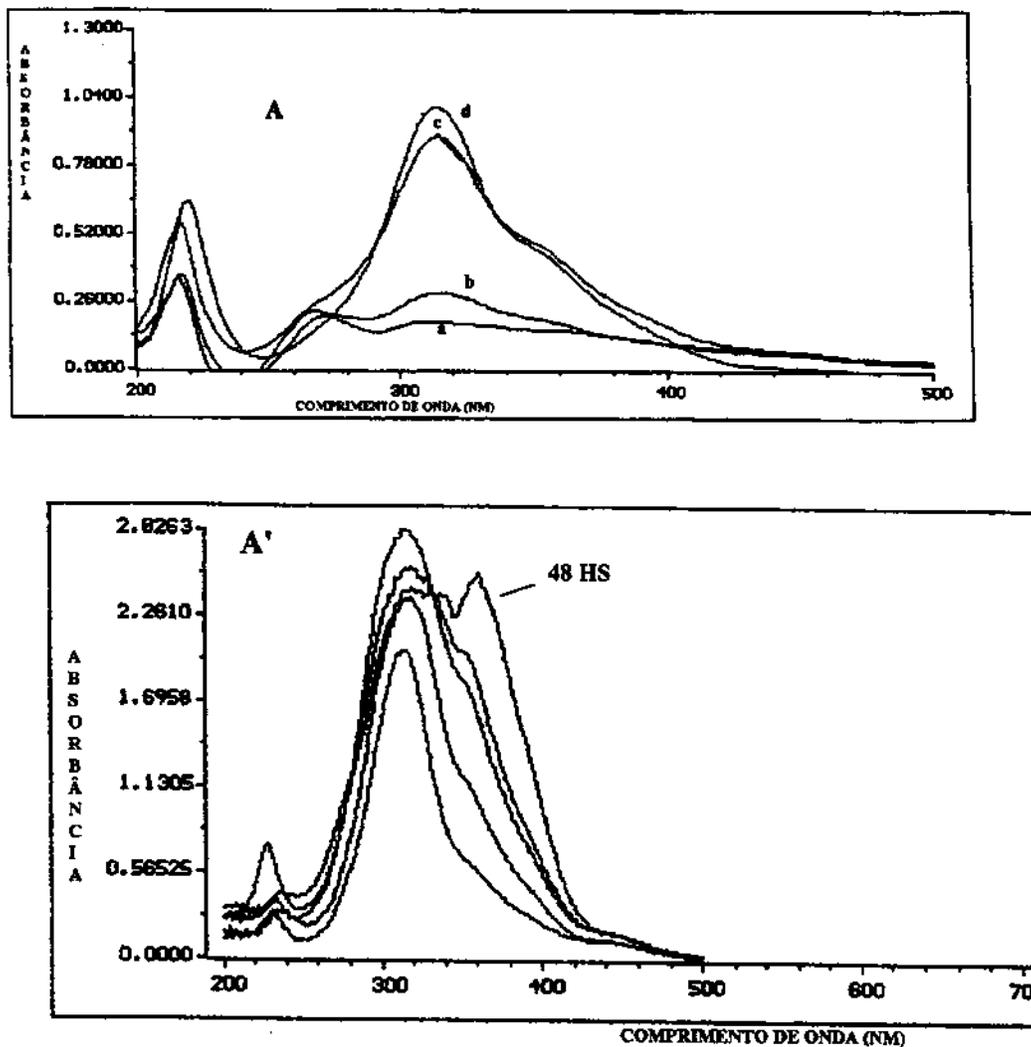


Figura 58 A e A'. Espectros-UV diferenciais de efluente Kraft ( $E_1$ ) durante a fase inicial (0-72 hs) do período de incubação com o fungo *T. villosa*, a 25° C, sob agitação constante, destacando o espectro obtido a 48 hs (A'). A a. efluente sem tratamento b. 12 hs c. 24 hs d. 72 hs.

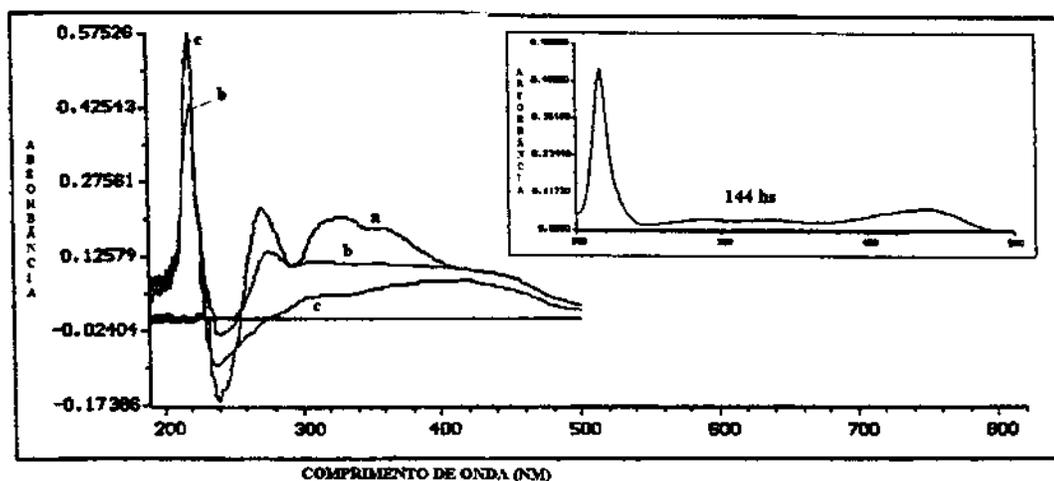


Figura 59. Espectros-UV diferenciais de efluente Kraft ( $E_1$ ) durante a fase final (96-144 hs) do período de incubação com o fungo *T. villosa*, a 25° C, sob agitação constante.  
a. 96 hs b. 120 hs c. 144 hs

Na etapa final do processo, observou-se a ausência de absorção acima de 300 nm, uma banda intensa na região de 220 nm e uma absorção bem menos pronunciada em torno de 420-450 nm. A evolução das absorbâncias, individualmente destacadas, nesta fase é descrita pela Figura 60.

A redução da amostra de efluente, tratado com o fungo *T. villosa*, com borohidreto de sódio suprimiu a absorção a 270 nm, mas manteve inalterada a absorção a 220 nm (Figura 61).

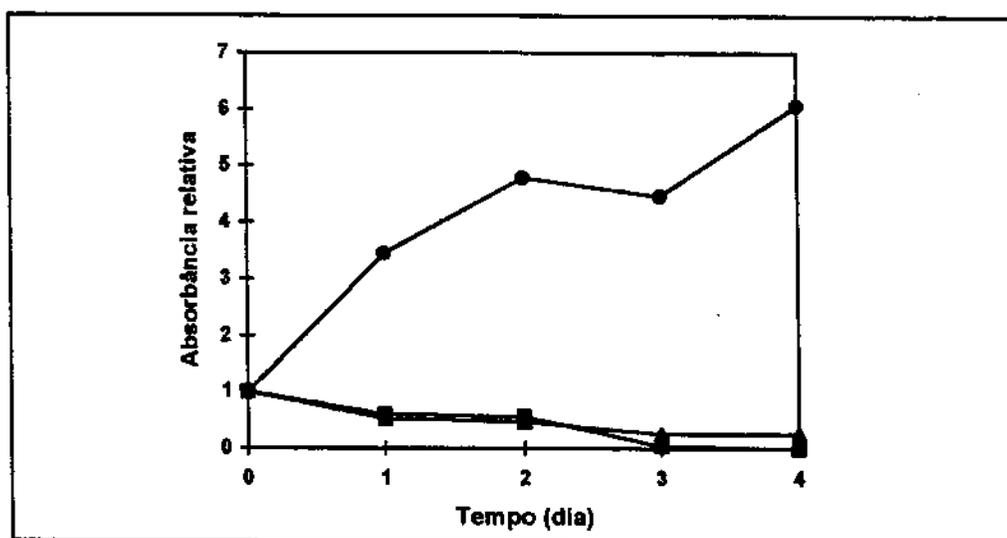


Figura 60. Evolução de absorbâncias individuais ao longo da fase final do período de incubação, seleccionadas a partir da Figura 58. -■- 276 nm ; -▲- 340 nm ; -●- 220 nm

Para o fungo *Panus crinitus*, observou-se um comportamento bem diferente do observado para o fungo *Trametes villosa*, com relação às alterações espectrais ocorridas

durante o período de incubação com o efluente. A grande diferença encontrada foi que, neste caso, não foi observado o aumento acentuado de absorvância a 310 nm. Este resultado parece evidenciar mecanismos de degradação pelo menos parcialmente diferentes, comparando-se os dois fungos em estudo.

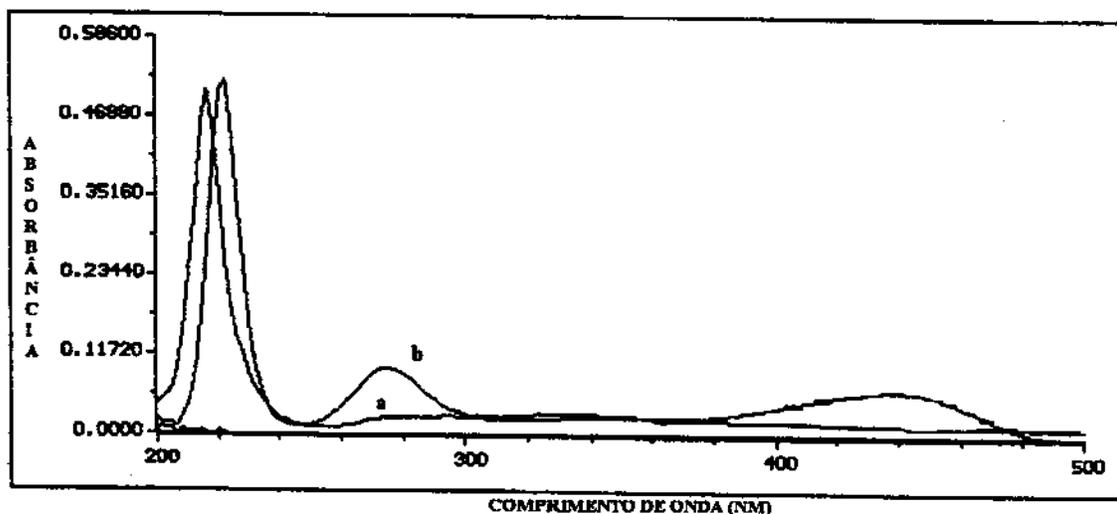


Figura 61. Espectro-UV diferencial do efluente ( $E_1$ ), tratado com o fungo *T. villosa* (120 h): a) após tratamento com borohidreto de sódio (80 mg/5 ml), 15 min. a 40° C e pH 10,5 ; b) antes da reação com agente redutor.

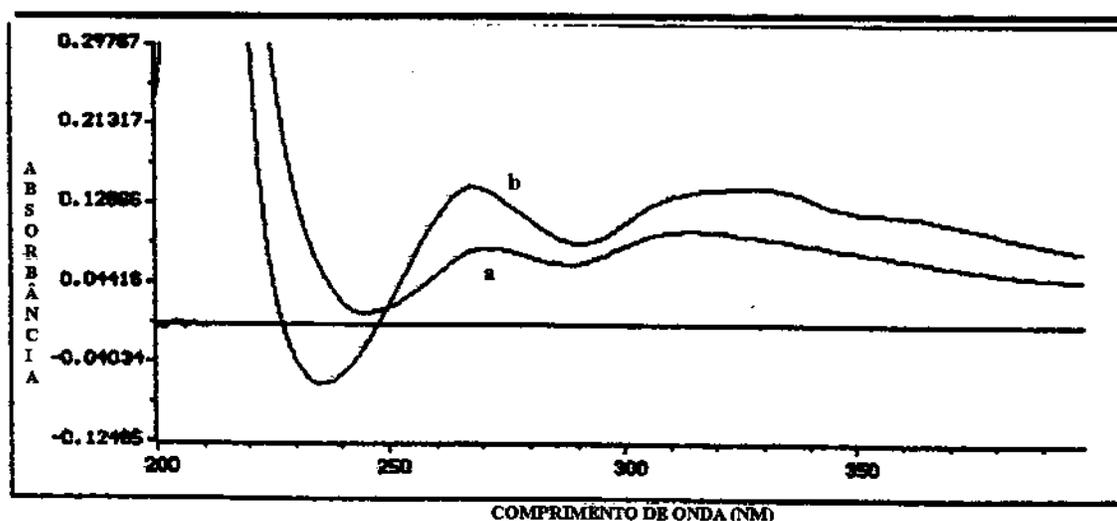


Figura 62. Espectro-UV diferencial do efluente ( $E_1$ ), tratado com o fungo *P. crinitus*, tempo de incubação 48 hs., a 25° C, sob agitação constante (150 rpm). a. efluente tratado com o fungo b. efluente sem tratamento.

#### 4.5.2. Estudos espectroscópicos - FTIR

Com o objetivo de se avaliar as possíveis modificações estruturais ocorridas durante a biodegradação de efluente, estágio E<sub>1</sub>, e da mesma maneira que para os estudos realizados com UV, diversas substâncias modelo foram caracterizadas utilizando-se espectros FTIR, cujas estruturas, ou estão relacionadas com as estruturas básicas formadoras de lignina, ou são estruturas supostamente presentes no efluente tipo E<sub>1</sub>. A Tabela 6 resume os principais dados obtidos.

O espectro FT-IR de amostras de efluente sem tratamento mostrou a presença de bandas de absorção intensas a 3426, 2924, 1631, 1370 cm<sup>-1</sup> e uma banda fraca, porém bem definida, a 837 cm<sup>-1</sup> (Figura 63). Além destas, apresentou uma banda larga, provavelmente como resultado da sobreposição de mais de uma banda, a 1065 cm<sup>-1</sup>. A banda de absorção a 1631 cm<sup>-1</sup> desaparece quando o efluente é tratado com borohidreto de sódio (Figura 66).

Aliquotas do efluente incubado com o fungo *T. villosa*, retiradas periodicamente, durante o processo de biodegradação; 24, 48 e 96 hs, respectivamente, exibiram espectros FT-IR como mostram as Figuras 64-66. A sequência dos espectros demonstrou que a banda a 1631 cm<sup>-1</sup>, presente no espectro da amostra de efluente sem tratamento, desapareceu surgindo uma banda mais intensa a 1635 cm<sup>-1</sup>, a 24 hs, 1646 cm<sup>-1</sup>, a 48 hs, 1653 cm<sup>-1</sup>, a 96 hs. A intensidade destas bandas também foi drasticamente afetada pela redução com borohidreto de sódio (Figura 67). Uma banda na região de 1325 cm<sup>-1</sup> tornou-se progressivamente mais pronunciada e melhor resolvida ao longo do período de incubação avaliado. A banda a 1370 cm<sup>-1</sup> desapareceu e uma banda larga a 1400-1410 cm<sup>-1</sup> tornou-se mais evidente. Na região de 800-900 cm<sup>-1</sup> algumas modificações parecem significativas, assim desapareceu a fraca banda a 837 cm<sup>-1</sup> e apareceram duas bandas a 867 e 818 cm<sup>-1</sup> durante as primeiras 24 hs, as quais desapareceram no período subsequente.

Para o fungo *P. crinitus*, qualitativamente o quadro foi similar, porém a proporção relativa entre as intensidades das bandas mostrou-se bastante diferente (Figura 65). Uma banda a 1635 cm<sup>-1</sup> foi bem evidente e não se alterou ao longo do período de incubação, sendo que a sua intensidade também foi drasticamente afetada pela redução com borohidreto de sódio (Figura 68). A banda larga a 1061 cm<sup>-1</sup> tornou-se bastante pronunciada e bem mais intensa do que a banda a 1635 cm<sup>-1</sup>. Também desapareceu a banda a 1370 cm<sup>-1</sup> e a região do espectro em torno de 1400-1410 cm<sup>-1</sup> mostrou-se mal resolvida.

Tabela 6. Características espectrais-IR de substâncias-padrões.

SUBSTÂNCIA	IR - FREQUÊNCIA (cm <sup>-1</sup> )				
	- OH/OMe	C = O	1600 - 1500	1500 - 1400	1400 →
FENOL	3337	-	1596	1484	1368-1218 813-886-752
GUAIACOL	3358 *2917	-	1646	1407	1043-1110 920-853
VANILINA	3151 2851	1674	1591 1513	1434	1285-1252 1154-1021 861-810-722
ÁCIDO VANÍLICO	3480	1677	1599-1583-1525		
			1577		1358-1299 1173-1022

ACETOVANILONA	3307	1662	1513	1446	850-672
3,4-DIHDROXI- BENZALDEÍDO	3273	1653	1595 1528	1441 1399	1284-1153 876-810 752-634
SERINGALDEÍDO	3250	1668	1604-1585-1512		
ANISALDEÍDO	(2832)	1690	1598 1510	1455 1430	1313-1259 1217-1160 1025-834
ÁLCOOL VERATRÍLICO	3403-2914 (2850)	-	1598 1512	1454 1415	1254-1145 1024-811 756
p-HIDROXI- ACETOFENONA	3185	1648	1590 1523	1440	1363-1292 1233-1161 960-830-776
2-CUMARANONA	3463 2985 2334	1794 1703 1608		1467	1219-1119 1053-954 884-759 673-550
ÁCIDO SALICÍLICO	3237-2949 2850	1655		1451	1296-1159 886-761-681
ÁCIDO MANDÉLICO	3402 2871	1716		1450	1378-1292 1229-1191 1063-938 887-730-688
ÁCIDO p-HIDROXI- CINÁMICO	3363	1679	1596-1507	1440	1377-1318 1217-976-927-829- 794 688-553-518
ÁCIDO CLOROACÉTICO	3131	1729		1415	1294-1193 933-809-637
ÁCIDO DICLOROACÉTICO	3159	1721		1408	1201-814-679-439
CATECHINA	3414 3252 2936 2854		1514	1474	1366 1322 1288 1236 1146 1114 1080 1022 982 964 828 804 786
TETRAHDROXI 1,4- QUINONA	3904 3854 3530	1624			1370 1300 1230-1008 886- 812 740 630 572
ÁCIDO 2,5-DIHDROXI- FENILACÉTICO	3490 2970 3326 3262 3040	1690	1512	1424 1400	1374 1310 1282 1252 1232 1162 1096 874 818 762 722 580

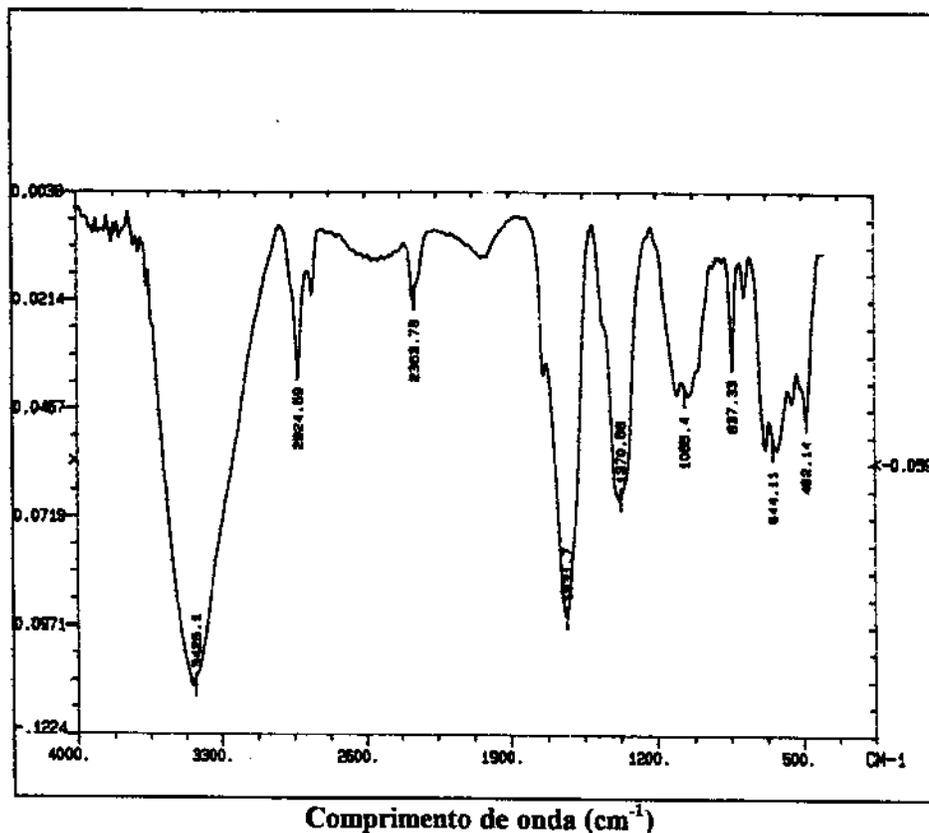


Figura 63. Espectro FTIR do efluente sem tratamento, obtido de amostra liofilizada e em pastilha de KBr. Os números indicados representam as frequências das bandas de absorção.

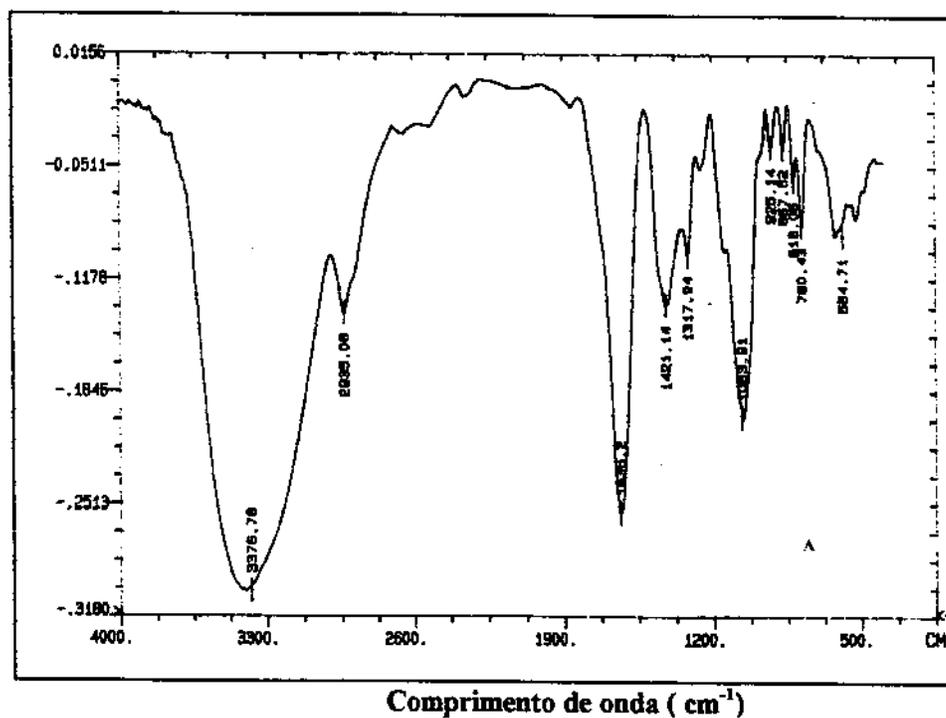


Figura 64. Espectro FTIR de efluente tratado, 24 hs, com o fungo *T. villosa*, obtido de amostra liofilizada e em pastilha de KBr. Os números indicados representam as frequências das bandas de absorção.

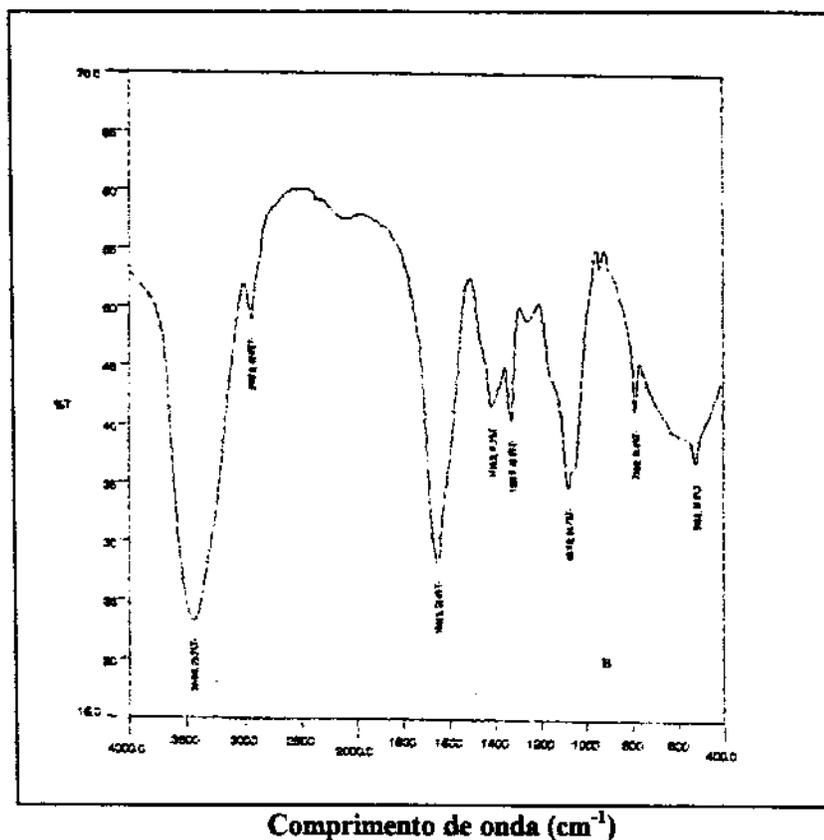


Figura 65. Espectro FTIR de efluente tratado, 48 hs, com o fungo *T. villosa*, obtido de amostra liofilizada e em pastilha de KBr. Os números indicados representam as frequências das bandas de absorção.

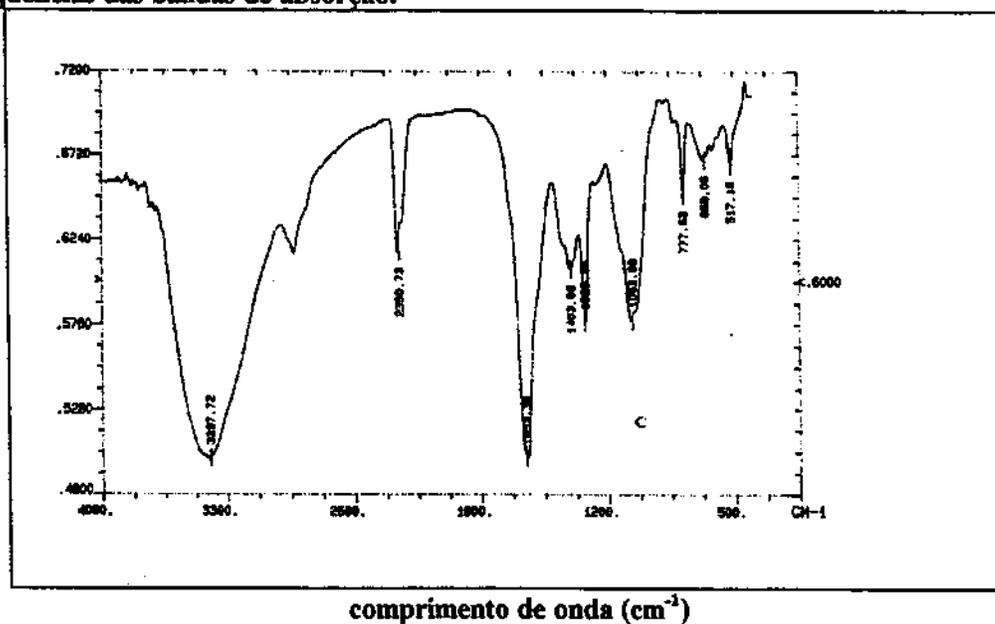


Figura 66. Espectro FTIR de efluente tratado, 96 hs, com o fungo *T. villosa*, obtido de amostra liofilizada e em pastilha de KBr. Os números indicados representam as

frequências das bandas de absorção.

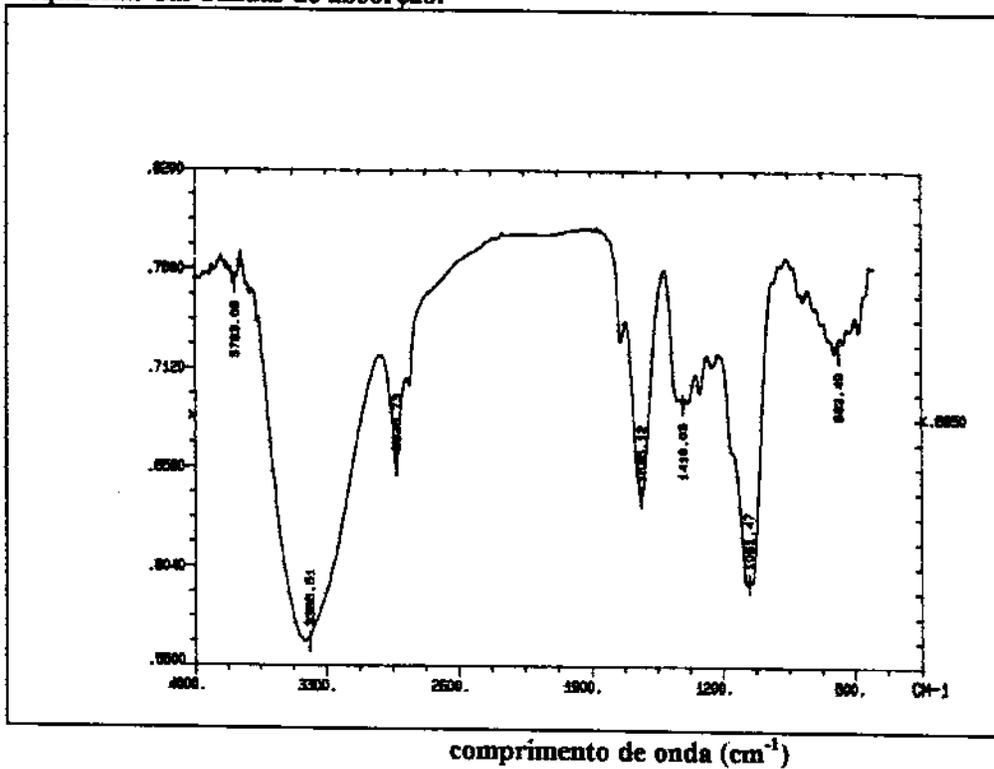


Figura 67. Espectro FTIR de efluente tratado com o fungo *Panus crinitus*, obtido de amostra liofilizada e em pastilha de KBr. Os números indicados representam as frequências das bandas de absorção.

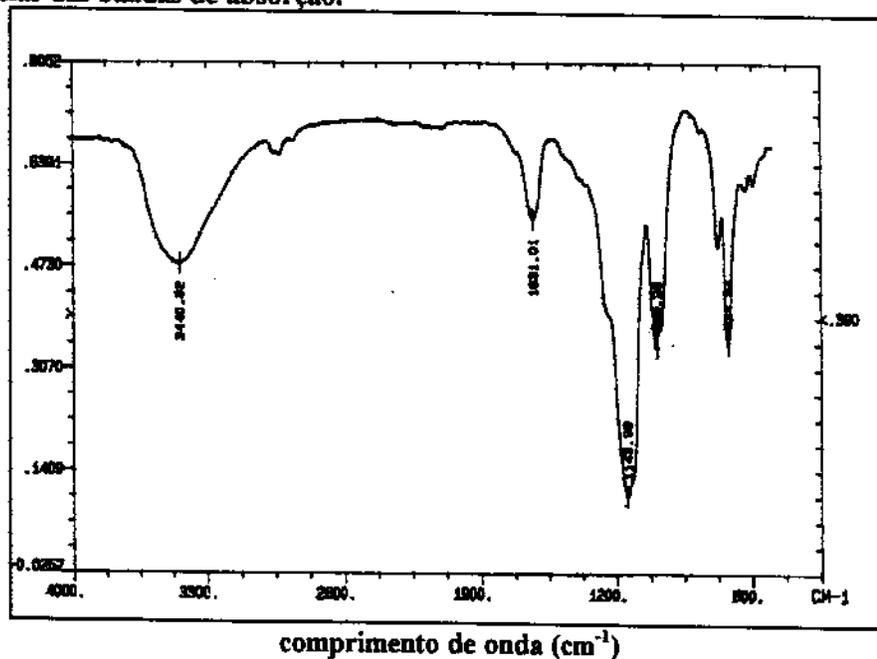


Figura 68. Espectro FTIR do efluente sem tratamento, após reação de redução com borohidreto de sódio, obtido de amostra liofilizada e em pastilha de KBr. Os números indicados representam as frequências das bandas de absorção.

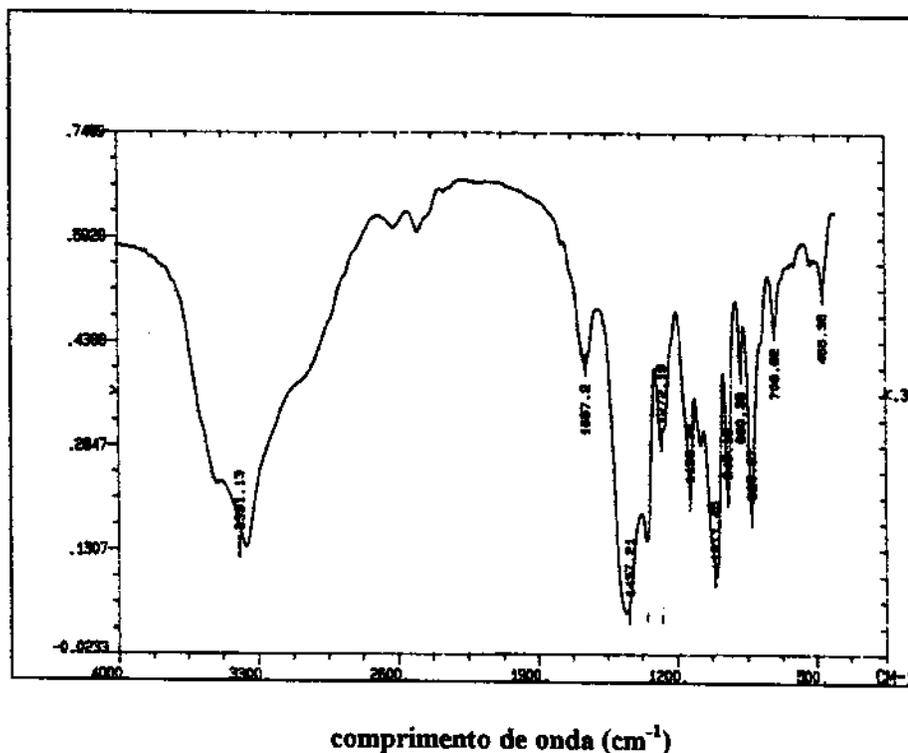


Figura 69. Espectro FTIR de efluente tratado com o fungo *T. villosa*, após reação de redução com borohidreto de sódio, obtido de amostra liofilizada e em pastilha de KBr. Os números indicados representam as frequências das bandas de absorção.

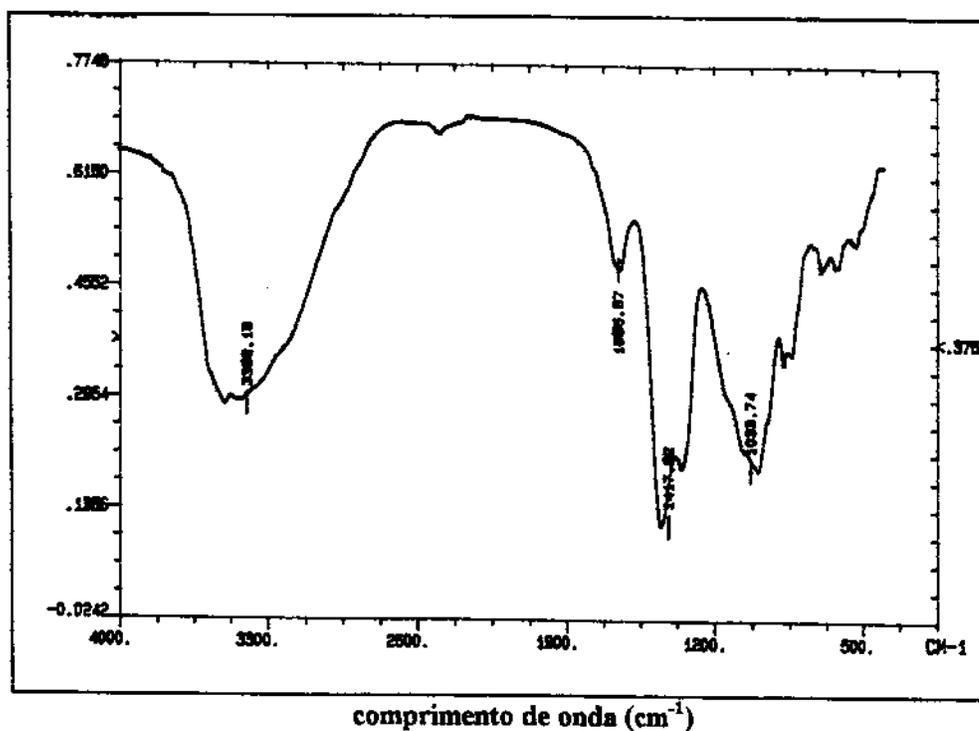


Figura 70. Espectro FTIR de efluente tratado com o fungo *Panus crinitus*, após reação de redução com borohidreto de sódio, obtido de amostra liofilizada e em pastilha de KBr. Os números indicados representam as frequências das bandas de absorção.

#### 4. 6. Análise de produtos da biodegradação de efluentes

As análises das amostras de efluentes, tratados e não tratados, foram realizadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), utilizando-se uma coluna de fase reversa tipo  $\mu$ -Bondapak C-18 e monitorada a 280 nm, com um detector de UV. As amostras de efluente foram centrifugadas e filtradas em membranas de 0,45  $\mu$ , antes das análises. A análise por cromatografia de exclusão revelou que as amostras, nestas condições, continham basicamente substâncias de baixa massa molecular.

Não foram calculadas as concentrações absolutas dos componentes do efluente, sendo que todos os valores expressos aqui, são relativos ou baseados nos valores de área de cada pico, obtidos nos cromatogramas, sem qualquer fator de correção.

Na tentativa de identificar os componentes do efluente, diversas padrões foram avaliados quanto ao tempo de retenção sendo que os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7. Tempo de retenção dos padrões avaliados por HPLC de fase reversa.

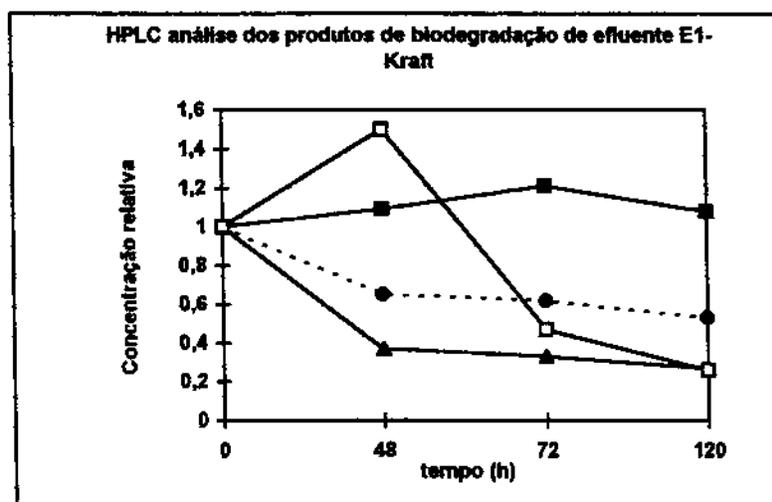
nome do padrão	tempo de retenção (minutos)
ácido salicílico	2,04
ácido cloroacético	2,18
ácido oxálico	2,30
ácido mandélico	2,38
ácido dicloroacético	2,40
2,5-dihidroxifenilacético	2,48
ácido tricloroacético	2,50
ácido p-hidroxicinâmico	3,08
3,4-dihidroxibenzaldeído	3,60
ácido benzóico	3,91
3,4-dimetoxibenzilálcool	3,97
4-hidroxiacetofenona	4,34
acetovanilona	4,35
vanilina	4,48
fenol	4,70
3,4-dimetoxibezaldeído	4,83
3,4-dimetilfenilacetona	5,14
guaiacol	5,30
acetofenona	6,00
tolualdeído	6,60
anizaldeído	6,71
eugenol	6,87
3,5-diclorobenzaldeído	7,27

A análise cromatográfica das amostras de efluente demonstrou que 4 substâncias responderam por aproximadamente 99% da composição, em área, do efluente total, sendo que destas, duas foram quantitativamente mais importantes, as quais apresentaram tempos de retenção de 2,3 e 1,9 minutos, respectivamente. Várias outras substâncias foram detectadas no efluente, porém representam uma fração minoritária, como mostra a Tabela 8.

As variações das concentrações destas substâncias durante o período de incubação são descritas pela Figura 51. As análises das amostras de efluentes tratados com o fungo *T. villosa*, realizadas ao longo do período de incubação, demonstraram que a substância com tempo de retenção de 2,3 minutos foi o principal substrato para o fungo, sendo que a sua concentração decresceu 73 % durante o período de 4 dias de incubação (Figura 51). Por outro lado, a substância com tempo de retenção de 1,9 minutos não foi degradada pelo fungo, desde que sua concentração não variou durante o mesmo período. Este resultado confirma os obtidos por cromatografia de exclusão, que mostraram a presença de frações recalcitrantes no efluente.

A área total, correspondente a soma das áreas individuais dos componentes do efluente, obtidas no cromatograma pela medida da absorção a 280 nm., decresceu 47 % no período de 4 dias (Figura 51).

A substância de tempo de retenção de 3,9 min. foi produzida durante o período de incubação do efluente com o fungo, sendo que sua concentração atingiu um máximo no período de 48 hs, para em seguida decrescer. Esta substância apresentou um tempo de retenção correspondente a álcool veratrílico, como demonstra a Tabela 6 e sua porcentagem em área, na mistura total, representou de 0,2 a 0,5 %, como mostra a Tabela 8.



**Figura 51.** Variação da concentração relativa das substâncias de baixo peso molecular contidas no efluente durante o processo de biodegradação. Todos os valores de concentração foram normalizados em relação aos seus respectivos valores na amostra de efluente não tratado, o qual foi arbitrariamente fixado em 1,0. - ■ -  $rt = 1,9$  ; - ▲ -  $rt = 2,3$  ; - ● - área total ; - □ -  $rt = 3,9$   $rt =$  tempo de retenção da substância ( Tabela 8).

Amostras de efluente, com e sem tratamento, também foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa. também neste caso, foi avaliada a composição das amostras de efluente, relativamente a substâncias de baixo peso molecular, dada a limitação desta técnica para o estudo de substâncias com massas moleculares mais altas. A substância de tempo de retenção de 1,9 min. foi identificada por CG-MS, como sendo ácido pimárico (123), uma resina ácida, e a de tempo de retenção de 3,9 min., como sendo álcool veratrílico.

**Tabela 8.** Distribuição do conteúdo relativo de cada substância contida nas amostras de efluente E, durante o processo de biodegradação, analisada por HPLC de fase reversa, usando detetor UV a 280 nm, calculado pela relação área individual/área total do cromatograma.

Substância (tempo de retenção, min)	Tempo de incubação (dia)			
	0 (EF)	2	3	5
	área relativa (%)			
1,6	0,06	10,14	6,19	7,00
1,9	27,34	45,55	53,09	55,43
2,3	72,00	41,10	39,02	36,56
3,9	0,19	0,45	0,14	0,09
4,7	0,19	-	-	-
8,2	-	-	0,27	-
8,6	-	-	0,19	-
8,9	-	-	0,13	-
9,3	-	-	0,25	-
10,8	0,02	0,15	-	0,28
14,52	-	0,12	-	-

## 5. DISCUSSÃO

### 5. 1. Processo de descoloração e remoção de fenóis totais.

Os resultados obtidos demonstraram que, dentre todos os fungos avaliados, os fungos *Trametes villosa* e *Panus crinitus* foram os mais eficientes com relação a descoloração do efluente tipo E<sub>1</sub>, da fase de branqueamento de polpas tipo Kraft. O fungo *T. villosa* promoveu a redução de 70-80 % da cor inicial do efluente em um período de 48 hs de incubação e concomitantemente reduziu a concentração de fenóis totais em 75 %. Por outro lado, o fungo *P. crinitus* exibiu taxas de descoloração de 55-65 % no período de 72 hs e também reduziu a quantidade de fenóis totais em 65 %, no mesmo período. Portanto, com relação as taxas de descoloração e redução de fenóis totais, os comportamentos dos fungos foram semelhantes, com a diferença de que para o fungo *T. villosa* tais processos foram mais rápidos.

As primeiras indicações de que os dois fungos possuem comportamentos diferenciados, com relação ao mecanismo de biodegradação dos componentes do efluente, vêm da análise comparativa do perfil da curva de desaparecimento de fenóis obtida para cada fungo (Figuras 22 e 26).

Para o fungo *T. villosa*, a comparação entre as respectivas curvas de degradação de fenóis totais, métodos de Folin e 4-AAP, revelou diferenças entre os perfis das mesmas, sendo que a curva obtida para o método de 4-AAP demonstrou um desaparecimento mais rápido e intenso do que a curva obtida para o método de Folin. Tal resultado, a princípio, parece ser indicativo de uma certa seletividade com relação à estrutura fenólica a ser degradada pelo fungo. Comportamento diferente foi observado para o fungo *P. crinitus*, cujos perfis das referidas curvas foram semelhantes, descontada a diferença entre os valores obtidos em cada método.

A suposição de que os resultados revelam mecanismos diferentes para os fungos é baseada nas diferenças de seletividade dos métodos de Folin e 4-AAP. Diversos estudos demonstraram que 4-AAP promove um ataque eletrofílico sobre a posição *para* de estruturas fenólicas oxidadas (60,180). Assim sendo, qualquer grupamento presente nesta posição pode alterar ou bloquear o acoplamento de 4-AAP com o anel aromático. Estruturas fenólicas contendo apenas um carbono na posição *para* ao grupamento hidroxílico, reagem com 4-AAP para produzir estruturas de quinoneimina que absorvem caracteristicamente no intervalo de 500-525 nm (60). Estruturas fenólicas com grupamentos *p*-alquil ou outros com mais de um carbono, também reagem, porém com baixa reatividade, gerando produtos amarelos que não são portanto detectados a 505 nm. Nenhuma reação é observada para 2,4,6-trialquil fenóis (60). Portanto, conclui-se destes dados que, sob as condições de análise empregadas (como descrito em Materiais e Métodos), estruturas fenólicas contendo um carbono na posição *para* foram preferencialmente determinadas pelo método de 4-AAP. Já o reagente de Folin apresenta boa reatividade dentro de uma larga faixa de estruturas fenólicas, inclusive poliméricas (7). Desta maneira, os resultados obtidos para o fungo *T. villosa* parecem indicar que um tipo de estrutura fenólica foi preferencialmente ou mais rapidamente degradado do que outro, contrastando com o fungo *P. crinitus* cujo efeito seletivo, se existir, é pouco pronunciado. Tais resultados foram também confirmados pelos estudos espectroscópicos, UV e FTIR, como será discutido adiante.

Um outro aspecto interessante destes resultados foi evidenciado, para ambos os fungos, pela comparação entre as curvas de descoloração e às de desaparecimento de fenóis totais, especialmente a obtida pelo método de Folin. O processo de descoloração foi mais rápido e intenso do que a remoção de fenóis totais, o que parece

indicar que o processo de descoloração pode não ter sido decorrente apenas da despolimerização das frações de mais alta massa molecular contidas no efluente, mas, em adição, ter sido resultante também de modificações químicas nos grupos cromóforos, ainda na forma polimérica. Evidências nesta direção também foram obtidas para a degradação de lignina na madeira (93) e a degradação de efluentes pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* (160).

É fato bem conhecido que a ação de fungos basidiomicetos degradadores de madeira sobre seus substratos naturais, requer entre outros fatores, valores de pH do meio entre neutro e ácido (18,74,93,245,171). No entanto, para a biodegradação do efluente pelo fungo *T. villosa*, o fator pH não apresentou um efeito drástico na eficiência de descoloração para ambos os fungos, uma vez que taxas relativamente altas de descoloração foram obtidas ao longo de todo o intervalo de pH de 3,5-9,5, embora diferentes valores tenham sido obtidos em cada pH (Figura 23). Para ambos os fungos, este comportamento provavelmente foi decorrente do abaixamento de pH promovido pelos fungos, sendo que neste aspecto o fungo *T. villosa* foi muito mais rápido e eficiente do que o fungo *P. crinitus*. A produção de ácido oxálico foi constatada, embora não tenha sido quantitativamente caracterizada. Por outro lado, deve aqui ser destacado, que a relação entre produção de ácido oxálico e abaixamento de pH não tem sido demonstrada para outros fungos (45), na maior parte dos casos.

A análise das curvas de titulação potenciométrica obtidas para os efluentes, tratados e não tratados, proporcionou algumas informações adicionais importantes. Efluentes não tratados com os fungos exibiram dois tipos de grupamentos ionizáveis, com valores de pK em torno de 7,0-8,0 e 2-3 respectivamente. Das possíveis estruturas químicas existentes neste tipo de efluente, grupamentos hidroxílicos fenólicos certamente constituem a maior fração dos grupamentos com valor de pK neste intervalo (58,67). Como resultado da ação do fungo *T. villosa*, ocorre o desaparecimento deste tipo de grupamento, concomitantemente com a formação de grupamentos com valor de pK em torno de 3,0. Este resultado parece indicar que a formação de grupamentos carboxílicos, como resultado da oxidação de certos grupamentos químicos, previamente existentes no efluente, pode ser um processo importante. O desaparecimento de estruturas fenólicas é concordante com os resultados obtidos usando-se métodos químicos, já discutidos neste texto.

Em nenhum período do processo de biodegradação foi observada a formação de precipitado. Em complementação, os micélios dos fungos *T. villosa* e *P. crinitus* não apresentaram, após períodos prolongados de incubação, uma coloração escura, que indicasse adsorção de material proveniente do efluente. Tais resultados indicam que a descoloração foi realmente resultante de um processo degradativo promovido pelos fungos. Esta afirmação é ainda ratificada pelas seguintes observações: i) a concentração de fenóis decresceu ao longo do período de incubação, mostrando efeitos diferenciados para os dois fungos, tal efeito não seria observado se adsorção fosse o processo predominante; ii) micélios de fungos com 60 dias de cultivo mostraram-se inativos com relação a descoloração e adsorção de componentes coloridos do efluente, como demonstraram os dados da Tabela 3; iii) os resultados obtidos no estudo da biodegradação por técnicas como UV, FTIR e HPLC evidenciaram comportamentos que também não seriam explicados por fenômenos de adsorção.

## 5.2. Estudo da distribuição de massas moleculares (MM)

Embora com relação a biodegradação de lignina *in vivo* e *in vitro* exista uma quantidade enorme de informações disponíveis, pouco é conhecido com relação aos mecanismos de degradação de efluentes industriais contendo substâncias provenientes da utilização industrial da madeira e particularmente derivadas de lignina. Tanto do ponto de vista ambiental quanto biotecnológico é importante compreender-se os mecanismos de biodegradação dos componentes de efluentes tipo E<sub>1</sub>.

Alguns trabalhos demonstraram que em torno de 75 % da cor dos efluentes E<sub>1</sub> origina-se dos componentes de alta-massa molecular (MM > 1000 Da) contidos no mesmo e que esta fração é percentualmente preponderante sobre as demais (85,102). No presente estudo, as amostras de efluentes analisadas também demonstraram as mesmas características, desde que, neste caso, a soma das frações de média-MM e alta-MM constituem 98 % dos componentes do efluente, como mostra a Tabela 3.

Os resultados discutidos anteriormente, abordando a redução de fenóis totais e a redução de cor, sugeriram a possibilidade de que o processo de descoloração pudesse envolver modificações químicas nas estruturas de mais alta massa-MM, antes que estas fossem intensamente despolimerizadas. Neste contexto tornou-se interessante não só avaliar a distribuição da massas moleculares ao longo do processo de biodegradação, como também tentar visualizar possíveis modificações químicas em cada uma das frações. Tais modificações poderiam ser detectadas pela modificação das características espectrais das mesmas, na região do UV. Com este objetivo, as curvas de distribuição de massas moleculares foram concomitantemente monitoradas a diferentes comprimentos de onda; sendo eles 210 e 280 nm.

Neste caso, diferenças significativas foram observadas entre os perfis das curvas obtidas a 210 nm e 280 nm, tanto para amostra de efluente não tratado (Figura 46), quanto para amostra de efluente após tratamento com o fungo (Figuras 47 e 48), porém, especialmente para efluentes tratados, esta diferença foi bem mais evidente. A principal diferença observada foi com relação à presença de estruturas de baixa massa molecular, como será discutido adiante.

A análise da distribuição de massas moleculares dos componentes do efluente, durante o período de incubação com os fungos, mostrou a intensa degradação do material orgânico contido no efluente, indicada pelo acentuado decréscimo da área total obtida nos cromatogramas, medida como absorbância total a 280 nm (Figura 50). Por outro lado, a absorbância total a 210 nm não diminuiu na mesma intensidade. Tal resultado, a princípio, poderia sugerir que o processo de biodegradação não promoveu a destruição dos cromóforos que absorvem na região do UV, mas que apenas modificou quimicamente as estruturas em avaliação, o que teria provocado o deslocamento da absorção de 280 nm para outro intervalo de comprimento de onda. Porém, neste caso, este fato é apenas parcialmente verdadeiro. Como indicado na Tabela 3, a fração de baixa-MM contida no efluente sem tratamento, possui uma relação de  $A_{210}/A_{280}$  ( $A_1/A_2$ ) igual a 24,22, muito superior as demais frações, de alta e média-MM, que apresentaram valores de 0,09 e 0,90, respectivamente. Este resultado indica que a fração de baixa-MM possui uma absorvidade a 210 nm acentuadamente maior que à 280 nm. Portanto, se estas espécies de baixa-MM são geradas durante o processo de biodegradação, a redução da absorbância a 210 nm não deveria ocorrer na mesma proporção que a redução geral de material orgânico no efluente, monitorada a 280 nm. Em outras palavras, a redução de absorbância a 210 nm não reflete exatamente a redução da concentração total dos componentes do efluente, como observado para o comprimento de onda de 280 nm, desde que durante a biodegradação espécies com alta absorvidade a 210 nm são produzidas. Por outro lado, se levarmos em consideração que as frações de alta-MM, contrariamente às de

baixa-MM, absorvem preferencialmente a 280 nm do que a 210 nm, a redução de absorbância a 280 nm pode ser mais indicativa da degradação de estruturas poliméricas do que outros comprimentos de onda. Estas considerações são consubstanciadas pelo fato de que efluentes tipo E<sub>1</sub> reconhecidamente contém altas concentrações de derivados de lignina, cuja absorvidade alta a 280 nm é uma das características espectrais bem estabelecidas (2,11,64).

As variações observadas nas curvas de distribuição de massas moleculares durante o processo de biodegradação para ambos os fungos demonstrou que estes foram capazes de degradar todas as diferentes frações, de diferentes massas moleculares. Porém, parece evidente que existiu uma certa seletividade nesta degradação, evidenciada pela cinética de redução das áreas de cada fração, como mostram as Figuras 47,48 e 51. Para o fungo *T. villosa*, a fração de média-MM não apresentou o mesmo comportamento que as demais frações, particularmente nas primeiras 48 hs de incubação, período no qual a sua degradação foi lenta, contrastando com a degradação das frações de baixa-MM. Na fase subsequente ocorreu intensa despolimerização desta fração. Tal efeito foi mais pronunciado para *T. villosa* do que para *P. crinitus*.

Os dados das Tabelas 3 e 4, relativos ao percentual que cada fração representa no efluente total, são bastante elucidativos na demonstração das diferenças de comportamento de cada fração. Assim por exemplo, mostram que durante o processo de biodegradação, para ambos os fungos, o conteúdo relativo da fração de média-MM aumentou durante as primeiras 48 hs. Se levarmos em consideração que ao longo do mesmo período, houve uma degradação geral dos componentes do efluente, indicada pela redução da absorbância total a 280 nm e também pela redução da concentração de fenóis totais (incluindo derivados de lignina), o aumento de percentual observado significa que esta fração foi mais lentamente degradada do que as demais, confirmando as observações anteriores. As frações de alta e média-MM exibiram uma tendência mais clara na variação dos seus valores de conteúdo relativo, sendo que particularmente a fração de alta-MM, após uma variação drástica nas primeiras 24 hs, não apresentou grandes variações posteriores. No entanto, o conteúdo relativo da fração de baixa-MM molecular apresentou claras oscilações, diminuindo e aumentando, comportamento este que indica a sua formação e subsequente degradação durante o período de incubação com o fungo.

A remoção ou desaparecimento das frações de baixa-MM pela ação dos fungos pode ser decorrente tanto da oxidação completa das mesmas, como também resultante de um processo de polimerização, sendo que neste caso, deveria ser acompanhada do aparecimento de frações de mais alta-MM. Neste sentido, ambos os fungos apresentaram capacidade de polimerização, especialmente nas primeiras 48 hs. Este efeito não só foi mais pronunciado para o fungo *P. crinitus*, mas também, ocorreu em intervalos de tempo diferentes, comparativamente ao fungo *T. villosa* (Figuras 48 e 51). Este resultado parece indicar que a capacidade de polimerização/despolimerização depende das condições do meio, num determinado instante, reforçando a idéia de que tais processos são deorrentes da ação de enzimas tipo fenoloxidasas, as quais geram espécies intermediárias extremamente reativas, que podem reagir por vias não enzimáticas (70,93).

Embora reações indesejáveis de polimerização tenham ocorrido, o processo preferencial foi a degradação das estruturas de mais alta-MM, como claramente evidenciado pela curva de distribuição de massas moleculares no período de 72 h, onde pode ser observado a diminuição das áreas de todas as frações.

Um outro aspecto importante do comportamento individual das várias frações pôde ainda ser avaliado pelos dados da Tabela 3, especialmente os valores de  $A_1/A_2$ , os quais indicaram a ocorrência de modificações químicas importantes nos componentes do efluente, ao longo do período de incubação. Como já mencionado, a relação  $A_1/A_2$  reflete a relação entre as absorvidades molares da amostra do efluente a 210 nm e 280 nm, respectivamente.

A fração de alta-MM, exibiu valores de  $A_1/A_2$  menores do que 1, tanto para amostras de efluente não tratados, quanto para os efluentes tratados com o fungo *T. villosa*, indicando uma absorvidade a 280 nm muito superior do que a 210 nm. Apresentou o valor de 0,09 de  $A_1/A_2$  para o efluente sem tratamento, o qual foi alterado para 0,72 após 24 h de incubação com o fungo. Tal alteração indica que os grupamentos inicialmente existentes nesta fração, responsáveis pela sua maior absorvidade a 280 nm, foram modificados de tal maneira que esta absorvidade foi deslocada para comprimentos de onda menores. Durante o restante do período, as alterações não foram tão drásticas, porém foram significativas, indicando um aumento transitório de absorvidade a 280 nm, no período de 48 hs, seguido por um novo decréscimo. Tais variações parecem estar correlacionadas com a despolimerização desta fração.

A fração de média-MM coerentemente com todas as argumentações realizadas até aqui, não apresentou modificações na mesma proporção que a fração de alta-MM, no período inicial do processo, além do que demonstrou aumento de absorvidade a 280 nm, indicado pelo decréscimo dos valores de  $A_1/A_2$ . Por outro lado, a fração de baixa-MM apresentou características bem distintas das demais frações, como pode ser observado pelo seus valores de  $A_1/A_2$ . Mesmo para o efluente sem tratamento, é evidente que esta fração possui absorvidade a 210 nm muito superior que a 280 nm, diferentemente das demais. Em complementação, a ação do fungo acentua esta característica, provocando a alteração do valor de  $A_1/A_2$  de 24,22 para 152,72 e 98,90, respectivamente a 24 e 48 hs. As oscilações acentuadas destes valores, certamente são um indicativo da complexidade e heterogeneidade da composição química da fração de baixa-MM e de suas alterações ao longo do processo de biodegradação. Como será discutido na seção relativa à alterações espectroscópicas, esta fração deve ser constituída preferencialmente por derivados ácidos produzidos pela clivagem de estruturas aromáticas poliméricas.

Analisados de maneira integrada, os resultados indicaram claramente que as modificações químicas ocorridas na fração de mais alta-MM, na fase inicial do período de incubação, foram as grandes responsáveis pela redução de absorbância a 280 nm observadas para as amostras de efluentes tratadas com o fungo *T. villosa*. Por outro lado, parecem ter confirmado também, a suposição de que o processo de descoloração envolveu modificações químicas nas estruturas de alta e média-MM, antes que estas fossem despolimerizadas. Em complementação, também evidenciaram que o fungo *T. villosa* apresentou um comportamento diferente do apresentado pelo fungo *P. crinitus*, demonstrando que para este fungo o processo de degradação apresentou fases distintas ao longo do período de incubação, diferenciando as primeiras 48 hs do período restante.

### 5.3. Atividade enzimática extracelular durante o processo de biodegradação.

É fato bem estabelecido que a ação de fungos basidiomicetos sobre os seus diferentes substratos naturais é decorrente da produção de enzimas extracelulares, tanto hidrolíticas quanto oxidativas, as quais promovem a degradação dos mesmos

(107). No caso de fungos degradadores de madeira, o grupo de enzimas oxidativas constituído por lignina peroxidase, Mn-peroxidase, lacase e peroxidases genéricas, tem sido apontado como o grande responsável pela sua ação degradadora (47,74,93). Também com relação a degradação de outros tipos de material, como por exemplo os componentes de efluente de indústrias de papel e celulose e xenobióticos, o mesmo enfoque tem sido dado (12,14,44,137). Porém, particularmente com relação a efluentes, a composição enzimática necessária para a sua biodegradação não é bem estabelecida, uma vez que existem evidências para a atuação de Mn-peroxidase, assim como também para a sua não participação (10,115).

Uma das abordagens utilizadas para se avaliar o papel de cada enzima nestes processos de degradação é a tentativa, nem sempre fácil, de correlacionar o nível de atividade enzimática extracelular com os efeitos degradativos observados no material em estudo. Neste contexto, no presente estudo, foram avaliadas as atividades das enzimas lignina peroxidase, Mn-peroxidase, lacase,  $\beta$ -glicosidase e peroxidases totais, bem como a produção de proteínas totais, medidas no efluente incubado com os fungos. Realizou-se um estudo comparativo entre três fungos com características diferentes com relação a capacidade de descoloração do efluente, sendo eles; *T. villosa*, *P. crinitus* e *Phellinus flavomarginatus*. As características dos dois primeiros já foram discutidas e o fungo *P. flavomarginatus* não foi capaz de reduzir a cor do efluente.

Para ambos os fungos, *T. villosa* e *P. crinitus*, a principal enzima produzida, em termos quantitativos, foi lacase, seguida por lignina peroxidase e  $\beta$ -glicosidase.

Para o fungo *T. villosa* a obtenção de níveis máximos de atividade enzimática ocorreu em torno de 30-48 hs, para em seguida decair. Como o nível de atividade enzimática decaiu para praticamente todas as enzimas e a concentração de proteínas totais, produzidas no mesmo período, não diminui na mesma proporção, é possível que a redução de atividade enzimática tenha sido decorrente da atividade proteolítica, a qual também deve ter sido produzida pelo fungo (66).

Por outro lado, um possível efeito regulatório envolvendo certos intermediários do processo de biodegradação, não pode ser descartado. Tem sido demonstrado para outros fungos que metabólitos estruturalmente relacionados com lignina podem estimular ou inibir a atividade enzimática ligninolítica (114,116,133). Neste contexto, a presença de álcool veratrílico (3,4-dimetoxibenzil álcool) como um intermediário no processo de degradação pode ser significativo. A produção de álcool veratrílico foi caracterizada por HPLC, sendo que a sua concentração variou durante o tempo de incubação, atingindo um valor máximo no período de 48 hs (Figura 69), coincidentemente com o máximo de atividade enzimática produzida pelo fungo. Esta substância pode ser sintetizada por vários fungos, a partir de fenilalanina, e seu aparecimento nas culturas coincide ou tem íntima relação com a atividade ligninolítica (49,93). O papel desempenhado por este metabólito não é bem entendido, embora um grande número de trabalhos abordando este assunto possa ser encontrado na literatura. Tem sido demonstrado que, além de ser substrato para lignina peroxidase (93,165), álcool veratrílico é capaz de induzir a produção de enzimas ligninolíticas, em especial a própria lignina peroxidase. Particularmente para o fungo *Phlebia radiata*, a presença de álcool veratrílico estimulou a produção de lacase (142). Porém, uma das funções mais importantes atribuídas a este metabólito é a de mediador da ação de lignina peroxidase (1,73,93,136,151). Por esta hipótese, a enzima catalisaria a formação do respectivo cation radical de álcool veratrílico, o qual poderia atuar como um agente transferidor de elétrons para outras estruturas (como descrito no mecanismo abaixo, figura 72) distantes do sitio ativo da enzima e/ou não acessíveis a este. Neste sentido,

estudos com lignina sintética demonstraram que a presença de álcool veratrílico foi essencial para que ocorresse a despolimerização da mesma (71).

Um outro efeito importante, que tem sido relatado e que poderia ter alguma relação com o presente caso, é a inativação da atividade enzimática por  $H_2O_2$ , gerado durante o próprio processo de biodegradação, bem como o radical  $OH\cdot$  e superóxido ânion radical, também possíveis de serem produzidos a partir de  $H_2O_2$  (1,151,167) (Figura 72, nesta seção). Por outro lado, um dos papéis também atribuídos a álcool veratrílico é exatamente o de proteger a enzima lignina peroxidase da inativação por  $H_2O_2$  (74,90,93,167,176). Adicionalmente, embora os dados não sejam conclusivos, algumas avaliações preliminares do teor de  $H_2O_2$  no meio de reação foram realizadas, as quais demonstraram que, se presente, este peróxido deve existir em concentrações menores que  $10^{-7}$  M.

Comportamento diferente foi observado para o fungo *P. crinitus*, o qual, embora mais lento para atingir níveis mais elevados de atividade enzimática, manteve os mesmos, particularmente o de lacase, por um tempo mais prolongado. Portanto, as considerações anteriores realizadas para o fungo *T. villosa* parecem não ser oportunas neste caso. Por outro lado, se levarmos em consideração que os dois fungos responderam diferentemente, com relação ao efeito indutivo no nível das enzimas, promovido pelo próprio efluente, conforme demonstraram os resultados da seção 3.3., as diferenças de comportamento observadas entre os fungos podem, em parte, ser decorrentes de diferenças na regulação da produção das enzimas.

Em que pese as considerações feitas acima, os sistemas enzimáticos dos dois fungos, pelo menos quanto às enzimas avaliadas, mostraram ainda assim, razoável semelhança, com as diferenças ficando mais a nível quantitativo. Neste aspecto, há que se destacar o fato de que a relação de atividade enzimática de LiP/lacase é maior para o fungo *P. crinitus* do que para *T. villosa*, bem como o nível de atividade de peroxidases totais. Em contrapartida, o nível de atividade de beta-glicosidase foi substancialmente maior para *T. villosa*, nas primeiras 48 hs.

A análise pormenorizada da variação de atividade enzimática com o tempo e sua correlação com alguns eventos observados para o fungo *T. villosa* tem se mostrado mais elucidativa da importância relativa de cada enzima, do que propriamente a comparação entre os níveis de atividade enzimática dos dois fungos.

Para o fungo *T. villosa*, o maior percentual de redução de cor ocorreu nas primeiras 48 hs, especialmente entre 24 e 48 hs. Por outro lado, como evidenciado pelos resultados obtidos na distribuição de massas moleculares, foi visível para este fungo a diferença de comportamento neste período e a fase subsequente, a partir da qual ocorreu intensa despolimerização da fração de média massa molecular. Adicionalmente, os estudos espectroscópicos demonstraram que houve fases críticas em termos das variações espectrais observadas, sendo que a formação de um grupamento carbonílico intermediário, monitorada a 310 nm (espectro diferencial), atingiu seu ponto máximo no período de 48 hs e em seguida diminuiu acentuadamente, indicando a estabilização das modificações. Todos estes eventos foram correlacionados com a variação nos níveis de atividade enzimática, especialmente o de lacase.

Ainda dentro deste mesmo contexto, se considerarmos que o pH inicial do efluente variou de 9,5 para 6,12 no período de 24 h, como demonstra a Tabela 2, e que neste intervalo foi observada a maior taxa de redução de cor, o envolvimento de lacase no processo de descoloração nos parece evidente. Por outro lado, o fato de que a atividade de MnP não foi detectada para os fungos *T. villosa* e *P. crinitus*, associado aos resultados obtidos para o fungo *P. flavomarginatus*, o qual produziu um nível considerável desta enzima, porém não foi capaz de descolorir o efluente, parece indicar

que a atividade desta enzima não foi essencial para a descoloração do efluente, para ambos os fungos em estudo. Estas conclusões são corroboradas pelos dados relatados na literatura de que MnP e LiP não possuem boa atividade enzimática em intervalos de pH superior a 5,0 (74,93), embora peroxidases (genéricas) possuam esta habilidade.

A princípio, tais conclusões parecem não se encaixar perfeitamente no quadro geral descrito para a atividade de lacase, desde que a capacidade de polimerização desta enzima tem sido relatada como sendo preferencial (20,74,93,164). Adicionalmente, alguns autores têm demonstrado que para o fungo *Phanerochaete chrysosporium* a enzima MnP parece ser a responsável pela descoloração de efluentes da fase de branqueamento de polpas Kraft (82,115). Porém, em contrapartida, estudos com o fungo *Trametes versicolor*, cujo perfil de atividades enzimáticas extracelulares é similar ao fungo *T. villosa*, desde que os dois não produzem MnP e preferencialmente produzem lacase, demonstraram que MnP não foi essencial para a descoloração do mesmo tipo de efluente (10,108), embora, neste caso, a correlação da biodegradação do efluente com lacase não tenha sido claramente estabelecida.

Estudos (75) com lacase isolada de *Trametes hirsuta* demonstraram que a despolimerização/polimerização de vários tipos de ligninas, inclusive lignina Kraft e ligninosulfonato de processos de polpação de pinus, foi dependente da concentração da enzima, sendo que concentrações baixas favoreceram a despolimerização. Tais resultados sugerem efeitos semelhantes no presente estudo, desde que, nas condições avaliadas para o efluente, a concentração de lacase, produzida pelos fungos, *T. villosa* e *P. crinitus*, variou ao longo do período de incubação, assim como também a capacidade polimerizante/despolimerizante.

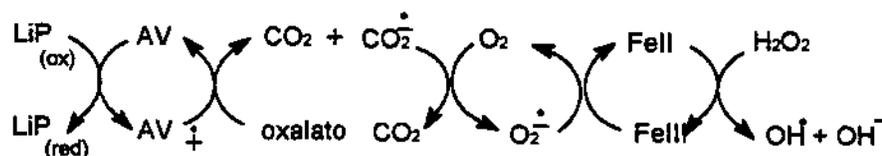
Em meio a estes dados discrepantes, estudos recentes demonstraram que a atividade de lacase pode ser mais ampla do que se imaginava, uma vez que em condições especiais esta enzima pode degradar tanto estruturas fenólicas, quanto estruturas não fenólicas e que sua capacidade de polimerização pode ser reorientada no sentido de despolimerização. Tal condição envolve a presença de substâncias que atuam como mediadores da ação de lacase, tendo sido bem estudados os efeitos de ABTS (22,23,84). Portanto, é possível que em condições naturais, a madeira contenha ou o próprio fungo produza tais metabólitos mediadores. Desta maneira, em caráter especulativo, poderia ser proposto que o efluente contém tal espécie de substância, o que explicaria a ação despolimerizante observada neste caso.

Por outro lado, estudos com lacase de *T. versicolor* demonstraram que esta enzima, na presença de fenóis, é capaz de oxidar Mn(II) para Mn(III), papel este atribuído também a Mn-peroxidase (9). Quelatos de Mn(III) com ânions como malonato, lactato e oxalato são fortes agentes oxidantes (116), capazes de oxidar uma grande variedade de estruturas fenólicas, bem como degradar ligninas naturais, sintéticas e cloroligninas contidas em efluentes de branqueamento de polpas (93,133). Deve ser ressaltado que fenóis e oxalato estão presentes nos efluentes estudados.

Em complementação às considerações feitas até aqui, um ponto importante a ser abordado é o possível envolvimento de outras enzimas, diferentes das avaliadas ou o efeito sinérgico entre os vários sistemas enzimáticos, o qual nos parece bastante oportuno no presente estudo.

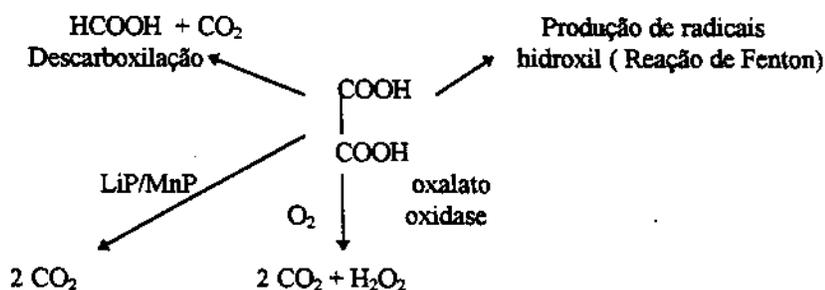
Neste sentido, um outro fator que provavelmente deve ter participação efetiva no processo de biodegradação do efluente pelo fungo *T. villosa* é a produção de ácido oxálico. Diversos estudos demonstraram que os sistemas LiP/álcool veratrílico (AV)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MnP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Mn decompõe ácido oxálico (AO) com a produção de CO<sub>2</sub> e que lacase não é capaz de produzir a mesma reação (1,151). A decomposição de ácido

oxálico é atribuída a ação do cation radical intermediário formado, a partir de AV, pela reação catalisada por estas enzimas, segundo o mecanismo:



**Figura 59.** Representação esquemática das possíveis interrelações metabólicas entre LiP, ácido oxálico, álcool veratrílico (AV), Fe (II) e (III) e espécies ativas de oxigênio.

Como pode ser observado, este mecanismo envolve a formação de espécies ativas de oxigênio. Pelo fato de ácido oxálico reagir com o cation radical intermediário, este metabólito inibe as reações de degradação dos substratos naturais de lignina peroxidase e a presença de álcool veratrílico poderia ser uma maneira de removê-lo. Este efeito parece ser característico de álcool veratrílico desde que outras substâncias estruturalmente semelhantes ao mesmo, não apresentam tal comportamento (151). Por outro lado, a presença de estruturas fenólicas, tais como guaiacol, ácido vanílico e seringaldazina inibe a descarboxilação de ácido oxálico, ou seja estruturas fenólicas são substratos preferenciais de lignina peroxidase e fenoxiradicais não são capazes de oxidar ácido oxálico. Este fato explicaria a não atuação de lacase, nos moldes observados para lignina peroxidase. Estes resultados indicam ainda que a eficiência da oxidação de estruturas não fenólicas por lignina peroxidase, na presença de ácido oxálico, é bastante reduzida, o que indiretamente implica ou determina um aumento acentuado de seletividade na degradação entre estruturas fenólicas e não fenólicas. Um esquema geral ilustrando os possíveis processos em que poderia participar o ácido oxálico é descrito abaixo (151):



**Figura 73.** Possíveis destinos metabólicos propostos para ácido oxálico.

Embora seja bastante difícil inferir quais as reais implicações destas várias alternativas no caso específico da degradação do efluente pelo fungo *T. villosa*, uma constatação parece evidente: a presença de concentrações variáveis de ácido oxálico durante o processo de biodegradação do efluente poderia gerar comportamentos alternantes ou seletivos, quadro este tipicamente observado no presente estudo. Logicamente, o efeito da variação de pH ao longo do processo parece-nos ainda o fator preponderante na explicação deste comportamento.

A comparação entre os sistemas enzimáticos dos dois fungos claramente nos coloca duas questões:

i) Pequenas diferenças na composição de atividades enzimáticas dos fungos podem ser suficientes para produzir padrões de comportamentos diferentes, como os observados para *T. villosa* e *P. crinitus*. Este resultado não é tão inesperado se considerarmos que as transformações promovidas pelos fungos é decorrente da ação de enzimas oxidativas tipo fenoloxidasas. O mecanismo de ação destas enzimas envolve a formação inicial de cátions radicais ou fenoxi radicais, os quais reagem, subseqüentemente, através de uma série de reações não enzimáticas (21,70,93). Portanto, o destino ou orientação a ser dado a estes processos depende das condições do meio. Este aspecto foi claramente evidenciado pelas diferenças observadas entre os fungos, com relação a variação das suas capacidades despolimerizante/polimerizante, como já discutido anteriormente;

ii) A avaliação de atividade enzimática extracelular simplesmente pelos métodos químicos empregados, não é suficiente para explicar todos os eventos ou comportamentos observados para os fungos. Esta afirmação se deve ao fato de que os fungos basidiomicetos secretam as diversas enzimas na forma de isoenzimas, cuja composição ou proporção relativa depende das condições do meio a que estes organismos estão submetidos (22,74,97,133). Para uma dada enzima, as diversas formas isoenzimáticas podem apresentar características distintas entre si, com relação a parâmetros como estabilidade, perfil de atividade relativo a pH, especificidade quanto ao substrato, etc. Por exemplo, estudos realizados com o fungo *T. versicolor* demonstraram que este produz lacase na forma de três isoenzimas, sendo que das três, apenas uma possui capacidade de despolimerizar lignina e as demais preferencialmente polimerizam (101). Um outro fator importante, é o fato de que algumas enzimas são ligadas a parede celular (74,93) e portanto os valores de atividade extracelular, medidos no caldo de cultura (ou no caso, no efluente) podem ser subestimados. Reforçando ainda este ponto de vista, há que se levar em consideração que substâncias de baixa massa molecular podem ser, em boa proporção, metabolizados por reações intracelulares (24,35).

Portanto, todos estes fatores apontados podem explicar as discrepâncias e as dificuldades encontradas na tarefa, nem sempre bem sucedida, de se correlacionar atividade enzimática extracelular com os efeitos em estudo.

#### 5.4. Efeito indutivo na atividade enzimática

Além dos dois fungos em estudo, *T. villosa* e *P. crinitus*, um terceiro fungo foi selecionado com base nas características de descoloração e produção de enzimas extracelulares. Em outros estudos, já havia sido caracterizado que o fungo *Ganoderma sp-70* apresenta um perfil de atividade enzimática, qualitativamente, muito semelhante ao dos dois fungos mencionados, porém produz baixos níveis de enzimas ligninolíticas e a sua capacidade de descoloração do efluente é, portanto, mais limitada.

Com relação ao possível efeito indutivo sobre a produção de enzimas extracelulares pelos fungos, os resultados obtidos evidenciaram comportamentos diferentes entre os vários fungos.

Para os fungos *T. villosa* e *Ganoderma-sp70*, concentrações crescentes de efluente induzem níveis mais elevados de atividade enzimática (Figuras 33-38), para concentrações acima de 5%. Até este valor o aumento de atividade foi discreto. O fungo *Panus crinitus* parece ser uma exceção (Figuras 38-41) a este comportamento, desde que as atividades enzimáticas foram menores com o aumento de concentração de efluente. Este fato pode ser decorrente de uma regulação diferente na produção das enzimas, neste caso, indicando que estas, possivelmente, também tenham

características catalíticas diferentes. As diferenças de padrão de biodegradação observadas entre *P. crinitus* e *T. villosa*, parecem confirmar, pelo menos parcialmente, esta possibilidade. Por outro lado, tais resultados podem apenas ser indicativos de que a resistência ou o metabolismo geral do fungo *P. crinitus* é mais negativamente afetado pela presença de algum metabólito existente no efluente do que para os outros dois fungos.

Considerando-se uma mesma enzima, para qualquer dos fungos em estudo, os diferentes perfis das curvas a 7, 14 e 21 dias refletem as diferentes fases de crescimento em que se encontra cada cultura. Assim, o fato de que durante as duas primeiras semanas ocorreu um aumento no nível das enzimas e em seguida observou-se o decaimento das suas atividades, para *Ganoderma sp-70*, ou aproximadamente o mesmo nível, para *P. crinitus*, parece indicativo de que os fungos testados atingem um estado estacionário de crescimento em torno de 14 a 20 dias. Os níveis mais baixos de atividade enzimática observados para tempos mais prolongados (p.e. 21 dias) provavelmente se deve a intensa atividade proteolítica extracelular, induzida pela carência de N micelial (66).

O possível efeito indutivo do efluente não atinge todas as enzimas com a mesma intensidade. Assim o nível de atividade de  $\beta$ -glicosidase parecer responder mais discretamente a variações na concentração de efluente no meio. Porém o nível de peroxidases e lacases parece ser bastante afetado por tais variações, assim também a concentração de proteínas totais.

A resistência do fungo *T. villosa* com relação a concentrações crescentes de efluente, avaliada pelo crescimento micelial em meio sólido, demonstrou que concentrações mais elevadas, a partir de um certo valor, 15%, afetam o metabolismo geral, reduzindo a taxa do seu crescimento. Este efeito é particularmente mais evidente para culturas com valores de pH nos extremos da faixa estudada, ou seja a 3,5 e 9,0. Para valores de pH 5,0 e 7,0, este efeito é pouco pronunciado. Levando-se em consideração que culturas em meio com concentrações de efluente de 15% apresentaram taxas de crescimento superiores as demais (0 e 45%), parece que a presença de efluente no meio de cultivo possui efeitos antagônicos sobre o metabolismo dos fungos, o qual parece ser dependente da concentração.

##### **5. 5. Modificações UV espectrais do efluente durante tratamento com os fungos basidiomicetos *Panus crinitus* e *Trametes villosa*.**

Estudos com substâncias ditas modelos e certas preparações de lignina têm demonstrado que grupamentos hidroxilicos-fenólicos livres e eterificados contribuem significativamente para o espectro de absorção-UV de ligninas na região de 230 a 320 nm, especialmente em torno de 280 nm (11,64).

Efluentes tipo  $E_1$  são constituídos em grande parte por lignina de baixa massa molecular, modificada quimicamente, além de uma grande variedade de derivados da degradação parcial da mesma (85,102). Carbohidratos, ácidos orgânicos, cetonas, etc. também fazem parte desta complexa mistura. Em função de tal complexidade, espectros UV tradicionais pouco ajudariam no estudo de possíveis modificações de composição do efluente durante o tratamento com os fungos, desde que a interpretação dos mesmos seria extremamente difícil. Neste sentido, levando-se em consideração que um dos objetivos é o de avaliar a degradação de derivados de lignina, especialmente estruturas fenólicas, substratos preferenciais de fenoloxidasas produzidas pelos fungos, optou-se pelo estudo de espectros-UV diferenciais obtidos pela subtração do espectro a pH neutro do respectivo espectro a pH alcalino.

Em soluções de pH neutro, os espectros de absorção, tanto de grupamentos -OH livres quanto de -OH eterificados, são aproximadamente iguais. Porém em soluções alcalinas, devido a ionização dos grupamentos -OH livres e conseqüente produção de íons fenolatos, observa-se um aumento de absorção na região mencionada, refletindo assim a maior absorvidade molar da forma ionizada (64). Considerando-se que nenhum outro grupamento existente nas diversas estruturas contidas no efluente apresenta tal comportamento, o espectro diferencial da solução alcalina contra a solução neutra (solução referência) de efluente representa tipicamente a absorção dos grupamentos fenólicos ionizáveis, cujas características específicas dependem dos substituintes do anel aromático (26,64).

No caso de lignina, o espectro assim obtido (Figura 54), caracteristicamente apresentou uma curva com 2  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorção, de 240 a 260 nm e outro de 290 a 310 nm, atribuídos então a absorção de grupos fenólicos ionizáveis (11,26,64). Em adição a estas bandas, uma outra banda (ombro) pôde ser observada na região de 305 a 400 nm, a qual pode ser atribuída, também com base em estudos com substâncias modelos, a absorção de grupamentos carbonílicos ou duplas ligações conjugados com grupos fenólicos. Tais grupamentos carbonílicos possuem  $\lambda_{\text{máx}}$  em torno de 350 nm, em soluções alcalinas e  $\lambda_{\text{máx}}$  de 280 a 310 nm em soluções de pH neutro. Em função portanto deste deslocamento de  $\lambda_{\text{máx}}$  provocado pela alteração de pH, de neutro para alcalino, é que se observa a absorção em torno de 350 nm no espectro diferencial, bem como uma contribuição para a absorção a 300 nm (11).

Diversos tipos de grupamentos carbonílicos podem ser responsáveis pela absorção na região de 305 a 400 nm, sendo que, particularmente quatro tipos são os mais freqüentes em preparações contendo lignina ou substâncias estruturalmente relacionadas (11,178):

	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
G-CH=CH-CHO	400
R-O-4-G-CH=CH-CHO	340
G-CO-R	350
R-O-4-G-CO-R	310

Outra observação que emerge dos estudos com substâncias ditas "modelo" é a de que quanto mais extensamente conjugados forem os grupamentos OH fenólicos, maior será o deslocamento de  $\lambda_{\text{máx}}$  na direção de valores maiores e menor a distância (em nm) entre os valores de máximo de absorção para as duas bandas observadas na região de 270 nm e 310 nm, respectivamente (11). Por outro lado, deve ser ressaltado que os valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  e as respectivas intensidades das bandas de absorção podem ser bastante influenciados pela concentração e grau de pureza das preparações de lignina. Assim por exemplo a presença de vanilina e seringaldeído em tais preparações pode ser evidenciada pelo acréscimo de absorção na região de 350 a 360 nm no espectro diferencial.

O espectro diferencial do efluente tipo E1 não tratado com os fungos apresentou bandas de absorção máxima a 220, 272, 310-330 e 350-370 nm, respectivamente. Embora qualitativamente se enquadre no perfil já descrito anteriormente para ligninas e substâncias modelo, tal espectro não apresentou características que sejam exatamente de uma determinada preparação de lignina ou substância modelo estudada, desde que as duas bandas em torno de 250 nm e 300 nm, típicas destas preparações, não foram observadas. Porém, a distância entre as duas

bandas a 220 e 272 nm foi de 52 nm, valor este semelhante aos valores observados para estruturas fenólicas com anel aromático di-substituído, como mostra a Tabela 5. Tal comportamento se deve provavelmente ao fato de que na verdade, o efluente é constituído por uma mistura de estruturas bastante complexa, cujas absorções individuais podem se sobrepor ou não, resultando em um espectro final também bastante complexo.

Neste sentido, os resultados do estudo do efluente utilizando-se extração com solventes foi bastante elucidativo. Após extração do efluente com acetato de etila, o solvente foi evaporado e o resíduo obtido, novamente redissolvido em H<sub>2</sub>O. O espectro diferencial desta preparação apresentou uma banda de absorção na região de 220 nm e praticamente nenhuma absorbância acima de 250 nm, Figura 57(a). O efluente resultante, contendo a fração residual após a extração, curiosamente apresentou absorção predominantemente acima de 300 nm, Figura 57(b). Estes resultados sugerem que o espectro observado para o efluente total, parece ser uma composição das absorções decorrentes das várias frações de diferentes massas moleculares existentes no mesmo. Levando-se em consideração que a extração com acetato de etila extraiu particularmente a fração de componentes de baixa-MM (determinado por HPLC de exclusão), os resultados obtidos indicam que a fração de mais alta massa molecular é que preferencialmente contém os grupamentos responsáveis pela absorção acima de 300 nm, no espectro diferencial do efluente total.

Por outro lado, com base nos dados da Tabela 5, pode-se inferir que a absorção observada a comprimentos de onda superior a 310 nm pode ser atribuída a grupamentos carbonílicos e/ou insaturações conjugadas com o anel aromático de fenol. Realmente, tal absorção foi reduzida em intensidade ou desapareceu totalmente quando o efluente foi tratado com borohidreto de sódio, Figura 55. Acompanhando-se a cinética de redução do efluente, na presença deste forte agente redutor, observou-se que a redução de intensidade de absorção em torno de 272 nm foi mais rápida do que a 310 nm, a qual foi mais rápida do que a redução medida em torno de 350-370 nm (Figura 56). Estes resultados indicam que mais de um tipo de grupamento funcional foi responsável pelas absorções observadas no espectro diferencial do efluente, na região mencionada. Pelo perfil da curva de redução, os grupamentos responsáveis pela absorção a 272 e 220 nm parecem ser conjugados, desde que as suas taxas de redução foram iguais. Por outro lado, as reduções de intensidade de absorção não foram acompanhadas, de imediato, da elevação de absorbância a qualquer comprimento de onda, nem verificou-se a presença de ponto isobéstico, o qual poderia indicar a interconversão de espécies químicas intermediárias. Após 4 hs de reação, notou-se a elevação de absorbância a 272 nm e demais comprimentos de onda, com exceção a 220 nm, a qual poderia ser consequência da formação de grupamentos hidroxílicos fenólicos (272 nm) durante a reação de redução, possivelmente a partir de grupamentos de quinona. No entanto, neste caso, o aumento observado deveria ocorrer concomitantemente com o decréscimo de outras ou outra banda de absorção. Portanto, tal efeito pode ter sido apenas decorrente da reoxidação parcial dos grupamentos originalmente existentes. Pelo fato de que a redução com excesso de borohidreto suprimiu totalmente a absorção acima de 300 nm nos espectros diferenciais, é evidente que grupamentos carboxílicos *para*-fenil-conjugados não estão presentes ou suas concentrações são extremamente baixas no efluente não tratado, assim como também estruturas tipo fenil-fenil, as quais absorvem na região de 340 nm. Por outro lado, a observação de que a redução do efluente com borohidreto de sódio promove a diminuição apenas parcial da absorção a 220 nm faz com que não seja possível descartar a presença de carboxílas *orto*-fenil conjugadas.

A ação dos fungos promove mudanças estruturais significativas nos componentes do efluente, claramente evidenciadas pelas alterações espectrais nas amostras tratadas com os mesmos.

Espectros-UV diferenciais de efluentes tipo E<sub>1</sub> obtidos durante o período de incubação com o fungo *T. villosa* (Figuras 58 e 59) revelaram que as modificações estruturais promovidas por este fungo podem ser divididas em várias etapas ;

- i) No período inicial (0-48 hs), ocorre a formação progressiva de um grupamento conjugado com o anel aromático, evidenciada pelo aumento acentuado de absorbância a 310 nm acompanhado do aumento discreto da absorbância a 230 nm. No decorrer deste processo a absorção a 310 nm se desloca para 320 nm. Pelo fato de que tal absorção pode ser suprimida pela redução com borohidreto de sódio, o grupamento intermediário formado deve ser tipo carbonílico. Neste caso, pelos dados disponíveis na literatura e pelos dados da Tabela 5, as possíveis estruturas deste grupamento seriam;  
a) do tipo C<sub>α</sub>-aril conjugado com grupamento fenólico, formado provavelmente em estruturas de alta massa molecular (26). A formação deste tipo de grupamento em reações de C<sub>α</sub>-oxidação catalisadas por fenoloxidasas tem sido extensamente descrita na literatura (93,171). Alguns autores têm argumentado que a formação de C<sub>α</sub>-carbonilas, particularmente em estruturas poliméricas de lignina, poderia contribuir para a modificação da complexidade estereoquímica das mesmas, facilitando assim a sua despolimerização (171). Por outro lado, tais estruturas deveriam contribuir para o aumento de absorção a 280 nm, nos espectros não diferenciais, em confronto com a drástica redução observada para o processo de biodegradação (Figura 50)  
b) Grupamento C<sub>β</sub>-fenil conjugado. Este tipo de estrutura possui uma absorvidade molar bem mais baixa do que grupamentos C<sub>α</sub>-aril conjugados, o que tornaria modesta a sua contribuição para a absorção a 310 nm.  
c) C<sub>α</sub>-aril conjugados provenientes de carboxilas. Estes grupamentos possuem absorvidade molar inferior às respectivas estruturas provenientes de cetonas ou aldeídos (26). Se realmente formados, estes grupamentos poderiam contribuir para o deslocamento da absorção do efluente de 280 nm para comprimentos de onda menores, nos espectros não diferenciais, fato este efetivamente observado. Tais grupamentos poderiam ser formados a partir da oxidação dos grupamentos hidroxílicos de álcoois ou poderiam ser resultantes da clivagem de anéis aromáticos, processo este que também contribuiria para a redução de absorção a 280 nm;
- ii) Numa fase intermediária (48-72 hs) um “ombro” de absorção em torno de 362 nm que evoluiu concomitantemente com a banda a 310-320 nm, tornou-se claramente separado da mesma e em seguida desapareceu (Figura 58). Este efeito pode ser decorrente da formação de um outro tipo grupamento cuja absorção está parcialmente sobreposta ou simplesmente refletir o desdobramento da banda original. Grupamentos carbonílicos conjugados com anel aromático tipo guaiacil ou siringil absorvem fortemente nesta região, porém, neste caso, esta banda também é acompanhada de forte absorção em torno de 240-250 nm (Tabela 4). Como nesta região, nenhum aumento de absorção pôde ser detectado, provavelmente esta não é a origem da absorção a 362 nm. Por outro lado, estruturas tipo 3,4-dihidroxiacetofenona não apresentam absorção na região de 250 nm, porém, o fazem intensamente a 360 nm. Também estruturas tipo quinonas poderiam ser responsáveis pela absorção nesta região;
- iii) Numa etapa final observou-se o desaparecimento da absorção acima de 300 nm com o concomitante aumento a 220 nm. Uma fraca banda de absorção em torno de 270 nm pôde também ser observada. A reação de redução do efluente, tratado com o fungo *T. villosa*, com borohidreto de sódio suprimiu a absorção a 270 nm, mantendo

inalterada a absorção a 220 nm. Este resultado pode significar a formação de grupos carboxílicos, caracterizado pelo deslocamento de  $\lambda_{\text{ABS}}$  para valores menores, abaixo de 250 nm, nos espectros diferenciais (Tabela 5).

O decréscimo de absorbância a 280 nm, observado nos espectros-UV não diferenciais, indica intensa degradação do conteúdo de estruturas de caráter aromático, provavelmente não só em função do desaparecimento de componentes de baixa-MM, como também pela clivagem de anel aromático em estruturas de mais alta massa molecular. Os resultados do estudo da distribuição de massas moleculares, como já discutido, suportam tais suposições.

Para o fungo *Panus crinitus*, não podem ser feitas as mesmas considerações gerais realizadas para o fungo *Trametes villosa*, sendo que a grande diferença observada é que, neste caso, não foi detectada a formação de grupamentos carbonílicos intermediários, os quais seriam evidenciados a 310 nm ou comprimentos de onda superiores. Diferentemente do observado para o fungo *T. villosa*, não ocorreu aumento de absorbância no espectro diferencial. Este resultado parece indicar que, para *P. crinitus*, o mecanismo de degradação do efluente foi, pelo menos parcialmente diferente do apresentado por *T. villosa*.

## 5.6. Estudos espectroscópicos - FTIR

Embora os estudos mecanísticos de biodegradação do efluente tipo E<sub>1</sub> de indústrias de papel e celulose, utilizando-se espectroscopia-UV, tenham revelado detalhes importantes das modificações estruturais operantes no processo, o uso de outras técnicas espectroscópicas se fez necessário. Isto em função principalmente do fato de que os espectros diferenciais-UV, utilizados neste caso, foram elucidativos apenas das modificações ocorridas em torno das estruturas de caráter aromático (estruturas fenólicas) e portanto não permitindo uma visão mais abrangente sobre todas as estruturas contidas no efluente.

A utilização de espectroscopia FTIR ( Fourier Transform Infra-Red ) tem sido muito valiosa no estudo da estrutura da madeira e particularmente de lignina e seus derivados (50,51). Desta maneira, com o objetivo de se avaliar as possíveis modificações estruturais ocorridas durante a biodegradação do efluente E<sub>1</sub>, diversas substâncias modelo foram analisadas, utilizando-se espectros FTIR, cujas estruturas estão relacionadas com as estruturas básicas formadoras de lignina e outras supostamente presentes no efluente tipo E<sub>1</sub>.

Os resultados obtidos e resumidos na Tabela 6 em complementação aos resultados descritos na literatura, indicaram que:

- i) grupamentos carbonílicos não conjugados apresentaram banda de absorção acima de  $1700 \text{ cm}^{-1}$  e grupamentos conjugados o fizeram no intervalo de  $1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ , sendo que grupamentos carbonílicos *p*-fenil conjugados exibiram bandas com frequências em torno de  $1550\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$  (77,78);
- ii) grupamentos carbonílicos de quinonas exibiram absorção em torno de  $1605\text{-}1635 \text{ cm}^{-1}$  e grupamentos carboxílicos conjugados com anel aromático a  $1670\text{-}1680 \text{ cm}^{-1}$ ;
- iii) A intensidade relativa das bandas na região de  $1500 \text{ cm}^{-1}$ , mais especificamente em  $1590$  e  $1510 \text{ cm}^{-1}$ , as quais são resultantes de estiramento de anéis aromáticos (51, 77,102,152), podem indicar o conteúdo relativo de estruturas aromáticas contidas no efluente;
- iv) A região espectral de  $800\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$  pode ser indicativa da posição e natureza dos substituintes no anel de estruturas aromáticas (77,78,152);

Baseado nos dados e nas considerações acima, a análise dos espectro FT-IR das amostras de efluentes tratados com os fungos e não tratado revelaram que:

i) O processo Kraft de polpação e o processo de branqueamento alteram significativamente a estrutura da lignina residual, resultado este já exaustivamente descrito na literatura (61,62,98,102);

ii) O conteúdo de estruturas aromáticas contidas no efluente sem tratamento é baixo, indicado pela ausência das bandas de absorção correspondentes na região de  $1500\text{ cm}^{-1}$ ;

iii) O espectro do efluente não tratado apresentou baixa resolução, resultado este que poderia ser atribuído a presença de estruturas de mais alta massa molecular. Adicionalmente, não apresentou bandas na região de  $1420\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$  em contraste com amostras de efluente tratados com o fungo *T. villosa* (Figuras 64-66), as quais exibiram bandas a  $1420\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$  e uma maior resolução espectral. Desde que, tais bandas podem ser resultantes do estiramento C-C do anel de estruturas aromáticas, combinadas com a deformação de C-H fora do plano do anel, estes resultados poderiam ser indicativos de que as estruturas alifáticas foram mais rapidamente degradadas pela ação do fungo que estruturas aromáticas. A maior resolução do espectro de efluentes tratados poderia ser também um indicativo deste fato;

iv) A ação degradativa do fungo *T. villosa* sobre o efluente provocou alterações químicas importantes na estrutura dos grupamentos que originalmente apresentavam bandas de absorção na região de  $1631\text{ cm}^{-1}$ , no efluente sem tratamento. Como consequência a frequência da referida banda de absorção foi deslocada progressivamente, ao longo do período de incubação, para valores maiores,  $1635\text{ cm}^{-1}$  a 24 hs,  $1646\text{ cm}^{-1}$  a 48 hs e  $1653\text{ cm}^{-1}$  a 96 hs, além de que a intensidade relativa destas bandas foram maiores. Os dados da Tabela 6 indicam que absorções nesta região correspondem a grupamentos carbonílicos conjugados. Realmente, este resultado foi confirmado uma vez que todas as bandas mencionadas foram parcialmente suprimidas pelo tratamento das respectivas amostras com borohidreto de sódio, como agente redutor. Nestas condições, apenas uma banda de intensidade muito pequena foi observada, a qual provavelmente foi decorrente da absorção de grupamento carboxílico, como indicado pelos dados da Tabela 6. Por outro lado, o deslocamento da absorção para valores de frequência maiores, pode ser resultante da diminuição no grau de conjugação do grupamento carbonílico, pela despolimerização das estruturas envolvidas, ou, numa hipótese mais provável, indica a formação de um novo tipo de grupamento carbonílico. Neste sentido, os resultados dos estudos espectroscópicos com UV indicaram que grupamentos carbonílicos aril-conjugados devem ser incluídos neste grupo;

v) A banda de absorção a  $837\text{ cm}^{-1}$ , previamente existente no efluente sem tratamento, desapareceu durante o período de incubação com o fungo *T. villosa*, dando lugar a duas outras bandas de fraca intensidade a  $817$  e  $867\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Tal resultado pode indicar mudanças nas posições dos substituintes das estruturas aromáticas, uma vez que estas absorções podem ser resultantes de deformações de C-H em tais estruturas, sendo que as bandas a  $860$  e  $817\text{ cm}^{-1}$  são típicas de C-H nas posições 2,5 e 6 de unidades guaiacil (50,77,78) e a banda a  $860\text{ cm}^{-1}$  típica de C-H nas posições 2 e 6 de unidades siringil;

vi) Curiosamente, observou-se um aumento progressivo da intensidade da banda a  $1326\text{ cm}^{-1}$ , durante o período de incubação do efluente com o fungo *Trametes villosa* (Figuras 64-66), o que não é observado para o fungo *Panus crinitus* (Figura 67). Este resultado parece indicar uma certa seletividade quanto ao tipo de subestrutura a ser

degradada pelo sistema ligninolítico do fungo *T. villosa*.

### 5.7. Considerações gerais sobre o mecanismo de biodegradação

Todos os resultados descritos até aqui são de grande importância não só para se entender e prever a degradabilidade de efluentes de indústrias de papel e celulose como também no aspecto conceptual de mecanismos de biodegradação de materiais lignocelulósicos. Desta maneira torna-se importante entender tais resultados num contexto mais amplo.

A análise dos dados disponíveis na literatura com relação a degradação de lignina, incluindo biodegradação por fungos, mostram que, de uma maneira geral, ligninas tipo siringil são mais facilmente oxidadas do que ligninas tipo guaiacil, tanto “*in vivo*”(18,79,146,171) quanto *in vitro* (49,93,96,169). Em contrapartida, os dados relativos a degradação de derivados de lignina em efluentes industriais, em que pese o fato de serem escassos, parecem indicar uma tendência aparentemente oposta.

Bergbauer e Eggert (17) estudaram a degradação de um efluente de branqueamento de polpa tipo EOP (extração alcalina; oxigênio e peróxido de hidrogênio) com os fungos *Trametes versicolor* e *Stagonospora gigaspora*. Nas condições estudadas, estes fungos não produziram lignina peroxidase, porém produziram lacase e peroxidases, sendo que para *T. versicolor* a proporção de lacase produzida foi muito superior a de *S. gigaspora*. A análise cromatográfica dos monômeros com estrutura fenólica, gerados pela oxidação do efluente com CuO (após tratamento com o fungo), revelou que a ação dos fungos sobre o efluente promoveu o aumento da concentração de derivados contendo grupamentos carboxílicos com a concomitante diminuição de derivados aldeídicos, para os três grupos de precursores de lignina, guaiacil, siringil e *p*-hidroxifenil. Porém, particularmente as estruturas tipo guaiacil-fenólicas foram mais intensamente degradadas por ambos os fungos e conseqüentemente houve um aumento da quantidade relativa de unidades siringil-fenólicas nos efluentes, ao final do processo de degradação. Estes resultados indicam portanto, uma aparente seletividade dos sistemas ligninolíticos destes fungos quanto ao tipo de subestrutura formadora de lignina a ser degradada.

Adicionalmente, estudos comparativos de degradabilidade de efluentes provenientes de processos de polpação com madeira dura (lignina siringil-guaiacil) e madeira mole (lignina guaiacil) (53) demonstraram que efluentes contendo maior teor de unidades siringil são mais recalcitrantes, ou seja mais resistentes a biodegradação.

Neste mesmo contexto, diversos estudos com substâncias químicas ditas “modelo” de subestruturas de lignina mostraram que estruturas tipo siringil são relativamente mais fáceis de serem oxidadas do que as respectivas estruturas guaiacil (80,93). Em que pese este fato, estudos realizados por Hammel e colaboradores (71) corroboraram os resultados obtidos por Bergbauer e Eggert para os efluentes estudados (EOP). Embora não seja possível extrapolar diretamente estes resultados para efluentes de processos de branqueamento tipo CEDE ou OCED (como os do presente estudo) pelo fato destes conterem derivados clorados de lignina ou na verdade, como demonstraram os espectros FT-IR, produtos da alteração química drástica da mesma, é perfeitamente factível considerar que tais efluentes possam apresentar um comportamento semelhante.

Por outro lado, os resultados obtidos por Rogalski e colaboradores (141) no estudo com lacases produzidas pelos fungos *Phlebia radiata* e *Coriolus versicolor* fornecem informações importantes que nos permitem, mesmo que de uma maneira

indireta, abordar esta questão. Verificou-se que metoxihidroquinona (MHQ) é substrato de lacase e que 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DMBQ) inibe consideravelmente a atividade desta enzima, sendo que concentrações da ordem de 10  $\mu$ M são suficientes para provocar um efeito de inibição da atividade enzimática da ordem de 50 %. Diversos estudos mostram que DMBQ pode ser produzido durante a degradação de ácido síngico por lacase no intervalo de pH de 3,0-8,0 (15,93,164).

Na tentativa de relacionar tais resultados com os obtidos no presente estudo, as seguintes considerações podem ser feitas:

- i) Os dados obtidos do estudo da biodegradação do efluente utilizando-se espectroscopia-UV indicaram que quinonas provavelmente foram formadas durante este processo, particularmente quando a biodegradação foi realizada pelo fungo *T. villosa*. Também tornou-se evidente a partir deste estudo que; se efetivamente formadas, tais espécies químicas devem ter alcançado suas concentrações máximas no tempo de incubação de 48 h.
- ii) Neste mesmo período, a atividade enzimática de lacase extracelular, produzida pelo fungo *T. villosa*, também atingiu seu valor máximo, para em seguida decrescer acentuadamente.
- iii) Em contrapartida, os resultados obtidos para o fungo *P. crinitus* evidenciaram um comportamento diferente, que não inclui a formação de grupamentos carbonílicos intermediários ou se formados, o foram numa taxa bem menor. Este fato, se considerado na mesma linha de raciocínio desenvolvida para o fungo *T. villosa*, implica na não formação de quinonas, ou espécies relacionadas, na mesma proporção que para este último. Em complementação, a taxa de atividade enzimática de lacase para o fungo *P. crinitus* manteve-se elevada por um tempo mais prolongado.
- iv) Comparando-se as curvas de distribuição de massas moleculares dos componentes do efluente, para ambos os tratamentos, observou-se que embora o fungo *T. villosa* tenha sido mais eficiente com relação a velocidade de biodegradação do efluente nas primeiras 48 h, o aparecimento de uma fração em particular, com característica recalcitrante, foi mais evidente para este fungo do que para *P. crinitus*.

Com base nas considerações feitas acima, é possível supor que, no caso de *T. villosa*, ocorreu a formação de intermediários tóxicos ou inibidores, via reações catalisadas por lacase, e que a subsequente degradação dos mesmos tenha sido comprometida, determinando assim que estes intermediários se acumulassem. Tais compostos deveriam ter estruturas derivadas de unidades síngil, o que explicaria o comportamento observado nos espectros FT-IR para este fungo. Estas considerações também explicariam o comportamento diferente apresentado pelo fungo *P. crinitus*.

Reações de polimerização poderiam ser um dos mecanismos de degradação destes intermediários, desde que é fato bem conhecido que quinonas sofrem facilmente reações de polimerização (37). O fungo *P. crinitus* demonstrou um grau de polimerização bem maior.

Embora estas considerações possam parecer contraditórias uma vez que os dois fungos são bons produtores de lacase, alguns estudos demonstraram (15) que mesmo entre fungos produtores de lacase e lignina peroxidase, o destino metabólico de ácido síngico pode ser diferenciado, podendo ocorrer tanto polimerização quanto degradação via clivagem de anel. O mesmo estudo demonstrou ainda que com ácido vanílico e outras substâncias estruturalmente relacionadas como álcool veratrílico e ácido gálico a reatividade é bem menor tanto para reação de polimerização, como para qualquer outra reação. Ou seja; pode ocorrer diferenças na capacidade de polimerização pelos fungos, dependendo do tipo de unidade a ser metabolizada, síngil

ou guaiacil. Estes dados poderiam explicar as diferenças na seletividade de estruturas degradadas, aparentemente observadas.

Por outro lado, a presença ou atuação de uma outra enzima, como por exemplo CDH, celobiose desidrogenase, ou CBQ, celobiose quinona-oxirredutase, conhecidas pela capacidade de reduzir quinonas (3,6), também poderia ser uma hipótese viável. Estudos recentes (6) mostram que a redução de Fe (III) a Fe (II) catalisada pela enzima celobiose desidrogenase (CDH) e a subsequente reoxidação a Fe (III) na presença de peróxido de hidrogênio é afetada pela presença de lignina, porém, dependendo da natureza ou tipo de lignina, guaiacil ou siringil, os efeitos observados são diferentes. Concentrações crescentes de lignina tipo guaiacil acarretam uma inibição proporcional da atividade redutora de CDH sobre Fe(III), na presença de peróxido de hidrogênio, contrariamente ao efeito de lignina tipo siringil-guaiacil, a qual não afeta a atividade da enzima. Tais estudos (6) demonstraram também que metoxibenzoquinona (MBQ) é rapidamente reduzida para metoxihidroquinona pelo sistema celobiose/CDH, porém 2,6dimetoxi-1,4- benzoquinona é apenas lentamente reduzida.

### 5.8. Caracterização de produtos.

A distribuição de pesos moleculares demonstrou ou confirmou a natureza heterogênea dos componentes do efluente. Isto se deve ao fato do mesmo conter outras substâncias além de derivados lignina, tais como extrativos da madeira, além do que lignina por si só, apresenta esta característica, desde que não é um "polímero" homogêneo.

Como descrito em Materiais e Métodos, as amostras de efluentes tratados e não tratados foram analisadas por HPLC, utilizando-se uma coluna de fase reversa. Nas condições empregadas foram analisados os componentes de baixa-massa molecular ( $MM < 1000$  Da).

Os resultados obtidos indicaram que a substância com tempo de retenção de 2,3 minutos foi o principal substrato na ação do fungo *T. villosa*, sendo que sua concentração foi reduzida em 73 % durante o período de 96 hs de incubação. Tal substância não foi identificada, mesmo pela análise por CG-MS. Por outro lado, a substância com tempo de retenção de 1,9 min., a qual foi identificada como sendo ácido pimárico (123), uma resina ácida, não sofreu a ação do sistema enzimático do fungo.

A área total medida no cromatograma obtido por HPLC de fase reversa, utilizando-se um detetor-UV a 280 nm, decresceu 47 % no período de 96 hs de incubação. Se levamos em consideração que a área total medida por HPLC de exclusão, também a 280 nm, a qual inclui todas as frações, decresceu 68 % no mesmo período, os resultados sugerem que a destruição dos cromóforos das frações de alta massa-molecular que absorvem no UV foi significativa. Neste caso, a clivagem de anéis de estruturas aromáticas deve ser um processo importante.

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

6.1. *Trametes villosa* e *Panus crinitus* foram escolhidos para um estudo sistemático com base na boa eficiência demonstrada na degradação de efluentes tipo E<sub>1</sub>, da fase de branqueamento de polpas celulósicas. Tais fungos removeram 75-80 % da cor inicial, no período de 30-48 hs de incubação e 65-75 %, em 72 hs, respectivamente.

6.2. Concomitantemente ao processo de descoloração, os fungos também promoveram intensa degradação dos componentes do efluente, particularmente de fenóis, derivados de lignina. A degradação destas substâncias foi monitorada tanto por métodos químicos, quanto por métodos espectroscópicos, sendo que ambos os fungos foram capazes de degradar todas as frações, de alta, média e baixa massas moleculares, contidas no efluente.

6.3. O aumento relativo de sinais que indicam características de estruturas aromáticas, bandas na região de 1400 cm<sup>-1</sup> e 835,816 e 880 cm<sup>-1</sup> nos espectros IR, ao longo do processo de biodegradação, parece sugerir que as porções alifáticas das subestruturas contidas no efluente são mais rapidamente degradadas do que as porções contendo as subestruturas aromáticas.

6.4. Os fungos exibiram grande similaridade com relação ao perfil do sistema enzimático extracelular, sendo que ambos produziram níveis elevados de lacase, moderados de lignina peroxidase, beta-glicosidase e peroxidases totais. Por outro lado, não produziram MnP. A produção das enzimas extracelulares, para cada um dos fungos, parece estar sob diferentes mecanismos de regulação, uma vez que o efeito indutivo do próprio efluente sobre o nível das enzimas mostrou diferenças entre os mesmos. O sistema ligninolítico de *P. crinitus* respondeu negativamente ao aumento da concentração de efluente, contrariamente ao observado para o fungo *T. villosa*, cujo efeito foi realmente indutivo.

6.5. Embora os perfis enzimáticos para ambos os fungos tenham sido similares, a análise dos mecanismos individuais de degradação do efluente evidenciou algumas diferenças significativas. Assim, o fungo *T. villosa* gerou estruturas químicas intermediárias, como por exemplo grupamentos carbonílicos, não observadas para o fungo *P. crinitus*. O perfil de distribuição de massas moleculares ao longo do período de incubação também foi diferente, sendo que as reações de polimerização foram mais pronunciadas para o fungo *P. crinitus*.

6.6. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram que, contrariamente ao conceito dominante de que MnP é essencial para a descoloração e degradação de estruturas de alta massa molecular, contidas em efluentes de indústrias de papel e celulose, lacase pode também realizar tal tarefa, podendo assim ser utilizada em processos biotecnológicos. Portanto, neste aspecto, os dois fungos avaliados mostraram um grande potencial, sendo que estudos utilizando biorreatores em escala maior, já estão sendo realizados.

6.7. A utilização de fungos basidiomicetos no tratamento de efluentes é limitada pela necessidade de se ter a suplementação da fonte de carbono para um crescimento micelial rápido, desde que o efluente por si só não representa um meio de crescimento com as características ideais para tanto, embora os fungos possam crescer nos

mesmos, mesmo que lentamente. Portanto, o tratamento de efluentes com fungos não deveria ser encarado como um tratamento alternativo que substituiria os tratamentos convencionais, mas sim como um tratamento complementar que poderia ser utilizado em combinação com estes.

6.8. A descoloração de efluentes de indústrias de papel e celulose pode ser utilizada como um bom parâmetro para se realizar a seleção de fungos bons produtores de enzimas ligninolíticas.

6.9. A natureza oxidativa do processo de biodegradação de efluente pode ser verificada pelo aumento do conteúdo de grupamentos carboxílicos e carbonílicos, verificado tanto por UV, quanto por IR. Uma via possível de formação de grupamentos  $\alpha$ -carbonílicos arilconjugados é a oxidação de  $\alpha$ -hidroxiácidos ou  $\alpha$ -álcoois aromáticos de baixo peso molecular, provenientes da degradação parcial de estruturas de alta massa molecular

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akamatsu, Y. ; Ma, D. B. ; Higuchi, T. e Shimada, M. (1990) A Novel Enzymatic Decarboxylation of Oxalic Acid by the Lignin Peroxidase System of White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* FEBS Letters 269 (1) : 261-263.
2. Adler, E. (1977) Lignin Chemistry- Past, Present and Future- Wood Science Technology 11 : 169-218.
3. Ander, P. (1994). The Cellobiose-Oxidizing Enzymes CBQ and CBO as Related to Lignin and Cellulose Degradation - A Review. FEMS Microbiology Reviews 13 : 297-312.
4. Ander, P. (1996). Effects of Cellobiose Dehydrogenase on Guaiacyl and Guaiacyl/Syringil Lignins in the Presence of Iron and Hydrogen Peroxide. Holzforschung 50 : 413-419.
5. Ander, P. e Eriksson, K-E (1987) Determination of phenoloxidase activity using vanilic acid decarboxilation and syringaldazine oxidation Biotechnology and Applied Biochemistry 9, 160-169.
6. Ander, P. ; Mishra, C. ; Farrell, R. L. e Eriksson, K-E (1990) Redox Reactions in Lignin Degradation: Interactions Between Laccase, Different Peroxidases and Cellobiose:Quinone Oxido Reductase Journal Biotechnology. 13, 189-198.
7. APHA AWWA (1989) Standart Methods for Examination of Water and Wastewater 550B, 17thEdition. American Public Health Association, New York, pp. 5.58-5.69
8. Archibald, F.; Bourbonnais, R ; Jurasek, L. ; Paice, M.G., e Reid, I. D. (1997) Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor* Journal of Biotechnology 53, 215-236.
9. Archibald, F. e Roy, B. (1992). Production of Manganic Chelates by Laccase from the Lignin-Degrading Fungus *Trametes (Coriolus) Versicolor*. Applied and Environmental Microbiology. 58 (5) : 1496-1499.
10. Archibald, F.; Paice, M.G. e Jurasek, L. (1990) Decolorization of Kraft Bleachery Effluent Chromophores by *Coriolus (Trametes) Versicolor*. Enzyme Microbiology. Technology 12, 846-853.
11. Aulin-Erdtman, G. e Sandén, R. (1968) Spectrographic Contributions to Lignin Chemistry Acta Chemica Scandinavica 22 : 1187-1209.
12. Aust, S.D. (1990) Degradation of Environmental Pollutants by *Phanerochaete*

*chrysosporium* Microbiology Ecology 20 : 197-209.

13. Axegard, P.; Bergnor, E.; Ek, M. e Ekholm, U. (1996) Bleaching of Softwood Kraft Pulp With H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, and ClO<sub>2</sub>. Tappi Journal, Vol. 79. (1) : 113-119.
14. Barr, D. P. e Aust, S. D. (1994) Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants Environmental Science Technology. 28 (2) : 78A-87A.
15. Bergbauer, M. (1991). Degradation and Oligomerization of Syringic Acid By Distinctive Ecological Groups of Fungi. Microbiology Ecology. 21: 73-84.
16. Bergbauer, M ; Eggert, C. e Kalnowski, G. (1992) Biotreatment of Pulp Mill Bleachery Effluents with the Coelomycetous Fungus *Stagnospora gigaspora* Biotechnology Letters 14 (4) : 317-322.
17. Bergbauer, M e Eggert, C. (1994) Degradability of Chlorine-free Bleachery Effluent Lignins by Two fungi: Effects on Lignin Subunit Type and on Polymer Molecular Weight. Canadian Journal Microbiology 40 : 192-197.
18. Blanchete, R. A. (1991) Delignification by Wood-Decay Fungi Annual Reviews Phytopatology 29 : 381-398.
19. Bland, D. E. (1985) Eucalypt Lignin Appita 38 (1) 53-56.
20. Bollag, J-M. ; Shuttleworth, K. L. e Anderson, D. H. (1988) Laccase-Mediated Detoxification of Phenolic Compounds Applied Environmental Microbiology 54 (12) : 3086-3091.
21. Boominathan, K. e Reddy, A. (1992) em “ Fungal Degradation of Lignin: Biotechnological Applications” Handbook of Applied Mycology, vol 4 Editado por Marcel Dekker Inc, N. York pag 795-798.
22. Bourbonnais, R ; Paice, M G ; Reid, I D ; Lanthier, P e Yaghuchi, M (1995) Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,2-azinobis-(3-ethylbenzethiazoline-6-sulphonate) in Kraft Lignin Depolymerization. Applied Environmental Microbiology 61:1876-1880
23. Bourbonnais, R e Paice, M.G. (1990) Oxidation of non-Phenolic Substrates: An Expanded Role for Laccase in Lignin biodegradation FEBS Letters 267 (1) : 99-102.
24. Boyle, C. D.; Kropp, B R e Reid, I D (1992) Solubilization and Mineralization of Lignin by White Rot Fungi. Appl Envirom Microbiol 58: 3217-3224
25. Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of

- Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein Dye Binding  
Anal. Biochem. 72, 248-254.
26. Brauns, F. E.(1952) em "Lignins-Ultraviolet Spectra" In Chemistry of Lignin, New York, Academic Press. pp. 246-258.
  27. Bulich, A.A. (1979) Use of Luminescent Bacteria for Determining Toxicity in Aquatic Environments. Em " Aquatic Toxicology" Ed. Markings, L. L. and Kierle, R. A. American Society for Testing and Materials , Philadelphia, PA, USA pp 98-106.
  28. Bumpus, J. A. (1993) White-Rot Fungi and Their Potential Use in Soil Bioremediation Process. In Soil Biochemistry . Editado por Bollag J. M. , Statzkym G. New York : Marcel Dekker Inc. pp. 65-100.
  29. Call, H. P. e Mucke, I. (1997) History, overview and applications of mediated ligninolytic system, especially Laccase-Mediator System (LMS) Journal of Biotechnology 53,163-202.
  30. Carlberg, G. E. ; Kringstad, A. ; Martinsen, K. e Nashaug, O. (1987) Environmental Impact of Organochlorine Compounds Discharged from the Pulp and Paper Industry Paperi já Puu- Paper och Trä 4 : 337-341.
  31. Cates, D.K.; Eggert, C; Yang, J.L. e Eriksson, K.E. (1995). Comparison of Effluents from TCF and ECF Bleaching of Kraft Pulps - Tappi Journal, Vol. 78 (12) : 93-98.
  32. Chen, C. L. e Chang, H-M (1983) Carboxylic Acids Produced Through Oxidative Cleavage of Aromatic Rings During Degradation of Lignin in Spruce Wood by *Phanerochaete Chrysosporium*. Journal of Wood Chemistry and Technology, 3 (1) : 35-57.
  33. Chen, C.L. ; Chua, M.G.S.; Evan, J. e Chang, H.-M (1982) C-NMR Spectroscopic Study of Spruce Lignin Degraded by *Phanerochaete Chrysosporium*. Holzforschung 36 : 239-247.
  34. Chua, M.G.S.; Chen, C.L. e Chang, H.-M.(1982). C-NMR Spectroscopic Study of Spruce Lignin Degraded by *Phanerochaete Chrysosporium*. Holzforschung 36, 165-172.
  35. Chua, M.G.S.; Choi, S. e Kirk, T.K. (1983) Mycelium Binding and Depolymerization of Synthetic C-Labeled Lignin During Decomposition by *Phanerochaete Chrysosporium* Holzforschung 37 (2) : 55-61.
  36. Constam,D. ; Muheim, A. ; Zimmermann, W. e Fiechter, A. (1991) Purification and Characterization of an Intracellular NAPH:Quinone Oxidoreductase from *Phanerochaete Chrysosporium* . Journal General Microbiology 137 : 2209-2214.

37. Corbett, J. (1966) The Chemistry of Hidroxyquinones. Part I. The Reaction of 2-Hidroxybenzoquinones with Alkaline Hydrogen Peroxide *Journal Chemistry Society (C)* 2308-2311.
38. Cowan, R.M.; Love, N.G.; Sock, S.M. e White, K. (1995). Activated Sludge and Other Aerobic Suspended Culture Processes. *Water Environment Research*, Vol.67 (4) 433-450.
39. D'almeida M. L. O. (1982) em " Composição Química dos Materiais" em *Celulose e Papel - Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica*" vol I Ed. IPT- São Paulo, SP pp 42-54
40. Daniel, G. (1994) Use of Electron Microscopy for Aiding our Understanding of Wood Biodegradation *FEMS Microbiology Reviews* 13 : 199-233
41. Dec, J. e Bollag, J-M (1994) Use of Plant Material for the Decontamination of Water Polluted with Phenols *Biotechnology and Bioengineering* 44 : 1132-1139.
42. Durán, N ; Rodriguez, J ; Ferraz, A. e Campos, V. (1987) *Chrysonilia sitophila*: A Hyperlignolytic Strain *Biotechnology Letters* 9: 357-360.
43. Durán, N ; Rodriguez, J. e Ferrer, I. (1987) Ligninases from *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441 strain). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 16 : 157-163.
44. Durán, N ; Espósito, E. e Canhos, V. P. (1993) Kraft Mill Effluent: Biological Treatment. Em *Cellulosics: Pulp, Fibre and Environmental Aspects* (J.F. Kenney, G.O. Phillips and P. A. Williams, Eds) Ellis Forwood ser in *Polymer Science, and Technology*. Chapter 73 : 493-498.
45. Dutton, M V ; Evans, C S ; Atkey, P T e Wood, D A (1993) Oxalate Production by Basidiomycetes, Including The White-Rot Species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* *Applied Microbiological Biotechnology* 39: 5-10
46. Espósito, E. Canhos, V. P. e Durán, N (1991) Screening of Lignin-Degrading Fungi for Color Removal from Kraft Mill Wastewater with Additional Extra Carbon-Source. *Biotechnology Letters* 13 : 571-576.
47. Eriksson, K.-E. L. (1990) Biotechnology in the Pulp and Paper Industry *Wood Science Technology* 24: 79-101 .
48. Erickson, K-E ; Kolar ; M-C ; Ljungquist, P.O. e Kringstad, K.P. (1985) Studies on Microbial and Chemical Conversions of Chlorolignins *Environmental Science Technology* 19 (2) : 1219-1224.

49. Faix, O.; Mozuch, M.D. e Kirk, T.K. (1985). Degradation of Gymnosperm (Guaiacyl) vs. Angiosperm (Syringyl/Guaiacyl) Lignins by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Holzforschung* 39 (4) : 203-208.
50. Faix, O. (1986) Investigation of Lignin Polymer Models (DHPs) by FTIR Spectroscopy *Holzforschung* 40 (5) : 273-280
51. Faix, O. (1991) Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy *Holzforschung* 45: 21-27
52. Faix, O.; Grunwald, C. e Beinhoff, O. (1992) Determination of Phenolic Hydroxyl Group Content of Milled Wood Lignins (MWL's) from Different Botanical Origins Using Selective Aminolysis, FTIR, <sup>1</sup>H-NMR, and UV Spectroscopy *Holzforschung* 46(5): 425-432
53. Farcher, S. ; Neugebauer, A. ; Messner, K. e Hruschka, A. (1985) Klärung von Bleichereiabwasser Osterreichischer Zellstoff-Fabriken nach dem MyCor-Verfahren. *Holzforschung, Holzverwert* 37 : 89-95.
54. Feijoo, G.; Vidal, G.; Moreira, M.T.; Mendez,R. e Lema, J.M. (1995) Degradation of High Molecular Weight Compounds of Kraft Pulp Mill Effluents by a Combined Treatment With Fungi and Bacteria. *Biotechnology Letters*. Vol. 17 (11) : 1261-1266.
55. Fengel, D. e Wegener, G. (1989) em *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin pp 66-75.
56. Ferrer, I.; Dezotti, M. e Durán, N. (1991) Decolorization of Kraft Effluent by Free and Immobilized Lignin Peroxidase and Horseradish Peroxidase. *Biotechnological Letters* 13: 577-582.
57. Fleury, R. A. e Rapson, W. H. (1968) Characterization of Chromophoric Groups in Grounwood and Lignin Model Compounds by Reaction with Specific Reducing Agents *Pulp and Paper Magazine of Canada* 67 : 62-68.
58. Fugio, M.; McIver, R. T. e Taft, R. W. (1981) Effects on the Acidities of Phenols from Specific Substituent-Solvent Interactions. Inherent Substituent Parameters from Gas-Phase Acidities *Journal American Chemical Society* 103: 4017-4029
59. Galliano, H.; Gas, G. ; Seris, J. L. e Boudet, A. M. (1991) Lignin Degradation by *Rigidoporus Lignosus* Involves Synergistic Action of Two Oxidizing Enzymes: Mn Peroxidase and Laccase *Enzyme Microbial Technology*. 13:478-482

60. Gasparic, J.; Svobodová, D. e Matysová, A. (1974) A Contribution to the Chromatography of Phenols as Antipyrine Dyes *Journal of Chromatography* 88: 264-369
61. Gierer, J. (1982). The Chemistry of Delignification. Part I *Holzforschung* 36 (1) : 43-51.
62. Gierer, J. (1982). The Chemistry of Delignification. Part II *Holzforschung* 36 (2) : 55-64.
63. Glenn, J. K. e Gold, M. H. (1985) Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II)-Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* *Archives of Biochemistry and Biophysics* 242 (2) 329-341.
64. Goldschmid, O. (1954) Determination of Phenolic Hydroxyl Content of Lignin Preparations by Ultraviolet Spectrophotometry *Analytical Chemistry* 26(4): 1421-1423
65. Graves, J.; Jameel, H. e Joyce, T.W. (1995). Removal of Chlorophenolics from an Aerated Lagoon. *Tappi Journal* Vol. 78 (5) : 99-104.
66. Grzywnowicz, K. (1995) Proteolysis of Some Fungal Phenol Oxidases by Homological and Heterological Proteases *Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry Advances in Applied and Fundamental Research, Austria* pp. 385-388.
67. Gundersen, J. L. e MacIntyre, W. G. (1996) Dissociation Constants of Chloroguaiacols in Water: A Comparison of Measured and Predicted Values *Environmental Toxicology Chemistry*, 15(6): 809-813
68. Haberl, R.; Urban, W.; Gehringer, P. e Szinovatz, W. (1991). Treatment of Pulp Bleaching Effluents by Activated Sludge Precipitation, Ozonation And Irradiation. *Waters Science Techonology*. Vol.24 (4) : 229-239.
69. Haider, K.; Kern, H.W. e Ernst, L. (1985) Intermediate Steps of Microbial Lignin Degradation as Elucidate by C-NMR Spectroscopy Of Specifically <sup>13</sup>C-Enriched DHP-Lignins. *Holzforschung* 39 (1) : 23-32.
70. Hammel, K.E.; Kalyanaraman, B. e Kirk, K. (1986) Substrate Free Radicals Are Intermediates in Ligninase Catalysis. *Proceedings National Academy Science. Usa*. Vol. 83 : 3708-3712.
71. Hammel, K E e Moen, M A (1991) Depolymerization of a Synthetic Lignin *in Vitro* by Lignin Peroxidase. *Enzyme Microbial Technology*. 13: 15-18

72. Hanselmann, K. W. (1982) Lignochemicals *Experientia* 38 :176-188
73. Harvey, P. J. ; Schoemaker, H. E. e Palmer, J.M. (1986) Veratryl Alcohol as a Mediator and the Role of Radical Cation in Lignin Biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 195 : 242-246.
74. Hatakka, A (1994) Lignin-Modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation. *FEMS Microbiological Reviews* 13, 125-135.
75. Hatakka, A. ; Mettala, A. ; Toikka, M. ; Hortling, B. e Brunow, G. (1995) Modification of Lignin by Laccase and Manganese Peroxidase. Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry Advances in Applied and Fundamental Research, Austria pp. 333-338.
76. Hemingway, R.W.; Hillis, W.E. e Bruerton, K. (1970). A Gas-Liquid Chromatographic Examination of Stilbene Derivatives. *Journal of Chromatography* 50 : 391-399.
77. Hergert, H.L. e Kurth, E. F. (1953) The Infrared Spectra of Lignin and Related Compounds. I. Characteristic Carbonyl and Hydroxyl Frequencies of Some Flavonones, Flavones, Chalcones and Acetophenones *Journal Organic Chemistry* 75 : 1622-1625
78. Hergert, H. L. (1960) Infrared Spectra of Lignin and Related Compounds. II. Conifer Lignin and Model Compounds. *Journal Organic Chemistry* 25: 405-413
79. Highley, T.L. (1982). Influence of Type and Amount of Lignin on Decay by *Coriolus Versicolor*. *Canadian Journal Forest Research* Vol. 12 : 435-439.
80. Higuchi, T. (1990) Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation *Wood Science Technology* 24 : 23-63.
81. Imura, Y.; Hartikainen, P. e Tatsumi, K. (1996) Dechlorination of Tetrachloroguaiacol by Laccase of White-Rot Basidiomycete *Coriolus versicolor* *Applied Microbiological Biotechnology* 45 : 434-439.
82. Jaspers, C.J.; Jimenez, G. e Penninckx, M.J.(1994). Evidence For A Role of Manganese Peroxidase in The Decolorization of Kraft Pulp Bleach Plant Effluent by *Phanerochaete Chrysosporium*: Effects of Initial Culture on Enzyme Production. *Journal of Biotechnology* 37 : 229-234.
83. Jeney, Z. ; Valtonen, E. T. ; Jeney, G. e Jokinen, E. I. (1996) Effects of Pulp and Paper Mill Effluent (BKME) on Physiology and Biochemistry of the Roach (*Rutilus rutilus* L.) *Archive Environmental Contaminant Toxicology* 30 523-529.

84. Johannes, C ; Majcherczyk, A e Huttermann, A ( 1996) Degradation of Anthracene by Laccase of *Trametes Versicolor* in the Presence of Different Mediator Compounds Applied Microbiology Biotechnology 46:313-317
85. Jokela, J. K. e Salkinoja-Salonen, M. (1992) Molecular Weight Distributions of Organic Halogens in Bleached Kraft Pulp Mill Effluents. Environmental Science Technology. 26 :1190-1197.
86. Katherine, E. (1965) em " Plant Anatomy" 2th ed. John Wiley Inetrnational- New York pp. 35, 49.
87. Kawai, S. ; Umezawa, T. ; Shimada, M. e Higuchi, T. (1988) Aromatic Ring Cleavage of 4,6-di(ter-butyl)guaiacol, a Phenolic Lignin Model Compound, by Laccase of *Coriolus versicolor* FEBS Letters 236 (2) : 309-311.
88. Kawai, S. ; Umezawa, T. e Higuchi, T. (1988) Degradation Mechanisms of Phenolic  $\beta$ -1 Lignin Substructure Model Compounds by Laccase of *Coriolus versicolor* Archives of Biochemistry and Biophysics 262 (1) : 99-110.
89. Kersten, P J ; Kalyanaraman, B ; Hammel, K E ; Reinhammar e Kirk, T K (1990) Comparison of Lignin Peroxidase, Horseradish Peroxidase and Laccase in the Oxidation of Methoxybenzenes Biochemistry Journal. 268: 475-480.
90. Kersten, P J (1990) Glyoxal Oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its Characterization and Activation by Lignin Peroxidase Proceedings of National Academy of Science USA 87:2936-2940.
91. Kirk, T. K. ; Connors, W. J. ; Blean, R. D. ; Hackett e Zeikus, J. G. (1975) Preparation and Microbial Decomposition of Synthetic [ $^{14}$ C]Lignins Proceedings of National Academy of Science USA 72 (7) 2515-2519.
92. Kirk, T. K. ; Eaton, D. C. ; Yang, H. H. e Chang, H-M. (1981) Decolorization of Pulp Mill and Bleach Plant Effluent Using Lignin-Degrading Fungi US Pat Appl VS237186 AO.
93. Kirk, T. K. e Farrell, R. L. (1987) Enzimatic "Combustion": the Microbial Degradation of Lignin Annual Reviews Microbiology 41: 465-505
94. Korhonen, I.O.O. e Knootinen, J. (1983) Gas Chromatographic and Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Studies of Acetate Esters of Chlorinated Phenols. Journal of Chromatography, 256 : 135-142.

95. Krinstad, K.P. e Lindstrom, K. (1984) Spent Liquors from Pulp Bleaching. *Environmental Science Technology* 18(8): 236A-248A.
96. Kurek, B.; Martinez-Inigo, M.J. e Monties, B. (1995) Oxidation of Guaiacyl, Syringyl, and *p*-Hydroxyphenyl Structures During Lignin Degradation by Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry Advances in Applied and Fundamental Research, Austria pp. 421-425..
97. Kuwahara, M. ; Glenn, J.K. ; Morgan, M. A. e Gold, M. (1984) Separation and Characterization of Two Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dependent Oxidase from Ligninolytic Culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169 (2) , 247-249.
98. Lachenal, D. ; Fernandes, J. C. e Froment, P. (1995) Behaviour of Residual Lignin in Kraft Pulp During Bleaching. *Journal of Pulp and Paper Science* 21 (5) :173-177.
99. Lackner, R. ; Srebotnik, E. e Messner, K. (1991) Oxidative Degradation of High Molecular Weight Chlorolignin by Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 178 (3) 1092-1098.
100. Lapiere, C.; Pollet, B. e Monties, B. (1991). Thioacidlysis of Spruce Lignin: GC-MS Analysis The Main Dimers Recovered After Raney Nickel Desulphuration. *Holzforschung* 45 (1) : 61-68.
101. Lehtinen, K.J. (1992). Environmental Effects of Chlorine Bleaching - Facts Neglected? *Paperi Ja Puu - Paper and Timber*, Vol. 74 ( 9) : 715-719.
102. Lindstrom, e Osterberg, F. (1984) Characterization of the High Molecular Mass Chlorinated Matter in Spent Bleach Liquors (SBL). Part 1. Alkaline SBL *Holzforschung* 38(4) : 201-212
103. Lindstrom, K. e Nordin, J. (1976). Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Chlorophenols in Spent Bleach Liquors. *Journal of Chromatography* 128 : 13-26.
104. Livernoche, D. ; Jurasek, L. ; Desrocher, M. e Dorica, J. (1983) Removal of Color from Kraft Mill Wasterwaters With Cultures of White-Rot Fungi and With Immobilized Mycelium of *Coriolus versicolor* *Biotechnology Bioengineering* 25: 2055-2058.
105. Livingstron, A. G. (1994) Extractive Membrane Bioreactors: A New Process Technology for Detoxifying Chemical Industry Wastewters *Journal Chemistry Technology Biotechnology* 60 : 117-124.

106. Lo, S.N.; Lavallee, H.C.; Rowbottom, R.S.; Meunier, M.A. e Zaloum, R. (1994). Activated Sludge Treatment of TMP Mill Effluents. *Tappi Journal*, Vol. 77 (11) : 167-178.
107. Lowe, D. A. (1992) em "Fungal Enzymes" in *Handbook of Applied Mycology*, vol 4 Editado por Marcel Dekker Inc, N. York pag 681-706.
108. Manzanares, P.; Fajardo, S. e Martins, C. (1995). Production of Ligninolytic Activities When Treating Paper Pulp Effluents By *Trametes Versicolor*. *Journal of Biotechnology* 43 : 125-132.
109. Martin, V.J.J.; Burnison, B.K.; Lee, H. e Hewitt, L.M. (1995). Chlorophenolics from High Molecular Weight Chlorinated Organics Isolated from Bleached Kraft Mill Effluents. *Holzforschung*, Vol. 49 (5) : 453-461.
110. Marzulo, L ; Cannio, R ; Giardina, P.; Palmieri, G.; Aurilia, E. e Sannia, G. (1995) Cooperative Action of *Pleurotus Ostreatus* Enzymes in Lignin Biodegradation Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Advances in Applied and Fundamental Research
111. Mcdonough, T.J. (1995). Recent Advances in Bleached Chemical Pulp Manufacturing Technology *Tappi Journal*, Vol. 78 (3) : 55-62.
112. Mccubbin, N. e Folke, J. (1995). Significance of AOX Vs Unchlorinated Organics *Pulp & Paper Canada* 96 (2) : 43-48.
113. Messerschmidt, A. e Huber, R. (1990) The Blue Oxidases, Ascorbate Oxidases, Laccases and Ceruloplasmin. *European Journal Biochemistry* 187 : 341-352.
114. Mester, T.; Jong, E. e Field, J.A.(1995). Manganese Regulation of Veratryl Alcohol in White-Rot Fungi and Its Indirect Effects on Lignin Peroxidase Applied *Environmental Microbiology*. 61 (5) : 1881-1887.
115. Michel, F. C.; Balachandra , D. ; Grulke , E. A. e Reddy, C. A. (1991) Role of Manganese Peoxidases and Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in the Decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent. *Applied Environmental Microbiology* 57(8) : 2368-2375.
116. Moilanen, A.M.; Lundell, T.; Vares, T. e Hatakka, A.(1996). Manganese and Malonate Are Individual Regulators for The Production of Lignin and Manganese Peroxidase Isozymes and in the Degradation of Lignin by *Phlebia Radiata*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 45 :792-799.

117. Morgan, P ; Lewis, S. T. e Waltkinson, R. J. (1991) Comparison of Abilities of White-Rot Fungi to Mineralize Selected Xenobiotic Compounds. Applied Microbiological Biotechnology 34 : 693-696.
118. Morita, H. (1972). Identification of Phenolic Acids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Chromatography 71: 149-153.
119. Morohoshi, N ; Wariishi, H ; Murasiso, C ; Nagai, T e Haraguchi, T ( 1987) Degradation of Lignin by the Extracellular Enzymes of *Coriolus versicolor* IV. Properties of Three Laccases Fractionated from the Extracellular Enzymes Mokuzai Gakkaishi 33: 218-225
120. Munkittrick, K.R. ; Portt, C. ; Kraak, G.J.V. ; Smith, G. J. e Rokosh, D. (1991) Impact of Bleached Kraft Mill Effluent on Liver MFO Activity, Serum Steroids, and Population Characteristics of a Lake Superior White Sucker Population. Canadian Journal Fish Aquatic Science 48 : 1371-1380.
121. Myreen, B. (1994). Pulp and Paper Manufacture In Transition Waters Science Techonology Vol. 29 (5) : 1-9.
122. Niemela, K. (1988) GLC-MS Studies on Pine Kraft Black Liquors. Part. I . Holzforschung 42 (3) : 169-175.
123. Niemela, K. (1988). GLC-MS Studies on Pine Kraft Black Liquors. Part. II. Holzforschung 42 (3) : 175-176.
124. Niemela, K (1989). GLC-MS Studies on Pine Kraft Black Liquors. Part V. Holzforschung 43 (2) : 99-103.
125. Niemela, K (1989). GLC-MS Studies on Pine Kraft Black Liquors. Part VI. Holzforschung 43 (3) : 169-171.
126. Niemela, K. e Sjostrom, E. (1985) Identification of  $\alpha$ -Hydroxy-Syringylalkanoic Acids in Birch Kraft Black Liquors. Holzforschung 39 (6) : 365-366.
127. Niemela, K. e Sjostrom, E. (1986). Simultaneous Identification of Aromatic and Aliphatic Low Molecular Weight Compounds from Alkaline Pulping Liquor By Capillary Gas-Liquid Chromatography - Mass Spectrometry Holzforschung 40 (6) : 361-368.
128. Nimz, H. H. e Casten, R. (1986) Chemical Processing of Lignocellulosics Holz als Roh und werkstoff 44 : 207-212.
129. Nutt, W.E.; Pikulin, M.A.; Griggs, B.F. e Eachus, S.W. (1993) Developing An Ozone Bleaching Process Tappi Journal Vol. 76 (3) : 115-123.

130. Obst, J.R. (1982) Guaiacyl And Syringyl Lignis Composition In Hardwood Cell Components. *Holzforschung* 36 (3) : 143-152.
131. Owens, J. W. (1991) The Hazard Assessment of Pulp and Paper Effluents in the Aquatic Environment: A Review *Toxicological Chemistry* 10 : 1511-1540.
132. Peláez, F. ; Martínez, M.J. e Martínez , A. T. (1995) Screening of 68 Species of Basidiomycetes for Enzymes Involved in Lignin Biodegradation *Mycological Research* 99(1) 37-42.
133. Perez, J. e Jeffries, T.W. (1992). Roles Of Manganese and Organic Acid Chelators in Regulating Lignin Degradation and Biosynthesis of Peroxidases by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 58 ( 8) : 2402 -2409.
134. Perez, J. e Jeffries, T.W. (1990). Mineralization of <sup>14</sup>C-Ring-Labeled Syntetic Lignin Correlates with the Production of Lignin Peroxidase, not of Manganese Peroxidase or Laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 56 ( 6) : 1806-1812.
135. Pfister, K. e Sjostrom (1979) Characterization of Spent Bleaching Liquors *Paperi ja Puu- Papper och Trä* 4 : 220-230.
136. Popp, J L ; Kalyanaraman, B e Kirk, T K (1990) Lignin Peroxidase Oxidation of Mn<sup>2+</sup> in the Presence of Veratryl Alcohol, Malonic or Oxalic Acid, and Oxygen *Biochemistry* 29: 10475-10480
137. Reddy, C. A. (1995) The Potential for White-Rot Fungi in the Treatment of Pollutants *Current Opinion in Biotechnology* 6 : 320-328.
138. Reinhammar, B (1984) Laccase. in “ Copper Proteins and Copper Enzymes” Editado por Lontier, R. vol 3 CRC Press Boca Raton, FL pp. 1-36.
139. Renganathan, V. e Gold, M. H. (1986) Spectral Characterization of the Oxidized States of Lignin Peroxidase, an Extracellular Heme Enzyme from the White-Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 25 : 1626-1631.
140. Robert, D. (1989) Biodegradation of Lignin in Spruce Wood by *Phanerochaete chrysosporium* : Quantitative Analysis of Biodegraded Spruce Lignins by <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy *Holzforschung* 43 (5) : 323-332.
141. Rogalski, J. ; Józwik, E ; Hatakka, A. e Leonowicz, A. (1995) Immobilization of Laccase from *Phlebia radiata* on Controlled Porosity Glass. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 95 : 99-108.

142. Rogalski, J.; Lundell, T.; Leonowicz, A e Hatakka, A. (1991) em "Ligninocellulosics- science, Technology, Development and Use". Eds. Kennedy, J. F. ; Phillips, G. O. and Willians, P. A. Ellis Horwwood Publ., New York, pp. 55-60.
143. Roy-Arcand, L. e Archibald, F. S. (1991) Direct Dechlorination of Chlorophenolic Compounds by Laccase from *Trametes (Coriolus) versicolor* Enzyme Microbial Technology. 13 : 194-203.
144. Ruttimann-Johnson, C. ; Salas, L. ; Vicuna, R. e Kirk, T. K (1993) Extracellular Enzyme Production and Syntetic Lignin Mineralization by *Cerioporiopsis subvermispora* Applied and Environmental Microbiology 59 (6) : 1792-1797.
145. Rydholm, S.A. (1965) em "Pulping Process": Interscience Publishers: New York, N.Y.
146. Sarkanen, K. V. e Ludwig , C. H. (1971) Lignins, Occurrence, Formation, Structure and Reactions. New York: Wiley-Interscience . 916 pp.
147. Sarkanen, S. ; Razal, R. A. ; Piccarielo, T. ; Yamamoto, E. e Lewis, N. G. (1991) Lignin Peroxidase: Toward a Clarification of Its Role *in Vivo* Journal Biological Chemistry 266 (6) : 3636-3643.
148. Saunamaki, R. (1995) Treatability of Wastewaters from Totally Chlorine-Free Bleaching Tappi Journal Vol. 78 (8) : 185-192.
149. Seger, G. E. ; Chang, H-M e Jameel, H. (1991) Chlorine Dioxide Reactions with Nonphenolic Lignin Model Compounds Tappi Journal 195-196
150. Sema (Secretaria Especial do Meio Ambiente) (1988) "Manual de Testes para a Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos" Editado pelo Ministério do Interior- Coord. Marília Marreco Cerqueira 1ª ed. , Brasília, DF.
151. Shimada, M ; Deng-Bo Ma ; Akamatsu, Y e Hattori, T (1994) A Proposed Role of Oxalic acid in Wood Decay Systems of Wood-Rotting Basidiomycetes FEMS Microbiological Reviews 13: 285-296
152. Silverstein, R. M ; Bassler, G. C. e Morrill (1991) em " Spectrometric Identification of Organic Compounds" Ed. John Wiley & Sons, INC. 5 th ed. New York pp 91-132.
153. Slimak, M. ; Brezny, R. e Joyce, T. W. (1993) Organic Chlorine Structures in Chlorolignin *Holzforshung* 47 : 369-374.

154. Smith, T.J.; Wearne, R.H. e Wallis, A.F.A. (1995) Formation Of Chlorinated Phenols During Bleaching of Eucalypt Kraft Pulps. *Holzforschung* 49 (3): 279-284.
155. Smith, T.J.; Wearne, R.H. e Wallis, A.F.(1993) Determination of Chlorinated Benzaldehydes and Acetophenones in Pulp Bleaching Effluents by Gas Chromatography. *Journal of Chromatography*. 648, 289-293.
156. Srebotnik, E. ; Jensen, Jr. K. A. e Hammel, K. E. (1994) Fungal Degradation of Recalcitrant Nonphenolic Lignin Structures Without Lignin Peroxidase *Proceedings National Academy Science USA* 91 : 12794-12797.
157. Srinivasam, D. e Unwin, J. P. (1995) Pulp and Paper Effluent Management. *Water Environmental Research*. Vol. 67 (4) : 531-544.
158. Stegeman, J. e Jimenez, B. D. (1990) Detoxification Enzymes as Indicators of Environmental Stress on Fish in "Biological Indicators of Stress in Fish" Symposium 8 of The American Fisheries Society Ed. Adans, S. M., Bethesda, Maryland, USA pp 67-79.
159. Strumberg, L.M.; Sousa, F.; L.Jungquist, P e Et Al., (1987). An Abundant Chlorinated Furanone in The Spent Chlorination Liquor From Pulp Bleaching. *Environmental Science Technology* 21(8) : 754-756.
160. Sundman, G.; Kirk, T.K. e Chang, H. M. (1981) Fungal Decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent. Fate of Chromophoric Material. *Tappi Journal*. 64: 145-148
161. Suntio, L.R.; Shiu, W.Y. e Mackay, D. (1988) A Review of the Nature and Properties of Chemicals Present in Pulp Mill Effluents. *Chemosphere* 17(7): 1249-1290
162. Szklarz, G e Leonowicz, A (1986) Cooperation Between Fungal Laccase and Glucose Oxidase in the Degradation of Lignin Derivatives *Phytochemistry*. 25: 2537-2539.
163. Tan, L. U. L. ; Mayers, P. e Saddler, J. N. ( 1987) Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from a Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Canadian Journal Microbiology* 33 : 689-694.
164. Thurston, C. F. (1994) The Structure and Function of Fungal Laccases *Microbiology* 140 : 19-21.
165. Tien, M. e Kirk , T K. (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* : Purification, Characterization and Catalytic Properties of the Unique

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Requiring Oxygenase. Proceedings National Academy Science USA 81 : 2280-2284

166. Thomas, P. (1990) Molecular and Biochemical Responses of Fish to Stressors and Their Potential Use in Environmental Monitoring in "Biological Indicators of Stress in Fish" Symposium 8 of The American Fisheries Society Ed. Adans, S. M., Bethesda, Maryland, USA pp 9-28
167. Tonon, F. e Odier, E. (1988) Influence of Veratryl Alcohol and Hydrogen Peroxide on Ligninase Activity and Ligninase Production by *Phanerochaete chrysosporium* Applied Environmental Microbiology 54 (2) 466-472.
168. Trotter, P. (1990) Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: a Review Tappi Journal 198-204
169. Tsutsumi, Y.; Kondo, R.; Sakai, K. e Imamura, H. (1995). The Difference of Reactivity Between Syringyl Lignin and Guaiacyl Lignin in Alkaline Systems. Holzforschung 49 (5) : 423-428.
170. Tapia, J. e Vicuna, R. (1995) Synthetic Lignin Mineralization by *Cerioporiopsis subvermispota* Is Inhibited by an Increase in the pH of the Cultures Resulting from Fungal Growth Applied Environmental Microbiology 61 (7) : 2476-2481.
171. Tuor, U., Winterhalter, K. e Fiecher, A. (1995) Enzymes of White-Rot Fungi Involved in Lignin Degradation and Ecological Determinants For Wood Decay Journal of Biotechnology 4 :11-17.
172. Vares, T. ; Niemenmaa, O. e Hatakka, A. (1994) Secretion of Ligninolytic Enzymes and Mineralization of <sup>14</sup>C-Ring-Labelled Synthetic Lignin by Three *Phlebia tremellosa* Strains Applied Environmental Microbiology 60 (2) : 569-575.
173. Virkki, L. (1992) Characterization of Chlorolignins Compared with Humic Substances Using <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR and IR Spectroscopy. International Journal Environmental Analytical Chemistry 29: 149-161
174. Wariishi, H. ; Akileswaran, L. e Gold, M. H. (1988) Manganese Peroxidase from Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* : Spectral Characterization of the Oxidized States and the Catalytic Cycle Biochemistry 27 : 5365-5370.
175. Wariishi, H. ; Valli, K. e Gold, M. H. (1991) InVitro Depolymerization of Lignin by Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* Biochemical and Biophysical Research Communications 176 (1) : 269-275.
176. Wariishi, H. e Gold, M. H. (1990) Lignin Peroxidase Compound III. Mechanism of Formation and Decomposition. Journal Biological Chemistry 265 : 2070-2077.

177. Weeks, B. e Oleszkiewicz, J.A. (1994) Shock Loading Lagoons and Activated Sludge Treating Bleached Kraft Mill Wastewater *Pulp & Paper Canada*. 95 (8) : 15-18.
178. Wexler, A. S. (1964) Characterization of Lignosulfonates by Ultraviolet Spectrometry *Analytical Chemistry*. 36, 213-221
179. Yadav, J. S. ; Quensen, J. F. III, Tiedje, J. M. e Reddy, C. A. (1995) Degradation of Polychlorinated Biphenyl (PCB) Mixtures Aroclor 1242, 1254, 1260 by the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* as Evidenced by Congener Specific Analysis *Applied Environmental Microbiology* 61 (2) 745-751.
180. Yang, R.D. e Humphrey, A.E. (1975) Dynamic and Steady State Studies of Phenol Biodegradation in Pure and Mixed Cultures *Biotechnological Bioengineering* 17: 1211-1235.
181. Yaver, D. S. ; Xu, F ; Golightly, E.J. ; Brown, K. M. ; Brown, S. H. ; Rey, M. W. ; Schneider, P. ; Halkier, T. ; Mondorf, K. e Dalboge, H. (1996) Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of Two Laccase Genes from White-Rot Basidiomycete *Trametes villosa* *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3) : 834-841.