

# UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE CUPUAÇU NA OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

**Sônia LIMA (1); Beatriz SOUZA (2); Libertalamar SARAIVA (3)**

- (1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. 7 de setembro, centro ó Manaus/AM, e-mail: [soniamelolima@hotmail.com](mailto:soniamelolima@hotmail.com)
- (2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. 7 de setembro, centro ó Manaus/AM, e-mail: [bia\\_blanda@hotmail.com](mailto:bia_blanda@hotmail.com)
- (3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. 7 de setembro, centro ó Manaus/AM, e-mail: [liberta.saraiva@gmail.com](mailto:liberta.saraiva@gmail.com)

## RESUMO

Os compostos fenólicos são acumulados nos corpos de água receptores e causam aumento da demanda de oxigênio. A problemática do descarte é decorrente do fato de que muitos desses poluentes se encontram dissolvidos no efluente e, portanto, não podem ser removidos por processos convencionais. Os fungos representam uma alternativa no tratamento de efluentes que possuem compostos aromáticos recalcitrantes. Este trabalho teve como objetivo estudar o potencial de degradação de compostos fenólicos por microrganismos isolados dos resíduos do processamento de cupuaçu, com cupuaçu como fonte primária de carbono. Os ensaios microbiológicos e físico-químicos foram realizados nos laboratórios de Microbiologia e Controle Ambiental do IFAM, Campus Manaus Centro. Foram isolados nove tipos diferentes de fungos dos quais dois foram selecionados, *Aspergillus flavus* e *Penicillium sp.* e, submetidos a diferentes concentrações de fenol, 100mg/L, 200mg/L e 300mg/L. Os resultados mostram que a eficiência de remoção de fenol de ambos os fungos foi baixa, muito provavelmente devido às condições de ensaio que não foram favoráveis à produção enzimática. Porém os resultados sugerem que os fungos podem degradar consorciadamente dois ou mais resíduos, desde que devidamente aclimatados a eles.

**Palavras-chave:** degradação de compostos fenólicos, fungos, resíduos de cupuaçu.

## 1 INTRODUÇÃO

Os fenóis e seus derivados são considerados produtos de difícil tratamento, no que se refere a sua remoção ou degradação do meio ambiente e de efluentes industriais, exigindo, portanto, o desenvolvimento de tecnologias inovadoras, eficientes e de baixo custo para a recuperação de ambientes contaminados. A degradação destes compostos tem sido objeto de vários estudos que visam minimizar o efeito deles no meio ambiente. Entre eles, a oxidação fotoquímica, a ozonização, a ozonização catalítica e a oxidação biológica que tem se revelado como uma forma efetiva para a remoção de compostos fenólicos de efluentes industriais e domésticos.

A atividade microbiana destaca-se como importante fator na eliminação de poluentes químicos, pois tanto bactérias quanto fungos têm desenvolvido mecanismos de sobrevivência na presença de compostos aromáticos em concentrações consideradas tóxicas. Os fungos representam uma alternativa no tratamento de efluentes que possuem compostos aromáticos recalcitrantes, como fenol e derivados.

Várias espécies de *Aspergillus* têm demonstrado eficiência para degradação destes compostos, porém as atividades dos microrganismos podem necessitar serem induzidas com uma fonte de carbono como a glicose ou outros açúcares, como resíduos de frutas.

Diante disto, o trabalho propôs estudar a potencialidade de degradação de compostos fenólicos por microrganismos isolados dos resíduos do processamento de cupuaçu a fim de contribuir com o

desenvolvimento de processos de oxidação biológica de tais compostos, promovendo a degradação consorciada de dois ou mais resíduos.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os compostos aromáticos apresentam características recalcitrantes e são altamente tóxicos e por este motivo, acumulam-se nos corpos de água receptores e causam aumento da demanda de oxigênio. A problemática do descarte é decorrente do fato de que muitos desses poluentes se encontram dissolvidos no efluente e, portanto, não podem ser removidos por processos físicos convencionais. Estes compostos são encontrados em diferentes concentrações em diversos tipos de águas residuárias de indústrias, tais como, as de azeite de oliva, química, farmacêutica, corantes, pesticidas, solventes, destilarias de vinhos, de resinas, de papel e outros (ALBUQUERQUE, 2000).

A presença de compostos fenólicos em águas residuárias é uma grande ameaça para o meio ambiente, pois entre os resíduos orgânicos, estes se apresentam como os de maior potencial poluidor por possuírem características ácidas, tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas, exigindo, portanto, tratamento antes de serem lançados em corpos de água receptores (Bolanhões Rojas, 2001 apud Rodrigues, 2004).

A ingestão contínua de fenol em níveis de concentração entre 10 e 140 mg/L, provoca diarreia, urina escura e danos na visão, tornando-se letal, quando sua concentração no sangue encontra-se por volta de 4,7 a 130 mg/100mL. Na concentração de 5 µg/L, o fenol causa mau cheiro em águas de rios. Desta forma, a eliminação do fenol é uma necessidade para a preservação da qualidade do meio ambiente (FALCONI, 1998).

Devido a características como baixo custo e possibilidade de tratar grandes volumes de efluentes, os tratamentos de efluentes aquosos utilizando-se de processos biológicos de degradação, tem sido os mais utilizados para a oxidação de poluentes orgânicos (BERTAZZOLI E PELGRINI, 2002).

Os fungos são microrganismos que conseguem degradar vários compostos recalcitrantes, pois são seres aclorofilados que necessitam de substâncias orgânicas que não conseguem sintetizar, absorvendo-as do meio através da produção de enzimas extracelulares que hidrolisam grandes moléculas, que se tornam assimiláveis por mecanismos de transporte. (TRABULSI, 2002; OLIVEIRA et al., 2005).

Outro fator de grande relevância é a capacidade que os fungos têm de suportar mudanças bruscas na concentração de matéria orgânica, além de tolerar grandes variações de pH e de temperatura e de se adequar a variações e escassez de umidade e oxigênio, tornando-se desta forma, viáveis no processo de tratamento biológico com reatores fúngicos (SANTAELLA et al., 1996).

Saraiva et al. (2009) utilizando-se reatores em batelada, inferiu que o fungo *Aspergillus sp.*, isolado do solo amazônico removeu 99,09% de fenol em água residuária sintética com adição de glicose como fonte primária de carbono. Concluiu também que mesmo com o decréscimo da oferta de glicose, o microrganismo manteve-se ativo e que a remoção de compostos fenólicos é viável em reator em batelada, devendo ainda ser estudadas concentrações maiores de fenol e outras fontes de carbono indutor como resíduo de frutas.

De acordo com Chaar (1980) apud Araújo (2007) o cupuaçu apresenta vários constituintes importantes como proteínas, gorduras, carboidratos, fibras, vitaminas, açúcares redutores e açúcares não redutores e presença de alguns minerais como cálcio, magnésio e ferro total. Desta feita, o cupuaçu possui características que se mostram favoráveis ao desenvolvimento das atividades dos microrganismos.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Pesquisa da microbiota e isolamento de fungos dos resíduos do processamento de cupuaçu

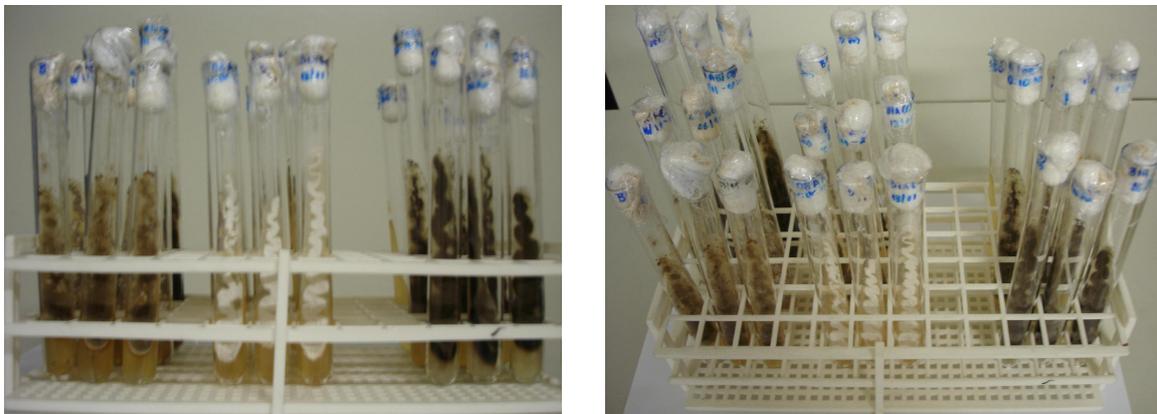
Foram isolados fungos presentes nos resíduos de cupuaçu (Figura 1) com o objetivo de selecionar o melhor agente degradador de fenol. Os fungos foram isolados da casca de cupuaçu por se ter escolhido usar como fonte indutora de carbono resíduos desta fruta (suco da polpa), visto que os nutrientes essenciais para a sobrevivência dos fungos, como carbono que se encontram presentes neste fruto, são assimiláveis mais facilmente por microrganismos que já estão acostumados com o cupuaçu como seu meio nutritivo do que por fungos isolados de outros ambientes. As amostras (cascas) foram guardadas em um ambiente úmido com a

finalidade de estimular o crescimento dos microrganismos, os quais foram isolados da parte interna e externa da casca com a finalidade de se obter fungos endofíticos e epifíticos. Os inóculos foram realizados em placas de petri contendo cerca de 20 mL de meio Ágar Batata, Ágar Saboraud e PCA, com o objetivo de se observarem diferentes comportamentos de crescimento durante a incubação à temperatura de 28°C. A fim de evitar contaminação por bactérias, foram adicionados 300 L de clorofórmio para cada 100mL de cada meio de cultura.

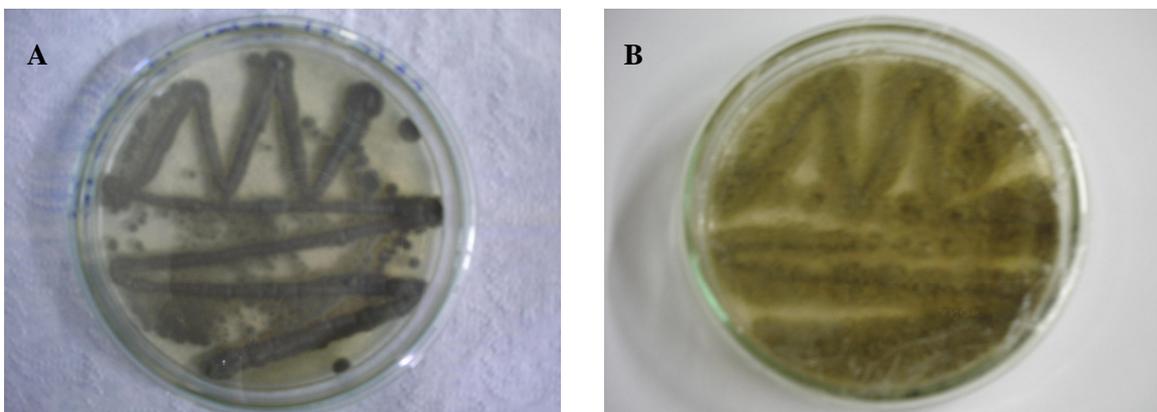


**Figura 1-Resíduos de onde os fungos foram isolados**

Depois de realizado o isolamento em placas de petri, fez-se a inoculação dos fungos obtidos, em tubos de ensaio em meio sólido inclinado (Figura 2), pois o ágar inclinado constitui-se um meio adequado para o cultivo de microrganismos, além de que, algumas características de cultivo, como a formação de pigmentos, podem ser observadas mais facilmente. Dentre os fungos isolados, foram selecionados dois tipos de fungos (Figura 3), para estudar qual o melhor agente degradador de fenol. O isolamento realizou-se no Laboratório de Microbiologia do IFAM, Campus Manaus, Centro.



**Figura 2-Tubos de ensaio com o meio sólido inclinado**



**Figura 3 - Fungos selecionados: A) *Penicillium sp.*; B) *Aspergillus flavus*.**

### 3.2 Inoculação de esporos de fungos em reatores de bancada em batelada

Após o período de incubação nos tubos inclinados, preparou-se uma suspensão de esporos dos fungos selecionados na proporção de  $2 \times 10^6$  esporos/mL para serem inoculados nos biorreatores de bancada em batelada. Para o preparo da solução de esporos foram adicionados 10mL de água destilada estéril no tubo de ensaio contendo o fungo e raspam-se os esporos para serem usados como inóculo. Desta solução, fez-se a contagem dos esporos em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico visualizando-os em monitor acoplado ao microscópio e ajustou-se à concentração desejada.

Os esporos foram inoculados em reatores de bancada em batelada contendo efluente sintético, cuja composição foi baseada em Silva, 2002 conforme Tabela 1.

Tabela 1 ó Composição do efluente sintético

Compostos	Concentração mg/L
NH <sub>4</sub> Cl	76,1
NaCl	10,1
KCl	4,7
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	46,2
NaHCO <sub>3</sub>	243,3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	16,7
ZnSO <sub>4</sub>	0,2
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,2
CuSO <sub>4</sub>	0,2
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2
Fenol	100 - 300
Cupuaçu	50
Clorofórmio	1%

Foi utilizada a técnica - colorimetria do crômio - proposta por Jirka e Carter (1975), que propõem a medida do parâmetro através da absorção das soluções do cátion. AS APHA-AWWA-WEF preconizam esta técnica como opção à titulometria, pois a titulometria apresenta alguns inconvenientes como, soluções titulantes instáveis que exigem padronizações frequentes; muito manipulativa; morosa; sem possibilidade de automação e pequena sensibilidade; Desta forma, utilizou-se o método calorimétrico no comprimento de onda de 600 nm, pois é nesta região do espectro onde o crômio (III) apresenta a maior absorção, sem que haja interferências do dicromato residual (ZUCCARI, 2005).

O efluente sintético foi inoculado em reatores de bancada em batelada (Figura 4), nos quais foram adicionados 250mL de efluente, 50 mg/L de solução de cupuaçu como fonte indutora de carbono e um 1mL de solução de esporos dos fungos selecionados. Os fungos foram inoculados em diferentes concentrações de fenol, 100mg; 200mg e 300mg e o tempo de reação foi de 28 dias, sendo as análises realizadas de 7 em 7 dias. O efluente, a solução de cupuaçu e os reatores foram esterilizados em autoclave à 121°C a 1atm por 15 minutos e manteve-se o pH do resíduo em 4,0, pois de acordo com Oliveira *et al* (2006) apud Rodrigues (2007) a faixa propícia para crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* encontra-se em torno de 4 a 5. As análises foram executadas nos Laboratórios de Microbiologia e de Controle e Análise Ambiental do IFAM, Campus Manaus Centro e seguiram as metodologias estabelecidas no Standard Methods of Water and Wasterwater (APHA, 1998).



Figura 4 ó Reatores em batelada

## 4 RESULTADOS, ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

### 4.1 Isolamento dos fungos

Foram isolados 9 tipos de fungos dos resíduos de cupuaçu, (Figura 5), dos quais, dois fungos foram escolhidos para estudar o potencial degradador de fenol de ambos. Os fungos escolhidos foram o *Aspergillus flavus* e o *Penicillium sp.*, os quais foram identificados por meio da técnica de microcultivo (RIDDEL, 1950).



Figura 5- Fungos isolados dos resíduos (cascas) de cupuaçu. A) *Aspergillus niger*; H) *Aspergillus flavus* e I) *Penicillium sp.* H e I fungos selecionados.

## 4.2 Determinação dos parâmetros cinéticos: tempo de reação e carbono orgânico (DQO)

A eficiência de remoção de fenol foi avaliada através da DQO durante 28 dias, analisando-se as amostras de 7 em 7 dias. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2 ó Variações de DQO nas diferentes concentrações de fenol durante 28 dias com adição, em todos os reatores, de 50mg/L de suco de cupuaçu como fonte de carbono**

Fungo: <i>Aspergillus flavus</i>	DQO mg/L					Eficiência de Remoção (E%)
	Bruto (1º dia)	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia	
Concentração de fenol						
100mg/L	176,3	123,9	114,1	100,9	74,8	57,6 %
200mg/L	346,5	323,6	310,5	300,6	290,9	16 %
300mg/L	493,8	480,7	474,2	451,3	431,6	12,6 %

**Tabela 3 ó Variações de DQO nas diferentes concentrações de fenol durante 28 dias com adição, em todos os reatores, de 50mg/L de suco de cupuaçu como fonte de carbono**

Fungo: <i>Penicillium sp.</i>	DQO mg/L					Eficiência de Remoção (E%)
	Bruto (1º dia)	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia	
Concentração de fenol						
100mg/L	222,1	146,8	130,5	123,9	104,3	60 %
200mg/L	411,9	375,9	323,6	317,2	300,7	27, %
300mg/L	608	585	565,9	503,7	490,5	19,3 %

## 4.3 Remoção de DQO

Os resultados da análise de DQO mostraram que ambos os fungos apresentaram baixa eficiência de remoção de matéria orgânica, apesar de ter o fungo *Penicillium sp* apresentado melhor eficiência frente ao *Aspergillus flavus*, o qual no período de 28 dias removeu 57,6% no reator cuja concentração de fenol correspondia a 100mg/L, enquanto que o *Penicillium sp* na mesma concentração durante o mesmo período, removeu 60% de matéria orgânica. Os fungos comportaram-se de maneira semelhante quando expostos à concentrações maiores de fenol, baixando a eficiência de remoção dentro do mesmo período, 28 dias. Contudo, o *Penicillium sp* mesmo em concentrações maiores apresentou valores maiores de remoção como pode se observar na Tabela 2, mostrando assim, maior resistência a compostos recalcitrantes e tóxicos como fenol. Para todas as concentrações de fenol, utilizou-se a mesma quantidade da solução de cupuaçu como fonte indutora de carbono, correspondente a 50mg/L.

## 5 DISCUSSÃO

Os fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium sp* são fungos filamentosos que apresentam pigmentação escura devido ao complexo melanínico em suas paredes celulares (POLAK, 1990 apud SILVA et al, 2007). De acordo com Griffit (1994) apud Silva et al (2007), a produção de melanina e outros pigmentos, está relacionada à oxidação de compostos fenólicos pelas enzimas fenoloxidasas e a mecanismos de resistência dos fungos escuros a ambientes em condições adversas, como resíduos de combustíveis. Isto justifica o fato

destes microrganismos apresentarem alta eficiência de remoção de fenol, bem como de outros compostos recalcitrantes. Silva (2007), usando *Aspergillus flavus* e *Penicillium sp* isolados de águas residuárias de postos de combustíveis concluiu que estes apresentam alto potencial degradador de fenol, preferencialmente o *Penicillium sp*, o qual degradou em 2 dias 478mg de fenol, usando glicose como fonte indutora de carbono. Diante destas características, observa-se que os mesmos fungos, não apresentaram comportamento semelhante, o que pode ser explicado por vários fatores como, por exemplo, o local de onde estes foram isolados, as condições de ensaio e a fonte indutora de carbono.

No estudo realizado por Silva (2007), os fungos foram isolados de águas residuárias de posto de combustível, onde os mesmos já se encontram adaptados a ambientes com a presença de compostos altamente tóxicos como fenol e derivados. Neste estudo, porém os fungos foram isolados de um vegetal, o cupuaçu, onde numa relação harmoniosa com o fruto, estes não necessitam de tanto esforço energético quanto precisam nos resíduos de combustíveis para oxidar matéria orgânica necessária para a sua sobrevivência. Diante disto, expô-los a estas condições, provoca certo descontrole no metabolismo destes fungos, visto que o esforço energético requerido passa a ser maior.

Além desta ponderação, as condições de ensaio nas quais os fungos foram submetidos contribuem significativamente para os resultados por eles apresentados. Sabe-se que vários fatores como pH, temperatura de incubação, presença de oxigênio, fonte de carbono, sistema de rotação entre outros, influenciam na síntese de enzima pelos microrganismos (HADEBALL, 1991 et al apud GONÇALVES, 2007). A degradação de compostos fenólicos, bem como de outros compostos está diretamente associada a produção enzimática pelos microrganismos, no entanto, os fatores citados acima são de grande relevância para as atividades dos mesmos. Trabalhou-se com os fungos em reatores de bancada em batelada em leito estacionário, sem adição posterior de oxigênio, sem controle de pH e temperatura, utilizando como fonte de carbono, resíduos de cupuaçu, os quais, por sua vez em estudos paralelos a este realizados no IFAM têm apresentado-se como uma fonte indutora de carbono de alta eficiência.

Os resultados obtidos mostram que os resíduos de cupuaçu são favoráveis para o crescimento de fungos degradadores de compostos fenólicos podendo ser usados no processo de tratamento biológico, promovendo a degradação consorciada de dois ou mais resíduos. No entanto, é necessário um estudo mais aprofundado das condições de ensaio, como pH, oxigênio dissolvido, tempo de reação e agitação do meio.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando os resultados obtidos, pode-se concluir que o resíduo do processamento de cupuaçu é viável como fonte primária de carbono na biorremediação de águas residuárias contendo compostos fenólicos, por fungos. Pode-se inferir também, que os fungos estudados, frente às características inerentes a eles, como alta produção de melanina que está intimamente ligada a produção de fenoloxidasas, são microrganismos que apresentam alto potencial degradador de fenol, considerando que as condições para a atividade enzimática deles devem ser otimizadas para que estes apresentem eficiência maior do que a apresentada neste estudo e para que sejam usados no tratamento biológico de compostos recalcitrantes.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita graça e misericórdia em nossas vidas. A Ele, devemos tudo que somos e tudo o que temos do contrário nada seríamos.

A todos àqueles que surgiram graciosamente em nosso caminho que não indiretamente, mas sempre diretamente contribuíram para nossa caminhada. A todos vocês, a nossa eterna gratidão.

À FAPEAM, por acreditar neste trabalho e financiá-lo. Ao IFAM, por ter concedido os laboratórios para realização desta pesquisa. Enfim, a todos que sempre torceram e acreditaram em nós.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Anjaina Fernandes de. **Biodegradação de compostos fenólicos incorporados em areia de moldagem utilizando microrganismos do solo**. Campinas: UNICAMP, 2000. Dissertação (Mestrado em

Engenharia Civil na área de concentração Saneamento), Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20 th edition. American Public Health Association, Washington, DC. USA. 1998.

ARAÚJO, L.M. **Produção de alimentos funcionais formulados com xilitol a partir de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e Maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. Manaus: UFAM, 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia, área de concentração: Tecnologia de frutos tropicais). Universidade Federal do Amazonas, 2007.

BERTAZZOLI, R.; PELEGRINI, R. Descoloração de poluentes orgânicos em soluções aquosas através do processo eletroquímico. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 477-482, 2002.

FALCONI, Fabiana André. **Bioconversão de compostos fenólicos por fungos ligninolíticos**. Campinas: UNICAMP, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

GONÇALVES, F.A.G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. Belo Horizonte: UFMG, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

JIRKA, A.M.; CARTER, M.J. Micro semi-automated analysis and wastewater for chemical oxygen demand. **Anal.Chem.**, v.47, p. 1397-1402, 1975.

RIDDEL, RW. **Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture**. *Mycologia*. 42: 265-270, 1950.

RODRIGUES, K. A. **Empregos de fungos para remover fenóis presentes em águas residuárias**. Relatório Técnico. Fortaleza, 2004.

RODRIGUES, K.A.; VIDAL, C.B.; ANDRADE, M.C.; SAMPAIO, G.. Eficiência da remoção de matéria orgânica e fenóis de água residuária da indústria de beneficiamento da castanha de caju pelo uso de reatores em batelada com inóculo de *Aspergillus Niger* AN 400. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2, 2007, João Pessoa. **Anais**.

SANTAELLA, S. T.; CAMPOS, J. R.; LINARES, T. L (1996). Degradação de fenóis por fungos presentes em águas residuárias de refinarias de petróleo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIO E AMBIENTAL, 23, 2007. **Revista Sanitária e Ambiental**.

SARAIVA, L.B.; REGO, E.F.; VIEIRA, P.G.A.; LIMA, S.M.M. Biodegradação de compostos fenólicos com *Aspergillus sp* selvagem de solo amazônico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 25, 2009. **Anais**.

SILVA, I.E.C.; LUDWIG, K.V.F.; NEUMANN, D.; SCHNEIDER, A.C.; ONOFRE, S.B.; Fungos degradadores de compostos fenólicos isolados de águas residuárias de postos de combustíveis. **Revista de Biologia e Saúde da UNISEP. Biology & Health Journal** ó v.1, n.1, 2. 2007.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed. ó São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

ZUCCARI, M.L.; GRANER, C.A.F.; LEOPOLDO, P.R. **Determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em águas e efluentes por método colorimétrico alternativo**. 2005.