

Oxidação biológica de compostos orgânicos fenólicos em reator em batelada utilizando resíduo de cupuaçu como fonte de carbono indutor

Libertalamar SARAIVA⁽¹⁾; Ana Paula CARVALHO⁽²⁾; Sônia Maria LIMA⁽³⁾

(1, 2,3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. Sete de Setembro, 197, Centro, Manaus, Fone: (92) 33044786 e-mail: liberta.saraival@ifam.edu.br; paullinha_2808@hotmail.com; smlima@ifam.edu.br.

RESUMO

Nesta pesquisa a fonte de carbono indutor na degradação biológica de fenol foi substituída de glicose por resíduos do processamento do cupuaçu. Foram estudadas duas espécies de fungos: o *Aspergillus* sp. já utilizado em trabalhos anteriores e o *Trichoderma* sp. A pesquisa foi realizada em duas etapas experimentais: Na primeira, os dois fungos foram isolados e cultivados em meio Agar Batata por sete dias e inoculados nos reatores de bancada erlenmeyer (RB). Foram avaliados separadamente para verificar a sua eficiência na degradação de compostos fenólicos. Os experimentos foram desenvolvidos em RB com inoculação de 1,0 mL de suspensão fúngica, contendo 250 mL do efluente sintético em cada reator e 50 (mg/L) em DQO de resíduos de cupuaçu com diferentes concentrações de fenol. O desenvolvimento dos fungos e a remoção de matéria orgânica foram avaliados pelo parâmetro DQO durante 28 dias com intervalos de 7 dias. Os resultados obtidos mostraram que a eficiência do *Aspergillus* sp., é superior a eficiência a do *Trichoderma* sp. Na segunda etapa foram inoculados os dos dois fungos juntos no reator em batelada sequencial de leito submerso para verificar o possível sinergismo. Através dos resultados obtidos foi possível concluir que o *Trichoderma* sp não inibe o *Aspergillus* sp, e há um sinergismo, o que leva a um tempo menor de reação com a mesma eficiência, proporcionando aumentos na quantidade de fenol degradado.

Palavras-chave: Remoção de fenol, *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., Resíduos de cupuaçu, Reator em batelada de bancada sequencial de leito submerso.

1 INTRODUÇÃO

O surgimento de novas tecnologias e produtos promoveu não só a industrialização, mas também problemas ambientais por causa do aumento excessivo da utilização de produtos químicos em todas as partes do mundo. Mecanismos de controle dos processos de contaminação ambiental estão sendo desenvolvidos com novas metodologias de determinação e quantificação dos diversos tipos de poluentes. Dentre eles, os poluentes orgânicos, são os que têm maiores quantidades distribuídos nos meio ambientes, como compostos fenólicos e seus derivados.

Estes compostos fenólicos, geralmente apresentam-se em efluentes industriais em altas concentrações e sua remoção é onerosa e de difícil tratamento no meio ambiente. A utilização de fungos vem sendo estudada como alternativa em tratamento biológico, devido os fungos produzirem enzimas extracelulares, cujas ações tornam os organopoluentes mais acessíveis a biodegradação. Além disso, os fungos são organismos capazes de suportar mudanças bruscas na concentração de matéria orgânica, são capazes de tolerar grandes variações no pH, temperatura, além de suportar a escassez de umidade e de oxigênio, dando viabilidade ao trabalho.

Este trabalho propõe estudar a oxidação de compostos fenólicos com os fungos *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp., usando resíduos do processamento de cupuaçu como fonte de carbono indutor sendo, portanto alternativa de baixo custo para o tratamento do meio ambiente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os compostos fenólicos são encontrados no meio ambiente como resultado da decomposição de substâncias húmicas, ligninas e taninos em concentrações menores que os gerados pelas atividades antrópicas (Timur et al, 2004). Além disso, são entre os resíduos orgânicos, os de maior potencial poluidor, em virtude de suas características ácidas, tóxicas e bactericida, exigindo tratamento antes de serem lançados em corpos d'água (Bolños et al, 2001) por ocasionarem graves problemas para biota local e para a saúde humana.

Caracterizam-se pela presença de hidroxila (OH^-) diretamente ligada a um anel benzênico (Vinciguerra *et al.*, 1995). Alguns de seus subprodutos são clorofenóis e cresóis. Estão presentes, nas mais diferentes concentrações, em diversos tipos de águas residuárias, industriais, farmacêuticas e têxteis, de resinas e de papel, em efluentes de fundições de metais e refinarias de petróleo, bem como em águas regionais, como as residuárias de oficinas mecânicas e postos de gasolina, onde ocorre despejo de poluentes tóxicos ao meio ambiente (COLL, 1993).

Os fungos vêm sendo estudados quanto sua aplicação para recuperação de ambientes degradados por poluentes químicos, pois eles produzem inúmeras enzimas como lactase, proteases, ligninases, lipases, celulasas, entre outras, as quais podem atuar sobre determinado poluente orgânico, tornando-o mais acessível à biodegradação e no tratamento de substâncias recalcitrantes (Bumpus *et al.* 1985). Pode-se ainda citar como fatores indicadores da aplicabilidade dos fungos sua capacidade de suportar possíveis choques nas cargas orgânicas e hidráulicas e bruscas variações de pH, luz, umidade e oxigênio (SANTAELLA *et al.* 1996).

O tratamento de águas residuárias contendo compostos fenólicos pelo uso de reatores com fungos tem mostrado ser viável devido à obtenção de efluente com menor toxicidade e diminuição da concentração de fenóis. Estes estudos têm demonstrado que eles conseguem quebrar a cadeia fenólica com adição de glicose como fonte primária de carbono, pelo processo de bioissorção que compreende a remoção passiva ou adsorção e a remoção ativa ou assimilação. Alcançando-se valores bastante elevados na remoção de fenóis, pois os mesmos são heterotróficos e obtêm energia degradando matéria orgânica e disponibilizando os produtos resultantes para ação de outros microrganismos, sendo empregados em processos de biorremediação (RODRIGUES et al, 2007).

Os resíduos do processamento de cupuaçu vêm sendo estudados como fonte de carbono indutor por ser uma fonte alternativa e de baixo custo em comparação à glicose atualmente utilizada. O cupuaçu, fruto típico da região Norte do Brasil, tem seu cultivo em terra firme e em alguns locais de várzea (Afonso *et al.* 1995). Sua safra é entre janeiro e maio e apresenta forma esférica ou ovóide, mede até 25 cm e tem a casca dura e lisa com coloração castanho-escuro, as sementes ficam envolvidas por uma polpa branca muito ácida com pH 3.2. Possui baixo teor em açúcares, é rico em proteína e lipídeo, cálcio, fósforo, vitaminas A, B1, B2, e pectina e possui aroma bastante forte. O seu valor econômico está baseado, principalmente, na industrialização e comercialização da polpa, apreciada sob a forma de suco, creme, doces e outros processamentos culinários. O que gera uma grande quantidade de resíduos que necessitam de tratamento e disposição final.

3 DESCRIÇÃO DA PROPOSTA

O trabalho se propôs estudar o processo de degradação biológica de fenóis, por *Aspergillus sp.* e *Trichoderma sp.*, em reator sequencial em batelada de leite submerso utilizando resíduo do processamento de cupuaçu como fonte de carbono indutor.

4 METODOLOGIA, RESULTADOS, ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

4.1 Metodologia

Tendo em vista que este trabalho é uma continuação de pesquisas anteriores nas quais estavam ocorrendo invasões recorrentes por outro tipo de fungo, realizou-se análise microbiológica constatando a presença de um fungo que apresentava colônias esverdeadas, o qual foi identificado como sendo *Trichoderma sp.* Em vista disto optou-se por pesquisar ambos os fungos em duas fases: a primeira estudá-los separadamente para

avaliar a capacidade de cada um em degradar o fenol em ambiente estéril e a segunda estudá-los juntos em reator sequencial em batelada de leito submerso para verificar o possível sinergismo na degradação de fenol.

Foram utilizadas duas espécies fúngicas: o *Aspergillus sp.* (Figura 1) a partir da cepa disponível no acervo do IFAM, isolada a partir do solo amazônico e o outro fungo foi isolado a partir do material contido no reator utilizado no projeto anterior. Este apresentava coloração esverdeada e foi identificado como *Trichoderma sp.* (Figura 2). Os dois fungos foram cultivados em meio Agar Batata Dextrose (ABD), à temperatura de 28°C, durante 7 dias, para então serem inoculados nos reatores. Os conídios da linhagem de *Aspergillus sp.*, e *Trichoderma sp* foram suspensos em água destilada esterilizada e suas suspensões obtidas foram ajustadas na câmara de Neubauer a 4×10^6 esporos/mL.

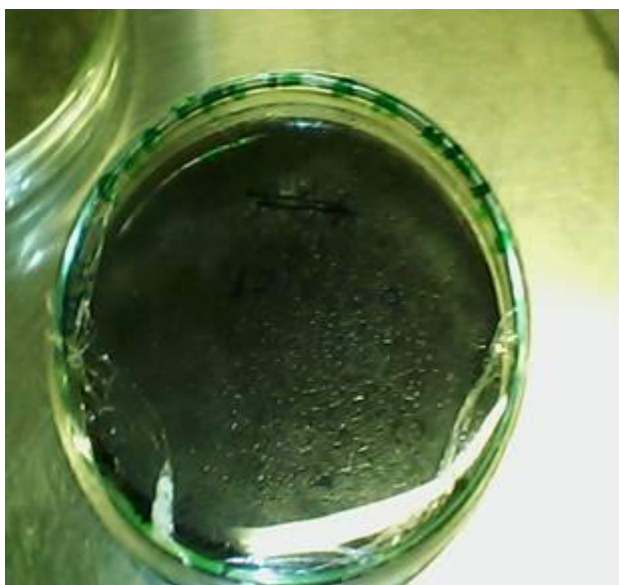


Figura 1 - *Aspergillus sp*



Figura 2 - *Trichoderma sp*

Na primeira fase foram utilizados 30 erlenmeyers de 500 mL (Figura 3) esterilizados sendo 15 experimentos com *Aspergillus sp* e 15 com o *Trichoderma sp.*, incubados à temperatura de $28^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ por 7, 14, 21 e 28 dias, protegidos da luz para evitar a fotodegradação do fenol.

Na segunda fase a pesquisa foi realizada em reator de acrílico de 100 mm de diâmetro, 500 mm de altura, 3 mm de espessura, volume útil de 3,5 L, em regime de batelada em leito submerso. A aeração foi feita utilizando um compressor tipo aquário e o oxigênio dissolvido (OD) medido com oxímetro digital foi mantido em torno de 2 mg/L, com temperatura em torno de $28^\circ \pm 2^\circ \text{C}$. O sistema constituiu-se de reservatórios para o afluente e o efluente e controlador de processo construído pelo Prof. Renato de Mena Barreto, o que permite determinar o tempo para cada função encher, aerar, pausa e esvaziar (Figura 5). A saída do afluente foi controlada por duas válvulas FESTO magnéticas de registro de passagem com controlador magnético com potência de 4,6 W e 24 V e com DDP de 28,4. O reator foi alimentado com vazão de 2L/dia com bomba d'água, uma chave eletrônica junto a um mini pisquete para servir como bóia e controlar o volume em aproximadamente 2 litros dentro do reator. O controlador de processo também poderá variar o tempo de retenção e automatizar o processo para evitar contaminação. O reator foi revestido com papel madeira para proteger da luz e evitar a fotodegradação do fenol. Teve-se esse mesmo cuidado com o reservatório do afluente, bombona de cor azul.

A fonte de carbono indutor utilizada foi o resíduo do processamento do cupuaçu em substituição a glicose segundo Trabulsi (1999). Foram preparadas diferentes diluições em água destilada e a DQO de cada uma foi determinada. A partir dos resultados foram calculadas as quantidades necessárias para que obtivesse uma concentração de 50mg/L em DQO. A solução obtida foi esterilizada a 121°C por 15 minutos para as amostras que foram utilizadas nos erlenmeyers. No reator de acrílico o afluente não foi esterilizado.



Figura 3 - Reator batelada em ambiente estéril



Figura 4 - Reator sequencial de leito submerso

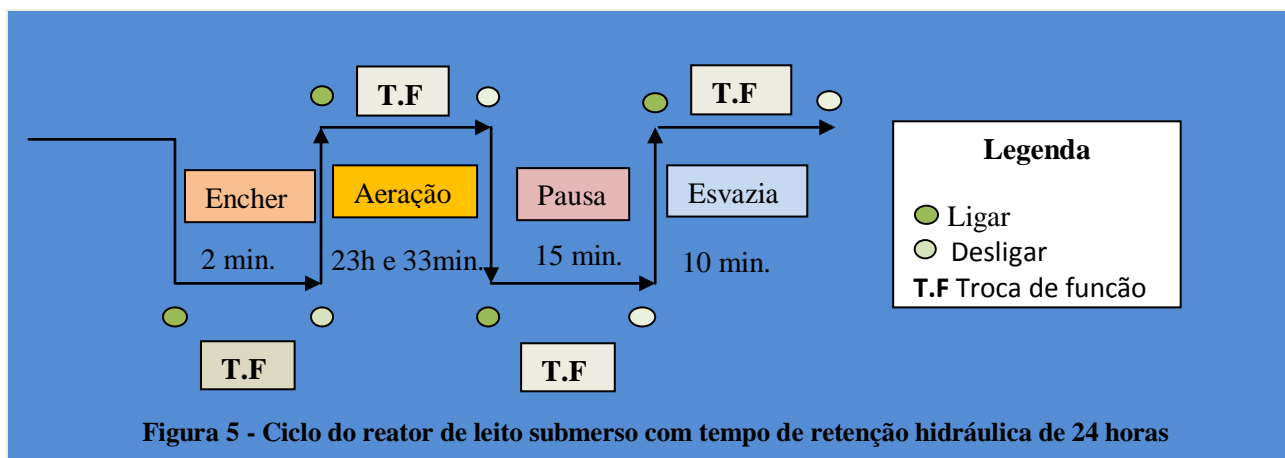


Figura 5 - Ciclo do reator de leito submerso com tempo de retenção hidráulica de 24 horas

O preparo do afluente sintético foi realizado nos Laboratórios de Controle Ambiental do IFAM, Campus Manaus Centro, com concentração baseada em Silva et al 2002, (NH_4Cl - 76,1 mg/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ - 46,2 mg/L; NaCl - 10,1 mg/L; KCl - 4,7 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 16,7 mg/L; NaHCO_3 - 162,2mg/L; Elementos ($\text{Fe}_2\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; ZnSO_4 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2mg/L) e fenol de 100 a 500mg/L com 50 mg DQO/L de resíduo do processamento do cupuaçu. Ao efluente foi adicionado clorofórmio 1% como agente bactericida o pH do efluente foi ajustado com ácido clorídrico.

O processo foi monitorado pela análise de DQO do afluente e efluente. As análises executadas seguiram a metodologia estabelecida no Standard Methods of Water and Wastewater (APHA, 1998). Foram realizadas análises microbiológicas de controle para verificar a existência de contaminação do efluente à medida que eram aumentadas as concentrações de fenol.

4.2 Resultados e Discussões

Os resultados da primeira fase estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, onde pode-se verificar que o *Aspergillus sp*, obteve uma eficiência superior ao *Trichoderma sp* na degradação do fenol. Valores similares para o *Aspergillus niger* foram encontrados por RODRIGUES, 2006.

Tabela 1 – Eficiências de remoção de DQO pelo *Trichoderma sp*

Fenol (mg/L)	Eficiência (%)			
TRH (dias)	7	14	21	28
100	6,4	40,2	50	59,5
200	13,7	26	44	55

Tabela 2 - Eficiências de remoção de DQO pelo Fungo *Aspergillus sp*

Fenol (mg/L)	Eficiência% TRH			
TRH (dias)	7	14	21	28
100	81	100*	100*	100*
200	69,6	93,4	100*	100*

* Considerado 100% de eficiência pois o método não consegue detectar valores menores

Os resultados da segunda fase estão apresentados na Figura 6 a qual mostra a variação de DQO afluente e efluente durante o tempo de atividade do reator. Depois da inoculação foram necessários seis dias para aclimação dos fungos ao substrato. O reator operou durante 33 dias com tempo de retenção hidráulica de um dia. Durante este tempo a concentração de fenol foi acrescida de 100mg/L para 300 mg/L. As eficiências baixas ao longo do experimento se devem a falta de energia e conseqüente diminuição no aporte de oxigênio dissolvido, além da elevação de temperatura da sala onde o reator se encontra. Mesmo com estes contratempos pode-se verificar que as eficiências de remoção de DQO e conseqüente remoção de fenol foram significativas (Figura 7).

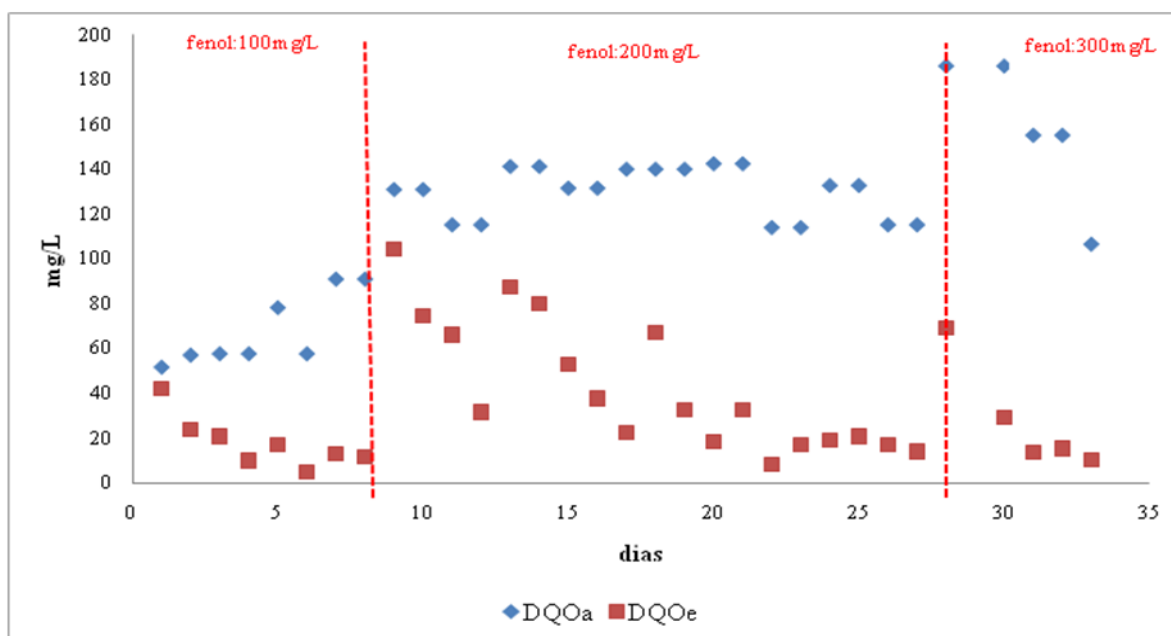


Figura 6 – Variação de DQO afluente e efluente durante o experimento no reator em batelada de leito submerso com os dois fungos (*Aspergillus sp*, *Trichoderma sp*)

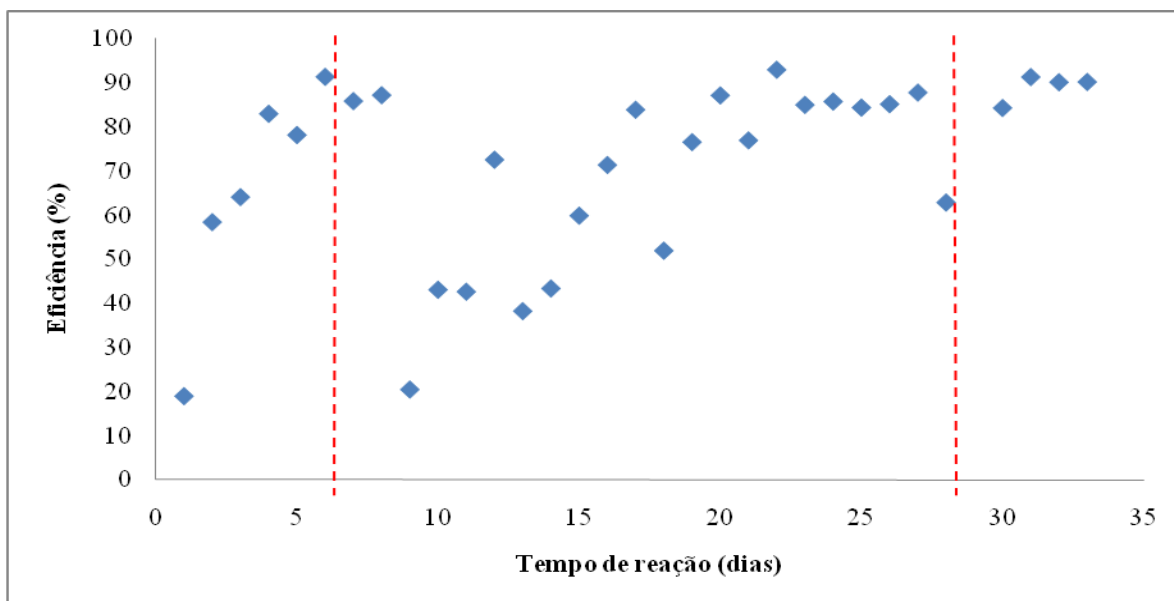


Figura 7 – Eficiência de remoção de DQO com três concentrações de fenol, durante o tempo do experimento

Rigo et al (2006) estudaram a degradação de fenol por *Candida parapsilopsis* em reator contínuo (CSTR pressurizado). O reator operou por 24 dias consecutivos e a entrada de afluente no reator apresentou concentrações de fenol na faixa de 300 a 900 mg/L, com remoção de 100% durante 16 dias consecutivos.

Passos (2006) obteve degradação total de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus sp* até uma concentração de 989 ± 15 mg/L, com diferentes velocidades de reação com 72 horas para degradar $320 \pm 0,57$ mg/L de fenol.

Silva et al (2007) isolaram as espécies *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sp*, *Penicilium sp* e *Phoma sp* e verificaram que os níveis de degradação dos compostos fenólicos, expressos em mg de equivalente de ácido gálico, foram diferentes para cada um dos fungos avaliados, embora a maior degradação tenha ocorrido nos tempos de 24 e 48 horas de crescimento. Verificaram que a linhagem I-10 de *Penicilium sp* foi a que apresentou os melhores resultados, conseguindo degradar 478mg em 48 horas.

Saraiva et al (2009) usando glicose como fonte de carbono indutor e *Aspergillus sp* em reator de leito fixo em batelada obtiveram eficiências de remoção de DQO média (glicose mais fenol) de 73% com 200mg/L de fenol afluente. No presente experimento, com os dois fungos em simbiose, o tempo de retenção hidráulico foi fixado em 24 horas com remoção total em torno de 90% com 300 mg/L de fenol afluente e 50 mg DQO/L de resíduo de cupuaçu

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos pode-se inferir que as espécies *Aspergillus sp* e *Trichoderma sp* em simbiose apresentaram valores de remoção de carbono orgânico total como DQO significativos para valores de fenol afluentes de 300mg/L. Observa-se também que o resíduo do processamento de cupuaçu pode ser utilizado como fonte primária de carbono, permitindo com isto tratar dois resíduos concomitantemente. Os resultados ainda permitem dizer que a remoção de compostos fenólicos é viável em reator em batelada com leito submerso, devendo ainda serem estudadas concentrações maiores de fenol, tempo de retenção hidráulica menores

AGRADECIMENTOS

A FAPEAM pelo aporte financeiro;

AO IFAM – GEAQMA

Laboratório de Microbiologia – Profa MSc Sonia M.M.Lima

Dpto Física – Prof. Renato Mena Barreto

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, M., FONSECA, I., VIEIRA, M.M.C., SILVA, C.L.M., Venâncio, A. Determinação de Propriedades Térmicas de Frutos Tropicais: Polpa e Néctar de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e de Açaí (*Euterpeoleracea*). 1995.
- APHA. Standard Methods of the Examination of water and wastewater, 20th edition. American Public Health Association. Woshington, DC. USA. 1998.
- BOLAÑOS, R. M. L.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Phenol degradation in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (haib) reactor under mesophilic conditions. Water Science and Technology, v. 44, n. 4, p. 167-174. 2001.
- BUMPUS, J. A.; TIEN, M.; WRIGHT, D.; AUST, S. D. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. SCIENCE. 1985.
- COLL P.M. FERNÁNDEZ-ABALOS J.M. VILLANUEVA J.R. SANTAMARÍA R. PÉREZ P. Purification and characterization of phenoloxidase (laccase) from lignin-degrading basideomycete PM1(CECT2971). Appl. Environ. Microbiol., v.59. n.8. pp.2607-2613. 1993.
- PASSOS, C.T. Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Alimentos, FURG. 2006.
- RIGO, M.; COUTINHO, M.R.; ALVAREZ, D.C.; BEZERRA, J.R.M.V; BRANCO, I.G.; MONTE ALEGRE, R. Biodegradação de Fenol por Candida parapsilopsis em Reator Contínuo (CSTR) Pressurizado. Revista Ciencias Exatas e Naturais, vol. 8 no2, Jul/Dez 2006.
- RODRIGUES, K.A. Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética. Tese de Doutorado - São Carlos, 2006.
- RODRIGUES, K. A.; SAMPAIO, G.M.M.; ZAIAT, M. SANTAELLA, S.T. Biodegradação de fenol por *Aspergillus niger* em água residuária sintética. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2007.
- SANTAELLA, S. T. CAMPOS, J. R., LINARES, T. Perspectivos de remoção de cor (substâncias húmicas) de água destinada ao tratamento biológico. Revista sanitária e ambiental. 1996.
- SARAIVA, L.; OLIVEIRA, E.; LIMA, S. Oxidação biológica de compostos orgânicos fenólicos por *aspergillus sp* em reator em batelada. **Anais do IV CONNEPI**. 2009.
- SILVA, M.R; COELHO, M.A.Z.; ARAUJO, O.Q.F. minimization of phenol and ammoniacal nitrogenin refinery wastewater employing biological treatment. Engenharia Térmica, Edição Especial. P.33-37. 2002
- SILVA, I.L.C.; LUDWIG, K.V.F.; NEUMANN, D.; SCHENEIDER, A.C.; ONOFRE, S.B.- Fungos filamentosos degradadores de compostos fenólicos isolados de águas residuárias de postos de combustíveis.Revista de Biologia e Saúde da UNISEP. Biology & Health Journal. v1.n1, 2. 2007.
- TRABULSI, L. R; ALTERTHUM. F; GOMTERTZ, O. S; CANDEIAS, J.A. N. **Microbiologia**. São Paulo. Editora ateneu 3 ed.599p.1999.
- TIMUR,S.;PAZARLIOGLU,N.;PILLOTON,R.;TELEFONCU,A. Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix. Sensors and Actuators. 92:132-136. 2004.
- VINCIGUERRA, V., D'ANNIBALE, A., MONACHE, G. D., SERMANNI, G. G. Correlated effects during the bioconversion of waste olive waters by *lentinus edodes*. Bioresource technology. 51: 2211 – 276.1995.