



Assinado  
Digitalmente

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

## CARTA PATENTE Nº PI 0704520-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** PI 0704520-4

**(22) Data do Depósito:** 10/12/2007

**(43) Data da Publicação do Pedido:** 11/08/2009

**(51) Classificação Internacional:** C02F 3/34; C02F 101/36; C02F 103/28

**(54) Título:** PROCESSO PARA REMOÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE EFLUENTES

**(73) Titular:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, Diretor(a). CGC/CPF: 88648761000103. Endereço: Rua Francisco G. Vargas, 1130, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95070560

**(72) Inventor:** ALDO JOSE PINHEIRO DILLON; LADEMIR LUIZ BEAL; PATRÍCIA BONFANTI

**Prazo de Validade:** 10 (dez) anos contados a partir de 04/09/2018, observadas as condições legais

**Expedida em:** 04/09/2018

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



## **Relatório Descritivo**

### PROCESSO PARA REMOÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE EFLUENTES

#### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção pertence ao campo das invenções direcionadas à remoção de compostos de efluentes industriais. Especificamente, mas não somente, a presente invenção é direcionada à remoção de compostos fenólicos de efluentes industriais tais como os efluentes da indústria de papel e celulose, indústrias de processamento da borracha, de colas e adesivos, de resinas impregnantes, de componentes elétricos (plásticos) e as siderúrgicas dentre outras. Especificamente, o efluente industrial da presente invenção é o efluente proveniente da indústria de papel e celulose. O método de remoção de compostos fenólicos da presente invenção compreende o uso de uma espécie de *Pleurotus spp*, mais especificamente, de *Pleurotus sajor-caju* que passa por um processo de condicionamento prévio antes de entrar em contato com o efluente poluente. Neste condicionamento, o fungo é cultivado em meio líquido e em concentrações crescentes do composto fenólico durante determinado período de tempo. Opcionalmente, após a remoção de compostos fenólicos pode-se seguir uma etapa de tratamento bacteriano aeróbio do efluente pela ação do lodo ativado.

#### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]** O efluente obtido durante a preparação da polpa de celulose e da etapa de branqueamento da polpa de papel possui características tóxicas, carcinogênicas, mutagênicas e alergênicas, tornando-se fundamental a sua remoção para minimizar os impactos nos corpos hídricos (Canet *et al.*, 2001). Essa toxicidade é atribuída aos compostos clorofenólicos, especialmente policlorados fenólicos que bioacumulam-se em peixes, sendo altamente persistentes (Davis & Burns, 1990) e têm sua origem na composição da lignina, que é extraída da madeira na produção do papel.

**[0003]** A poluição causada pela indústria de papel e celulose tem sua origem nas etapas de produção e branqueamento da polpa, na prensagem do papel, no preparo da madeira, na lavagem da polpa, na separação e no preparo do papel. Estas etapas geram um efluente que apresenta na sua composição sólidos suspensos (SS), alta demanda química de oxigênio (DQO), alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cor, basicidade, fenóis, organoclorados, cianeto, sulfetos e outras substâncias solúveis (Pokhrel & Viraraghavan, 2004; Bajpai & Bajpai, 1994).

**[0004]** A maioria das indústrias de produção de polpa de celulose e papel utilizam o processo de lodo ativado aliado a processos físicos e químicos para o tratamento de seus efluentes. O processo de lodo ativado é definido como um sistema no qual uma massa biológica cresce e floccula, sendo colocada em contato com a matéria orgânica do despejo líquido, na presença de oxigênio (Jordão & Pessôa, 1995). O floco do lodo ativado é formado por componentes biológicos e componentes não biológicos. Os componentes biológicos consistem em uma variedade de bactérias (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Citromonas*, *Zoogloea*), fungos, protozoários e alguns metazoários (Jenkins, 2003). Numerosas bactérias podem decompor monômeros de lignina, mas somente poucas linhagens são capazes de atacar a lignina obtida de diferentes processos da produção da polpa (Bajpai & Bajpai, 1994).

**[0005]** Sabe-se que os fungos da degradação branca (basidiomicetes e alguns ascomicetes) são hábeis em degradar lignina e uma grande variedade de compostos aromáticos altamente recalcitrantes, devido à ação de suas enzimas ligninolíticas (Lo *et al.*, 2001; Barr & Aust, 1994; Boyle *et al.*, 1992; Leonowicz *et al.*, 1999; Tuomela *et al.*, 2000).

**[0006]** A maioria das espécies de basidiomicetes forma um corpo de frutificação macroscópico com hifas modificadas que originam pseudotecidos, e estruturas de reprodução características chamadas de basídios, os quais são importantes estruturas de identificação sistemática (Putzke & Putzke, 1998). O

gênero *Pleurotus* (objeto desta invenção) pertence à classe dos Basidiomicetes, ordem Agaricales e família Polyporaceae. Caracteriza-se por apresentar em seu corpo de frutificação um talo não cêntrico atado ao píleo, o qual se abre mostrando uma morfologia semelhante a uma ostra durante a morfogênese (Putzke & Putzke, 2002). Os cogumelos são comestíveis e de aroma agradável, possuem grande valor nutricional, sendo ricos em proteínas, vitaminas e sais minerais. Seu complexo enzimático possibilita que sejam utilizados em diversas aplicações ambientais e biotecnológicas (Cohen *et al.*, 2002).

**[0007]** As principais enzimas ligninolíticas oxidativas são as fenol-oxidases lacases, manganês-peroxidases (MnP) e lignina-peroxidases (LiP) (Gill & Arora, 2003) e sabe-se que os fungos do gênero *Pleurotus* são dependentes da secreção destas enzimas ligninolíticas (Cohen *et al.*, 2002).

**[0008]** As LiP (EC1.11.1.7) são oxidases fortes, capazes de catalizar a oxidação de fenóis e aminas aromáticas, éteres aromáticos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos pela remoção de um elétron, gerando radicais fenoxi e radicais catiônicos ao mesmo tempo. O resultado é uma combustão enzimática em que as ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio são rompidas, despolimerizando o polímero e abrindo os anéis aromáticos (Akhtar *et al.*, 1997, Breen & Singleton, 1999). A MnP requer  $H_2O_2$  no ciclo catalítico (Min *et al.*, 2001) e segundo Sasaki *et al.* (2001) é considerada uma enzima chave na ligninólise realizada pelos fungos da degradação branca. A veratril álcool oxidase (VAO) é um componente do sistema enzimático das peroxidases, reciclando a LiP e prevenindo sua inativação pelo excesso de  $H_2O_2$  (Breen & Singleton, 1999).

**[0009]** As lacases utilizam oxigênio como aceptor de elétrons para remover hidrogênio de grupos fenólicos (Thurston, 1994). Têm um papel importante na degradação da lignina e na remoção de fenóis potencialmente tóxicos produzidos durante sua degradação (Thurston, 1994; Fountoulakis *et al.*, 2002). Elas podem interagir diretamente com o composto fenólico da lignina ou, na

presença de um mediador, reagir com uma ampla faixa de substratos (Bourbonnais *et al.*, 1997).

**[0010]** A redução da concentração de fenol parece envolver outros mecanismos, pois Tsioulpas *et al.* (2002) observaram que as linhagens de *Pleurotus* sp que mais reduziram a concentração de fenol não foram as que mais produziram lacases.

**[0011]** Um dos principais problemas encontrados no tratamento do resíduo líquido do processamento da oliva são os fenóis e a alta concentração da DQO. Verificou-se que as arqueias metanogênicas são afetadas pelos compostos fenólicos e que a digestão anaeróbia foi aumentada com o pré-tratamento fúngico do resíduo líquido (Fountoulakis *et al.*, 2002).

**[0012]** Sabe-se também que o fungo é capaz de absorver fenol, em micélio seco, em quantidades de até 105mg/g de micélio seco (Aggelis *et al.*, 2003).

**[0013]** O cultivo em meio líquido de basidiomicetes apresenta-se como uma alternativa no processo produtivo, visto que, comparado com o cultivo sólido, permite produzir uma quantidade maior de massa em menos tempo, além de favorecer a produção de enzimas ligninolíticas importantes (Guillén-Navarro *et al.*, 1998).

#### **Tratamento fúngico de efluentes contendo compostos fenólicos**

**[0014]** Os fungos da degradação branca, que têm-se mostrado eficientes na completa degradação da lignina, podem ser empregados em uma rápida descoloração dos efluentes (Bajpai & Bajpai, 1994). *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, e *Pleurotus spp.* são os fungos identificados como grandes potencialidades para serem empregados no descoloramento de efluentes industriais.

**[0015]** Observações feitas por Bano & Rajarathnam (1988) indicaram que *P. sajor-caju*, juntamente com *P. flabellatus* foram bons coletores de metais pesados e também mostraram as mais altas taxas de degradação do meio. Isto levou à conclusão de que a mobilização de metais pesados do meio e a subsequente transferência para corpos de frutificação estão relacionados com

o grau de degradação do meio. Entretanto, os resultados indicaram que os corpos de frutificação de *P. sajor-caju*, crescidos em resíduos celulósicos, não mostraram bioacumulação de metais pesados.

**[0016]** Os inventores da presente invenção avaliaram a remoção de fenóis totais em efluentes da produção de papel e polpa de celulose num processo constituído de dois estágios nos quais o primeiro envolve o cultivo em efluentes de *Pleurotus sajor-caju* e um segundo estágio de cultivo bacteriano aerado.

**[0017]** A busca na literatura patentária apontou alguns documentos relevantes mostrados a seguir.

**[0018]** O documento US 5,047,332 revela um processo integrado de tratamento de biomassa vegetal utilizando *Pleurotus sajor-caju* que permite a obtenção de ração para animais, alimentos para humanos e de combustíveis. A matéria-prima utilizada é a celulose proveniente de madeira, restos de colheita, polpas e restos da indústria de papel e celulose, ou semelhantes que passa por um processo de pré-tratamento para promover a separação dos componentes em celulose, lignina e hemicelulose. Cada fração obtida é fermentada aerobicamente após a adição de várias espécies de fungos tais como espécies de *Pleurotus* incluindo *Pleurotus sajor-caju*, *Chaetomium cellulolyticum*, *Aspergillus sp*, *Penecillum sp* e *Trichoderma reesei* formando um material rico em proteínas que é utilizado como ração animal e alimento humano. A presente invenção não compreende uma etapa de separação dos componentes do efluente e utiliza *Pleurotus sajor-caju* como um agente para remover compostos fenólicos, fato não mencionado neste documento.

**[0019]** O documento EP 0 877 839 revela um processo para obtenção de polpa de celulose para a indústria de papel obtida pela quebra da lignina de massas vegetais. Neste processo, as massas vegetais de várias origens, especificamente de *Hibiscus cannabinus*, algodão, milho e outros, é inoculada com espécies de fungos ligninolíticos tais como *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus Peryngii*, *Lentinus edodes* ou ainda com extratos dos mesmos cultivados em meio líquido, sólido ou semi-sólido. O documento descreve vários métodos de

obtenção de polpa vegetal mas não menciona o uso específico destes fungos para remoção de fenóis como proposto na presente invenção. Tampouco o seu uso seria óbvio a partir deste documento.

**[0020]** O documento WO 2003/035561 revela um método de tratamento de detritos líquidos que compreende a adição de espécies fungos lignificantes tais como fungos do gênero *Acanthophysium*, *Aleurobotrys*, *Aleurodiscus*, *Amphinema*, *Armillaria*, *Pleurotus*, dentre outros cultivados em meio de cultura contendo extrato de malte. O fungo descrito neste documento é utilizado na forma encapsulada, em uma matriz de polímeros ou imobilizados em um suporte. que podem ser sais de alginato, sais de carragenana, sais de íons-carragenana, maltodextrina, concentrados de proteína de trigo, extrato seco de levedura, dentre outros. Na presente invenção, o meio de cultivo do fungo não compreende malte e o fungo não é utilizado na forma encapsulada.

**[0021]** O documento US 6,737,065 revela um meio de obtenção de micélio de fungos de várias espécies, dentre elas, *Pleurotus sajor-caju*, que é realizada em meio líquido. Especificamente, o meio líquido descrito neste documento é água de lavagem de cereais sendo uma mistura de farelo de arroz e trigo enriquecida com minerais traços como o crômio, selênio e germânio. Na presente invenção, *Pleurotus sajor-caju* também é cultivado em meio líquido mas este não é suplementado com nenhum dos elementos traços descrito neste documento. O micélio obtido neste documento pode ser utilizado na preparação de alimentos ou bebidas funcionais, gêneros alimentícios, medicamentos ou ainda como ração de patos. Neste documento, não há menção quanto à possibilidade de uso deste fungo na remoção de compostos fenólicos de efluentes como proposto na presente invenção.

**[0022]** O documento US 6,586,638 relata um método de remoção e recuperação de um ou mais compostos fenólicos não associados presentes em efluentes. O método descrito neste documento compreende uma etapa de filtração do efluente através de uma membrana seletivamente permeável para um recipiente contendo uma solução básica que deverá apresentar um pH 0,5

unidade acima da constante de dissociação do composto fenólico. Diferentemente da presente invenção, este documento não relata o uso de nenhuma espécie de fungo e nem o seu uso seria óbvio a partir do mesmo.

**[0023]** O documento US 5,512,180 relata um método de remoção de compostos orgânicos de soluções aquosas, pelo qual a solução aquosa é tratada com um composto polimérico, insolúvel em água que possui afinidade pelo composto a ser removido. Dentre os compostos orgânicos citados neste documento, encontram-se os compostos fenólicos. Não há qualquer menção quanto ao uso de fungos, como proposto na presente invenção, e nem o seu uso seria óbvio a partir deste documento.

**[0024]** O documento US 4,418,221 relata um método de tratamento de soluções aquosas contendo fenol pelo qual a extração do fenol ocorre após a adição de um solvente ao sistema. O solvente de extração é um solvente contendo um composto heterocíclico nitrogenado contendo pelo menos 9 carbonos escolhido dos grupos que tem como esqueleto carbônico uma piridina, uma piperidina e uma triazina. Não há menção quanto ao uso de nenhuma espécie de fungo e nem o seu uso seria óbvio a partir deste documento.

**[0025]** Portanto, como nenhum dos documentos do estado da técnica revela ou sugere um processo de remoção de compostos fenólicos de efluentes através da adição de um fungo, em especial o fungo *Pleurotus sajor-caju*, a presente invenção pode ser considerada como nova e inventiva.

### **Objeto da Invenção**

**[0026]** É um objeto da presente invenção um processo para remoção de compostos fenólicos de efluentes caracterizado por compreender as etapas de:

- a) adicionar a um efluente compreendendo pelo menos um composto fenólico um agente removedor de compostos fenólicos;
- b) manter a mistura de a) sob agitação; e
- c) remover o fungo do efluente.

[0027] O agente removedor de composto fenólico do item a) é um fungo pertencente ao gênero *Pleurotus*.

[0028] Em uma realização opcional, o processo compreende adicionalmente uma etapa de tratamento bacteriano aeróbio.

[0029] Em uma realização, o fungo do item a) sofre um condicionamento prévio para amplificar sua capacidade de remoção de compostos fenólicos.

[0030] É um adicional objeto da presente invenção o uso de um fungo pertencente ao gênero *Pleurotus* como agente removedor de compostos fenólicos de efluentes.

### **Breve Descrição das Figuras**

[0031] A **Figura 1** mostra a concentração de fenol no início e ao final do cultivo (168h) utilizando 50% de uma suspensão fúngica de 7 dias de cultivo.

[0032] A **Figura 2** mostra a concentração de fenóis totais do efluente da indústria de papel e celulose nos frascos controles e nos frascos cultivo no tempo zero e ao final do ensaio. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão.

[0033] A **Figura 3** mostra a porcentagem de fenóis totais adsorvidos na biomassa fúngica de cultivos líquidos com *P. sajor-caju* realizados em frascos agitados. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão.

[0034] A **Figura 4** mostra a determinação de DQO em oito dias de cultivo do efluente da IPC bruto e após o tratamento fúngico.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[0035] Os exemplos aqui descritos têm somente o intuito de ilustrar algumas das inúmeras maneiras de se realizar a invenção. Realizações equivalentes às mostradas aqui devem, portanto, serem entendidas como dentro do escopo da presente invenção.

### Compostos Fenólicos

**[0036]** Os compostos fenólicos úteis na presente invenção incluem todos os compostos que possuem uma subestrutura fenol. Exemplos desses compostos incluem, mas não se limitam a compostos aromáticos como fenol, lignina e seus derivados e compostos polifenólicos, fenol e seus derivados como catecol, 2-clorofenol, 2,6-diclorofenol, 5-cloroguaiacol, 4-clorocatecol, 4,6-dicloroguaiacol, 3,5-diclorocatecol, 4,5-dicloroguaiacol, 4,6-dicloroguaiacol, 3,4,5- tricloroguaiacol, 4,5,6-tricloroguaiacol, triclorosiringaldeído, e 2,6-diclorosiringaldeído e mistura dos mesmos.

**[0037]** Fontes adequadas para esses compostos fenólicos são os efluentes provenientes de indústrias tais como os efluentes da indústria de papel e celulose, indústrias de processamento da borracha, de colas e adesivos, de resinas impregnantes, de componentes elétricos (plásticos) e as siderúrgicas dentre outras. Em especial, a presente invenção utiliza efluentes da indústria de papel e celulose.

### Agente Removedor de Compostos Fenólicos

**[0038]** O agente removedor de compostos fenólicos é um fungo e fungos adequados para uso na presente invenção são os fungos de degradação branca tais como *Phanerochaete spp*, *Trametes spp*, *Pleurotus spp*, os gêneros de fungos de degradação marrom tais como os gêneros da subdivisão Basidiomicotina, os gêneros de fungos de degradação macia tais como os gêneros da Subdivisão Ascomicotina e da Subdivisão Deuteromicotina bem como a mistura dos mesmos

**[0039]** Em especial, na presente invenção, utiliza o gênero *Pleurotus spp*, mais especificamente, *Pleurotus sajor-caju*. A presente invenção utilizou a linhagem de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 empregada na produção comercial de cogumelos.

### Processo de Remoção de Compostos Fenólicos

**[0040]** O processo para remoção de compostos fenólicos de efluentes compreende as etapas de:

- a) adicionar a um efluente compreendendo pelo menos um composto fenólico um fungo pertencente ao gênero *Pleurotus*;
- b) cultivar a mistura de a) sob agitação; e
- c) remover o fungo do efluente.

**[0041]** O fungo adicionado sofre uma etapa de condicionamento, que amplifica sua capacidade de remoção destes compostos fenólicos. Tal etapa consiste no seu cultivo em um meio compreendendo uma pequena quantidade destes compostos.

**[0042]** Em especial, o composto fenólico está presente em uma concentração de 0,00001 µg/mL a 0,1 µg/mL.

**[0043]** O processo compreende adicionalmente uma etapa de tratamento bacteriano aeróbio, que pode ser realizada com a adição de lodo ativado. Essa etapa é realizada sobre o efluente previamente tratado com o fungo, podendo ser realizada tanto antes da remoção do mesmo quanto depois.

**[0044]** A etapa de remoção do fungo do efluente é realizada por meios comumente conhecidos no estado da técnica.

**[0045]** Os meios de cultivo compreendem uma solução de mineral de nutrientes e micronutrientes. Na presente invenção a solução mineral de nutrientes (Ss) e micronutrientes concentrada dez vezes (10x) utilizada nos meios de cultivo foi baseada na formulação de Mandels & Reese (1957) e constituiu-se em g/L: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 3 g; uréia, 3 g; CaCl<sub>2</sub>, 4 g; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 15,6 mg; FeSO<sub>4</sub>, 50 mg; ZnSO<sub>4</sub> 14 mg; CoCl<sub>2</sub>, 20 mg; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1 litro.

**[0046]** As temperaturas de cultivo do fungo variam em uma faixa que vai de 25°C a 30°C, sendo preferencialmente escolhida a temperatura de 28°C. O tempo de cultivo vai depender da quantidade de compostos fenólicos a serem removidos. Quanto maior o tempo de cultivo, maior a quantidade de compostos removidos. Preferencialmente a presente invenção utiliza tempos que variam

de 2 a 8 dias. Tempos maiores ou menores podem também ser utilizados.

**[0047]** A concentração de fungo presente nos cultivos está compreendida na faixa que vai de 5% p/p a 40% p/p de biomassa, sendo preferencialmente 20% p/p de biomassa.

### **Exemplo 1 – Manutenção das Linhagens**

**[0048]** Um disco de 4mm de meio colonizado com a linhagem de *P. sajor-caju* foi transferido para placas contendo MM. As placas foram mantidas a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ , durante 8 dias e armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . O meio de manutenção (MM) continha 2% (p/v) de serragem de *Pinus* sp moída; 2% (p/v) de farelo de trigo moído; 2% (p/v) de ágar-ágar; 0,2% de  $\text{Ca}_2\text{CO}_3$ ;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 100mL. O meio foi autoclavado a 1 atm por 15 min.

### **Exemplo 2 – Ensaio Realizados**

**[0049]** Os ensaios realizados para estudo do processo descrito acima foram: Ensaio enzimáticos, determinação do pH, determinação de fenóis totais, determinação da cor, determinação das demandas química (DQO) e bioquímica (DBO) e determinação de P, N, açúcares redutores e biomassa totais. Os protocolos de cada ensaio estão descritos a seguir. Os testes estatísticos foram realizados pela análise de variância (one-way ANOVA), utilizando um nível de probabilidade (P) inferior a 5%,

#### 2.1 Determinações Enzimáticas

##### 2.1.1 Lacases

**[0050]** A atividade de lacases foi determinada com 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6- sulfonato) (ABTS). A mistura reacional continha 0,45mM do substrato; 90mM de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 1mL de amostra adequadamente diluída, em volume final de 2,2mL. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420nm, durante 90 segundos, a  $25^{\circ}\text{C}$ . Para a determinação da concentração do ABTS oxidado, utilizou-se um

$\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4$  /cm/M (Wolfenden e Wilson, 1982). Uma unidade enzimática corresponde à quantidade ( $\mu\text{mol}$ ) de produto liberada/min./mL de amostra, calculada pela fórmula que segue:

$$U = (\text{Abs} \times 60\text{seg} \times \text{volume final} \times 10^6) / (\epsilon_{420} \times \text{volume da amostra})$$

### 2.1.2 Manganês Peroxidase

**[0051]** A atividade de manganês peroxidase foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional consistiu de 50 $\mu\text{g/mL}$  de vermelho de fenol; 50 $\mu\text{M}$  de sulfato de manganês; 50 $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrogênio; 12,5mM de lactato de sódio; 500 $\mu\text{g/mL}$  de albumina bovina e tampão succinato de sódio 20mM pH 4,5, sendo adicionados 0,5mL de amostra, resultando em volume final de 2mL. Após 5 minutos, a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 40 $\mu\text{L}$  de NaOH 2M. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância, utilizando-se  $\epsilon_{610} = 4,46 \times 10^4$  /M/cm, sendo considerada a absorbância zero, uma amostra com tempo zero de reação. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1 $\mu\text{mol}$  de vermelho de fenol/mL de amostra/min, como mostra a fórmula abaixo:

$$U = (\text{Abs} \times \text{volume final} \times 10^6) / (\epsilon_{610} \times \text{volume da amostra})$$

### 2.1.3 Lignina Peroxidase

**[0052]** A atividade de lignina peroxidase foi determinada pela formação de veratrinaldeído ( $\epsilon_{310} = 9,3 \times 10^3$  /M/cm), numa mistura reacional contendo 0,5mL de álcool veratrílico dissolvido (4mM) em tampão tartarato de sódio (250mM) pH 3,0 em presença de 0,5mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2mM) e 0,5mL de extrato enzimático com volume final de 2mL (Tien & Kirk, 1984). A variação da absorbância foi observada durante 5 min, a 30°C e uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1  $\mu\text{mol}$  de álcool veratrílico/mL de

amostra/min, como mostra a fórmula que segue:

$$U = (\text{Abs} \times \text{volume final} \times 10^6) / (\epsilon_{310} \times \text{volume da amostra})$$

#### 2.1.4 Oxidases do Álcool Veratrílico

**[0053]** Para a determinação da atividade de oxidases do álcool veratrílico, foi observada a formação de aldeído veratrílico, a partir de uma reação contendo 1,0mL de álcool veratrílico (2mM), dissolvido em tampão tartarato de sódio (250mM) pH 5,0; 0,5mL de amostra e 0,5mL de água destilada com volume final de 2mL, sendo a reação monitorada durante 5min, a 30°C, utilizando-se  $\epsilon_{310} = 9,3 \times 10^3$  /M/cm (Bourbonnais & Paice, 1988). Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1 $\mu$ mol de álcool veratrílico/mL de amostra/min, como mostra a fórmula:

$$U = (\text{Abs} \times \text{volume final} \times 10^6) / (\epsilon_{310} \times \text{volume da amostra})$$

#### 2.2 Determinação de Fenóis Totais

**[0054]** Os fenóis totais foram determinados espectrofotometricamente a 765nm, com o uso do reagente de Folin-Ciocalteu (2N), pela formação de um complexo azul, resultante da oxidação dos fenóis presentes na amostra e em meio tamponado com carbonato de sódio (10%) (Box, 1983). A concentração dos fenóis totais foi estimada correlacionando a absorbância das amostras a uma curva padrão com concentrações de 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L de fenol.

#### 2.3 Determinação da cor

**[0055]** A cor do cultivo com efluente foi monitorada pela determinação da absorbância em 465nm, utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU530. A conversão da absorbância em unidades colorimétricas (UC) foi feita pela equação a seguir (Davis & Burns, 1990):

$$UC = (500 \times Abs_{465}) / 0,132$$

**[0056]** O valor 0,132 corresponde à absorvância de uma solução padrão de cobalto-platina, com 500 UC.

#### 2.4 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

**[0057]** O método consiste em oxidar a amostra com um excesso de dicromato de potássio, em meio fortemente ácido e sob refluxo, e determinar, depois, a quantidade de dicromato de potássio remanescente, por titulação com sulfato ferroso amoniacal. Como a quantidade inicial do oxidante é conhecida, pode-se calcular quanto foi consumido na oxidação da matéria orgânica presente na amostra e estabelecer a quantidade equivalente de oxigênio para promover essa mesma oxidação. O resultado final do teste expressa a quantidade (em mg) de oxigênio que foi utilizada para a oxidação de um litro de amostra, e pode ser, assim, entendido como uma medida do teor de matéria orgânica nela contido.

#### 2.5 Determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO)

**[0058]** A metodologia consistiu em incubar a amostra por 5 dias, à temperatura de 20 °C, em local escuro. Ao iniciar o teste, preparam-se dois frascos com amostra, exatamente da mesma maneira. Um dos frascos é incubado e no outro determina-se o teor de oxigênio dissolvido inicial, pelo método de Winkler, modificado pela azida sódica. Findo o período de incubação, determina-se quanto de oxigênio dissolvido que restou no segundo frasco. A concentração de OD foi mensurada pela titulação com tiossulfato de sódio 0,025N.

**[0059]** A diferença entre o teor inicial e o teor final de oxigênio dissolvido corresponde à demanda de oxigênio na oxidação biológica da matéria orgânica e na oxidação de materiais inorgânicos presentes na amostra.

### **Exemplo 3. Ensaio em Frascos Agitados**

#### **3.1 Preparo do pré-inóculo**

**[0060]** Para preparação do pré-inóculo, dois discos de 1,5 cm de diâmetro de colônias de oito dias crescidas no MM foram dispostos em frascos Erlenmeyer de 500mL, contendo 100mL de PA e 15 esferas de vidro com 0,5cm de diâmetro. Os frascos foram mantidos em agitação (180 rpm) a 28°C, durante 7 dias.

**[0061]** O meio líquido para preparação do pré-inóculo utilizado nos ensaios com frascos agitados foi constituído de 10mL de Ss; 0,1g de proteína de soja; 0,5g de glicose; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100mL. Após a esterilização em autoclave, foi adicionado 0,1mL de solução de gentamicina (4,4 mg/mL).

#### **3.2 Adaptação para crescimento em meio contendo fenol.**

**[0062]** Frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 95mL de meio LAF foram inoculados com 5mL de suspensão obtidas a partir dos frascos de pré-inóculo. Os controles consistiram de frascos sem inóculo. O cultivo foi mantido sob agitação a 180 rpm, 28°C, durante 48 horas.

**[0063]** Utilizou-se um meio para adaptação do micélio ao fenol, constituído de 10mL de Ss; 1g de sacarose; 0,1g de caseína; 1mL de uma solução de fenol (0,5µg/mL); H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100mL. Após a esterilização em autoclave foi adicionado 0,1mL de solução de gentamicina (4,4mg/mL) e 0,1mL de solução de benomil (6g/L). Em alguns experimentos utilizou-se proteína de soja como fonte de nitrogênio em substituição à caseína e glicose como fonte de carbono, em substituição à sacarose.

#### **3.3 Avaliação da remoção de fenol**

**[0064]** Após 48 horas de crescimento e adaptação da biomassa fúngica ao fenol no meio LAF, 50mL dos cultivos e controles foram adicionados a 50mL do meio LCF. Amostras de 2mL foram retiradas, de 8 em 8 horas, para a determinação de pH, fenóis totais e atividade enzimática. Os ensaios foram

realizados em triplicata. Alternativamente, a suspensão após o crescimento foi reutilizada para a remoção de fenol. Este meio continha 45mL de solução de fenol (400mg/L); 5mL de Ss (20x) e 0,5g de sacarose.

**[0065]** A utilização de 50mL de um dos cultivos de 7 dias como inóculo permitiu a completa remoção de 200mg/L de fenol, dado este, que foi observado em 168h de cultivo (Figura 1).

#### 3.4 Avaliação da remoção de fenóis totais do efluente da IPC

**[0066]** Após 48 horas de crescimento e adaptação da biomassa fúngica ao fenol em meio LAF, 37,8mL do cultivo foram adicionados a 52,2mL de meio LCE. Amostras de 2mL foram retiradas, de oito em oito horas, para a determinação de pH, fenóis totais e atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicata

**[0067]** O meio contendo efluente da IPC para estudos em frascos agitados foi constituído de 52,8mL de uma solução autoclavada, composta de 40mL de efluente da IPC; 10mL de Ss; 1mL de uma solução de  $\text{CuSO}_4$  (0,156mg/mL); 1mL de uma solução de fenol (0,5 $\mu\text{g}$ /mL); 0,1mL de solução de gentamicina (4,4mg/mL); 0,1mL de solução de benomil (6g/L) ; 0,01g de proteína de soja e 1g de glicose.

**[0068]** Foram também avaliadas as atividades de lacases e MnP, em experimentos conduzidos por 174h, com coletas no início e no final do cultivo. A análise de atividade de lacases às 174h do cultivo mostrou uma baixa atividade desta enzima em dois frascos, com uma média de 4,31U/mL. Na Figura 2, os valores diferentes encontrados no início do experimento (tempo zero) entre o controle e o cultivo devem-se ao fato de que o cultivo foi preparado com uma suspensão fúngica, com 48h de fase de adaptação, cuja concentração de fenóis totais já estava diminuída comparativamente à solução que foi utilizada para o preparo do controle.

#### 3.5 análise de adsorção/desorção de fenóis totais pela massa fúngica

**[0069]** Após 3 dias de crescimento no meio PA, 5mL da suspensão fúngica foi inoculada em 14 frascos Erlenmeyer com capacidade de 500mL que foram mantidos sob agitação a 180rpm a 28°C. A cada dia foram retirados dois frascos para a determinação da biomassa, fenóis totais do sobrenadante e fenóis totais adsorvidos. A suspensão contida nos frascos foi filtrada em papel Whatman nº1 e a biomassa foi ressuspensa em 5mL de uma solução de metanol 30% v/v e centrifugada por 2h, 600rpm, conforme Denizli *et al.* (2005). Após a centrifugação, a biomassa foi novamente filtrada para a determinação do peso seco.

**[0070]** O meio utilizado para testar a capacidade de adsorção de fenóis totais pela biomassa fúngica foi constituído de 1g de glicose; 0,01g de proteína de soja; 10mL de Ss; 93,8mL de efluente da IPC (60mg/L de fenóis totais); 1mL de CuSO<sub>4</sub>(100mg/L); 0,1mL de solução de gentamicina (4,4mg/mL) e 0,1mL de solução de benomil (6g/L).

**[0071]** Durante os 7 dias de ensaio, observou-se a redução da concentração de fenóis totais em todos os dias de cultivo. A Figura 3 mostra que parte dos fenóis totais removidos, do 3º ao 7º dia, foram adsorvidos, indicando que a biomassa desta linhagem é capaz de adsorver fenóis totais.

### 3.6 Tratamento bacteriano aeróbio em frascos agitados

**[0072]** O efluente puro já caracterizado foi colocado em nove frascos Erlenmeyer de 250mL. O processo foi realizado em batelada e o suprimento de O<sub>2</sub> foi realizado através de um sistema de distribuição contendo esferas de pedras porosas (2cm de diâmetro), não sendo medida a vazão. Os frascos foram agitados (60rpm) em banho, e a temperatura foi mantida em 32°C. Diariamente, água evaporada dos frascos foi repostada, e procedeu-se a retirada de um frasco para realizar as análises de DQO, pH, cor e fenóis totais.

**[0073]** O meio para o ensaio aeróbio continha 76,85% de efluente da IPC; 3,15% de Ss (concentrada 20X); 20% de biomassa da estação de tratamento de efluentes (ETE) com uma DQO de 585,07mg/L. Concomitantemente, o

efluente tratado com *P. sajor-caju* entrou no processo aeróbio de lodo ativado, seguindo a mesma metodologia e concentrações descritas acima.

**[0074]** A Figura 4 mostra a concentração de matéria orgânica como DQO contida no efluente da IPC, durante 8 dias de tratamento bacteriano aerado. A DQO no cultivo com efluente tratado pelo fungo apresenta uma diminuição que é verificada já no primeiro dia, cuja redução ocorre até o final do cultivo. Estes resultados sugerem que o crescimento da linhagem de *P. sajor-caju* no meio contendo efluente da IPC favorece a degradação dos compostos orgânicos pelas bactérias.

#### **Exemplo 4. Ensaios em Reator de Bancada**

##### 4.1 Preparo do inóculo

**[0075]** Para o preparo do inóculo, dois discos de 1,5cm de diâmetro de colônias de 8 dias crescidas no MM foram dispostos em frascos Erlenmeyer de 500mL, contendo 100mL do meio PR e 15 esferas de vidro de 0,5cm de diâmetro. Os frascos foram mantidos em agitação (180 rpm), a 28°C, durante 3 dias

**[0076]** O meio líquido para preparação do inóculo foi constituído de 10ml de Ss; 0,1g de proteína de soja; 0,5g de glicose; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100mL. Após ser autoclavado o meio recebeu 0,1mL de solução de gentamicina (4,4mg/mL).

**[0077]** Em outro ensaio foi adicionado 5mL de efluente da IPC no inóculo para propiciar uma adaptação do fungo aos compostos do efluente.

##### 4.2 Avaliação da remoção de fenóis totais do efluente da IPC

**[0078]** Após 3 dias de crescimento no meio PR, 200mL da suspensão fúngica foram adicionados ao reator de bancada (capacidade para 5L) contendo 3.800mL do meio LE.

**[0079]** O meio líquido de ensaio continha 8g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,6g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,6g de CaCl<sub>2</sub>; 1,2g de MgSO<sub>4</sub>; 1,2g de uréia; 0,4mL de solução de micronutrientes; 190mL de água destilada; 40g de glicose; 0,4g de proteína de

soja; 40mL de solução de  $\text{CuSO}_4$  (1,56mg/L); 3.610mL de efluente da IPC. O meio foi autoclavado por 30 min a 1atm, exceto a glicose e a água destilada, que foram autoclavadas por 15 min a 1 atm. A concentração de oxigênio no meio foi mantida acima de 30% de saturação, variando-se a frequência do agitador e o fluxo de ar.

**[0080]** Amostras de 100mL foram retiradas a cada 24h, para a determinação de pH, cor, fenóis totais, atividade enzimática, açúcares redutores e biomassa sendo o micélio separado por filtração em papel Whatman nº 1.

**[0081]** A atividade de lacases foi detectada entre 100 e 120h de cultivo (5º dia), atingindo o pico em 144h, com 54,27U/mL. A atividade de VAO e lacases apresentaram níveis superiores (1,98U/mL no 9º dia e 54,27U/mL no 6º dia de cultivo).

**[0082]** Em outro ensaio em reator de bancada, o inóculo foi produzido no meio PR contendo 5% v/v de efluente com o objetivo de adaptar o fungo aos compostos tóxicos presentes no efluente. O meio foi constituído de 90% de efluente da IPC, sendo inoculado com 5% v/v da suspensão fúngica do cultivo pré-adaptado. O experimento foi conduzido por 15 dias, com coletas diárias para determinação da concentração de fenóis totais, pH, biomassa, açúcares redutores, cor e atividade enzimática.

**[0083]** Verifica-se que houve atividade de todas as enzimas estudadas. A atividade de lacases e MnP iniciaram em torno de 50h de cultivo. Para lacases, verificam-se três picos de atividade: o primeiro em 144h (6º dia) com 27,5U/mL, o segundo em 217,5h (9º dia) com 23,10U/mL; e o terceiro em 338h de cultivo (14º dia) com 33,19U/mL. As curvas de secreção de LiP e VAO tiveram perfis semelhantes, iniciando em 168,5h de cultivo (7º dia) e mantendo uma atividade crescente até 250,5h (10º dia), momento em que ambas atingiram o pico (19,27U/mL para LiP e 24,26U/mL para VAO), decrescendo lentamente em seguida. A secreção de MnP também teve dois picos de atividade: o primeiro com 96,5h de cultivo (4º dia) com 6,04U/mL, e o segundo com 338h (14º dia) com 4,92U/mL. Os resultados encontrados para MnP foram 4,94 U/mL.

**[0084]** O tempo de cultivo em que detectou-se a atividade das enzimas estudadas foi inferior ao verificado no ensaio anterior. Isso pode ser explicado pela adaptação do fungo aos compostos do efluente durante a preparação do inóculo.

#### 4.3 Tratamento bacteriano aeróbio em frascos agitados

**[0085]** O efluente previamente caracterizado foi colocado no reator e o suprimento de oxigênio ocorreu por uma mangueira de silicone circular perfurada localizada na base do reator, não sendo medida a vazão. O reator foi mantido em banho a 32°C. Diariamente, água evaporada do reator foi reposta e retirou-se uma alíquota de 50mL para realizar as análises de DQO, pH, cor e fenóis totais.

**[0086]** O meio para o ensaio aeróbio continha 76,85% de efluente da IPC; 3,15% de Ss (concentrada 20X); 20% de biomassa da estação de tratamento de efluentes (ETE) com uma DQO de 585,07mg/L. Concomitantemente, o efluente tratado com *P. sajor-caju* entrou no processo aeróbio de lodo ativado, seguindo a mesma metodologia e concentrações descritas acima.

**[0087]** Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que o efluente da indústria de papel e celulose em estudo, quando empregado para crescimento da linhagem de *P. sajor-caju* PS 2001, apresenta redução de toxidez para bactérias provenientes de lodos ativados de uma indústria de papel e celulose, possibilitando, portanto, remoção de matéria orgânica.

**[0088]** Estas observações sugerem que efluentes da indústria de papel e celulose, em vez de sofrerem tratamentos físicos ou químicos para a remoção de fenóis tóxicos às bactérias, poderiam alternativamente ser tratados por processos microbianos envolvendo *P. sajor-caju*, antes de serem encaminhados para lagoas aeradas.

### **Reivindicações**

1. Processo para remoção de compostos fenólicos de efluentes **caracterizado por** compreender as etapas de:

- a) etapa de condicionamento do fungo;
- b) adicionar a um efluente da indústria de papel e celulose compreendendo compostos fenólicos pelo menos um agente removedor de compostos fenólicos constituído de micélio do fungo *Pleurotus sajor-caju*; concentração que varia de 5% p/p a 40% p/p de biomassa;
- c) manter a mistura em uma faixa de temperatura de 25°C a 30°C de b) sob agitação por até 8 dias; e
- d) remover o agente removedor de compostos fenólicos do efluente.

2. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fungo ser *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.

3. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fungo estar presente em uma concentração de 20% p/p de biomassa.

4. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** composto fenólico ser escolhido do grupo que compreende fenol, lignina e seus derivados, compostos polifenólicos, catecol, 2-clorofenol, 2,6-diclorofenol, 5-cloroguaiacol, 4-clorocatecol, 4,6-dicloroguaiacol, 3,5-diclorocatecol, 4,5-dicloroguaiacol, 4,6-dicloroguaiacol, 3,4,5-tricloroguaiacol, 15 4,5,6-tricloroguaiacol, triclorosiringaldeído, e 2,6-diclorosiringaldeído, bem como a mistura dos mesmos.

5. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** composto fenólico ser lignina e seus derivados.

6. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** temperatura ser de 28°C.

7. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** etapa de condicionamento compreender uma etapa de cultivo do fungo em um meio compreendendo pelo menos um composto

fenólico.

8. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** composto fenólico que compreende o meio de cultivo do fungo ser escolhido do grupo que compreende fenol, lignina e seus derivados, compostos polifenólicos, catecol, 2-clorofenol, 2,6-diclorofenol, 5-cloroguaiacol, 4-clorocatecol, 4,6-dicloroguaiacol, 3,5- diclorocatecol, 4,5-dicloroguaiacol, 4,6-dicloroguaiacol, 3,4,5- tricloroguaiacol, 4,5,6-tricloroguaiacol, triclorosiringaldeído, e 2,6-diclorosiringaldeído, bem como a mistura dos mesmos.

9. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** composto fenólico ser fenol.

10. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** composto fenólico estar em uma concentração que varia de 0,00001 µg/mL a 0,1 µg/mL.

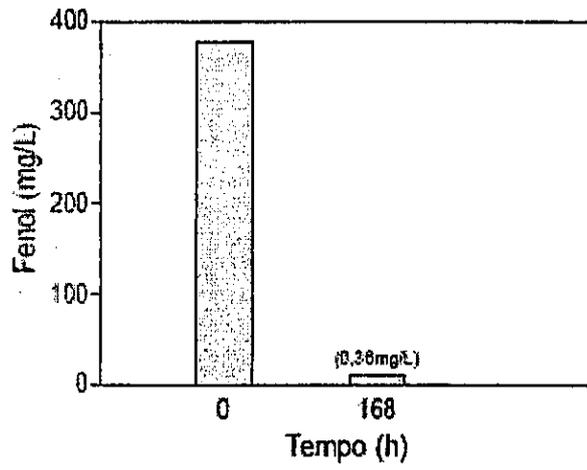
11. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** agente removedor de compostos fenólicos opcionalmente passar por um processo de adaptação ao crescimento em meio líquido.

12. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender uma etapa adicional de tratamento bacteriano aeróbio.

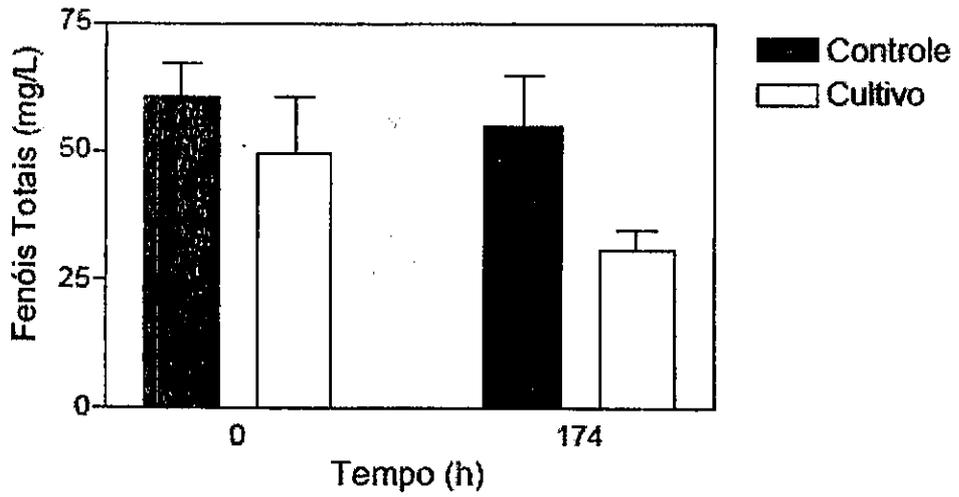
13. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pela** etapa adicional de tratamento bacteriano ocorrer após a remoção do agente removedor de compostos fenólicos.

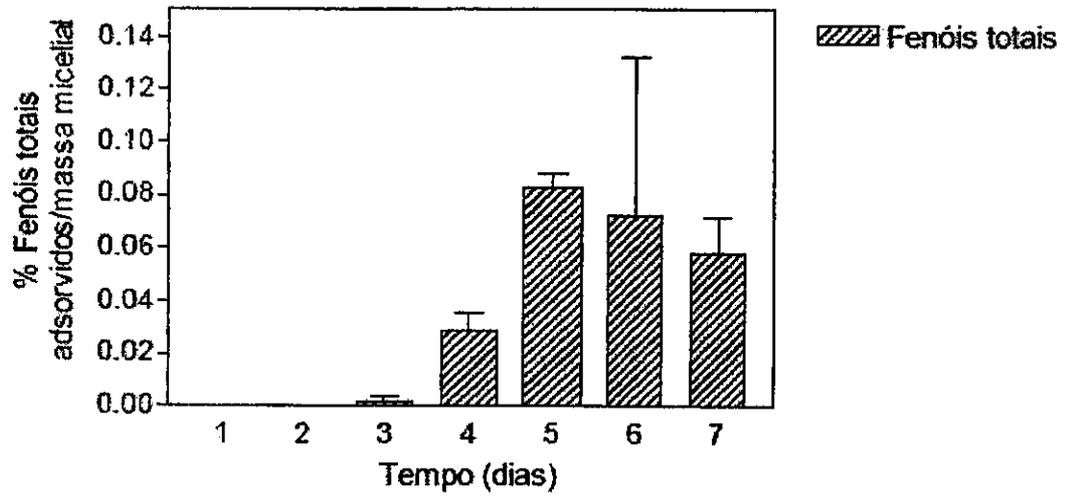
14. Processo para remoção, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pela** etapa adicional de tratamento bacteriano ocorrer antes da remoção do agente removedor de compostos fenólicos.

**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3****Figura 4**