



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL**

RENATA BARROS SILVEIRA

**DEGRADAÇÃO DE 2,4-DINITROFENOL POR *Aspergillus niger* AN 400 EM
REATORES EM BATELADAS**

FORTALEZA – CEARÁ

2014

RENATA BARROS SILVEIRA

**DEGRADAÇÃO DE 2,4-DINITROFENOL POR *Aspergillus niger* AN 400 EM
REATORES EM BATELADAS**

Orientadora: Profa. Dra. Glória M. Marinho Silva

Coorientador: Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo

FORTALEZA – CEARÁ

2014

RENATA BARROS SILVEIRA

**DEGRADAÇÃO DO 2,4-DINITROFENOL POR *Aspergillus niger* AN 400 EM
REATORES EM BATELADAS**

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e
Gestão Ambiental, do Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Glória M. Marinho Silva (Orientadora)
Instituto Federal do Ceará – IFCE

Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo
Instituto Federal do Ceará – IFCE

Profª. Dra. Rosa Ferreira Araújo de Abreu
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

À minha família

*Aos meus filhos, Isaque, Aimee e em especial
ao meu marido Milton Colares por cuidar da
nossa família nos momentos que me encontrei
ausente e ele tão presente.*

AGRADECIMENTOS

Àqueles que participaram comigo, direta ou indiretamente, desse momento que pareceu uma tarefa interminável, enigmática e que só se tornou realizável devido a essa colaboração. E é a essas pessoas que gostaria de agradecer.

A *DEUS* por permitir a realização desse trabalho e por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Ao meu marido *Milton Colares*, pelo carinho, paciência e renúncia que foram essenciais ao sucesso deste trabalho.

Aos meus filhos *Isaque e Aimee*, por serem a alegria da minha vida.

Aos meus amados pais *Carlos Alberto (Betim)* e *Marlene*, pelo exemplo de simplicidade, honestidade, dedicação, zelo e apoio incondicional, aos quais tenho uma dívida de gratidão eterna.

Aos meus irmãos *Rossana, Róger e Rachel* (em memória), pela presença sempre constante em minha vida.

Ao meu coorientador professor Doutor Rinaldo dos Santos Araújo, pelo apoio na realização desse trabalho, bem como pela permissão em usar o Laboratório de Tecnologia Química para as análises cromatográficas com a colaboração de Julie e Cassiano.

Às Professoras Doutoradas *Técia Carvalho e Emília Santos*, à doutoranda *Bárbara Barbosa*, pela participação em minha banca de qualificação com contribuições enriquecedoras.

À Professora Doutora Rosa de Abreu que aceitou compor minha banca de defesa.

À *Mira Raya*, que pelo pouco tempo de convivência foi suficiente para reconhecer uma amizade verdadeira e prestativa. Obrigada por nunca me negar ajuda.

À *Fábia Pinho*, pelas trocas de conhecimento, conversas, risadas e companheirismo na hora da escrita. Não sei como serão nossas futuras tardes.

Aos amigos do LATAM, em especial a professora Doutora Kelly Rodrigues e às bolsistas de Iniciação Científica *Lia*, *Luciane Mara* e *Raquel*. A colaboração de vocês foi essencial para realização deste trabalho.

A todos os professores do Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental, pela agradável convivência e, principalmente, pela contribuição à minha formação profissional.

À Secretária do Mestrado *Clédina*, pela atenção, carinho e paciência.

Agradecimento especial

À minha orientadora, Professora Doutora ***Glória Maria Marinho Silva*** por acreditar que eu era capaz. Você abriu as portas, como uma irmã que cuida de um irmão mais novo. Nesse mundo, você me faz acreditar que os bons são a maioria. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, *puxões de orelha*, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspirações para me tornar melhor. Tenho orgulho em dizer que fui sua orientanda.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein.

*"Entrega teu caminho ao Senhor, confia Nele
e o mais Ele fará".*

Salmo 37:5.

RESUMO

Nesta pesquisa foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* AN 400 no tratamento de água sintética contendo 2,4-dinitrofenol em reatores em regime de bateladas. O tratamento foi desenvolvido em 3 fases. Na fase 1 foi realizado o crescimento do inóculo fúngico; Teste de Toxicidade em placas e Teste de Adsorção. Como resultados verificou-se que os fungos cresceram em todas as concentrações impostas e que o 2,4-dinitrofenol não ficou retido no meio suporte. Na fase 2 foram montados: 12 reatores de controle contendo 5 g.L⁻¹ de 2,4-dinitrofenol e 1 mL.L⁻¹ de solução de Vishiniac; 12 reatores contendo a água sintética (5 g.L⁻¹ de 2,4-dinitrofenol, 1 mL.L⁻¹ de solução de Vishiniac e a suspensão de esporos de 2 x 10⁶ esporos.mL⁻¹); 12 reatores contendo a água sintética e 0,5 g.L⁻¹ de glicose; 2 reatores contendo a água sintética e 3 g.L⁻¹ de glicose; 2 reatores contendo a água sintética e 5 g.L⁻¹ de glicose e 2 reatores contendo a água sintética e 10 g.L⁻¹ de glicose. Os reatores foram mantidos sob agitação (120 rpm), a temperatura ambiente. Os tempos de reação estudados foram de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. O acompanhamento da biodegradação foi realizado segundo as análises de pH, demanda química de oxigênio, sólidos suspensos voláteis e concentração de 2,4-dinitrofenol. Nesta fase, a remoção do 2,4-dinitrofenol atingiu os percentuais de 11,6% no reator com fungo e 23,5% no reator com fungo e glicose (0,5 g.L⁻¹), 62,3% no reator com fungo e glicose (3 g.L⁻¹), 80,4% no reator com fungo e glicose (5 g.L⁻¹) e 40,1% no reator com fungo e glicose (10 g.L⁻¹). Na fase 3, a biomassa foi imobilizada em meio suporte na concentração de 2 x 10⁶ esporos.mL⁻¹. Após o período de imobilização, foi iniciada a batelada contendo a água sintética e 0,5 g.L⁻¹ de glicose. Os tempos de reação foram de 168, 48, 24 e 8 horas com 4 ciclos cada, sendo as amostras coletadas e analisadas nesses períodos. Já na fase 3, a melhor remoção ao final do tratamento foi para o tempo de reação de 48 h sendo de 99% de 2,4-dinitrofenol. Os resultados mostraram que as melhores remoções alcançadas foram na fase 3, indicando que a utilização do fungo *Aspergillus niger* AN 400 pode ser uma alternativa no tratamento de água residuária contendo compostos fenólicos.

Palavras-Chaves: Nitrofenólicos; Fungos; Biorremediação; Cossustrato e Reatores em Batelada.

ABSTRACT

In this research the fungus *Aspergillus niger* AN 400 in the treatment of synthetic water containing 2,4-dinitrophenol in reactors under batch was used. The treatment was carried out in three stages. In phase 1 the growth of fungal inoculum was performed; Toxicity test plates and Adsorption Test. As a result it was found that the fungus grew at all concentrations imposed and 2,4-dinitrophenol was not retained on the support medium. In phase 2 were assembled: 12 Control reactors containing 5 g.L⁻¹ of 2,4-dinitrophenol and 1 mL.L⁻¹ solution Vishiniac; 12 reactors containing synthetic water (5 g.L⁻¹, 2,4-dinitrophenol, 1 mL.L⁻¹ Vishiniac solution and a spore suspension of 2×10^6 esporos.mL⁻¹); 12 reactors containing synthetic water and 0.5 g.L⁻¹ glucose; 2 reactors containing synthetic water and 3g.L⁻¹ glucose; Two reactors containing synthetic water and 5 g.L⁻¹ glucose and second reactors containing synthetic water and 10 g.L⁻¹ glucose. The reactors were maintained under agitation (120 rpm) at room temperature. The reaction times studied were 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours. The monitoring of biodegradation was performed according to the analyzes of pH, chemical oxygen demand, suspended solids and volatile concentrations of 2,4-dinitrophenol. At this stage, the removal of 2,4-dinitrophenol percentage reached 11.6% in the reactor to 23.5% and fungus with fungus in the reactor and glucose (0.5 g.L⁻¹), 62.3 % in the reactor with fungus and glucose (3 g.L⁻¹), 80.4 % in the reactor with fungus and glucose (5 g.L⁻¹) and 40.1 % in the reactor with fungus and glucose (10 g.L⁻¹). In step 3, the biomass was immobilized on support means at a concentration of 2×10^6 esporos.mL⁻¹. Soon after the immobilization period was initiated batch containing the synthetic water and 0.5 g.L⁻¹ glucose. The reaction times were 168, 48, 24 and 8 hours with 4 cycles each, collected and analyzed the samples in these periods. In phase 3, the best means of removal at the end of treatment was for the reaction time of 48 h and 99 % of 2,4-dinitrophenol. The results showed that the removals achieved were better in phase 3, indicating that the use of *Aspergillus niger* AN 400 may be an alternative treatment of wastewater containing phenolic compounds.

Key Words : Nitrophenols; Fungi ; Bioremediation; Co-substrate and Batch Reactors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula estrutural do 2,4-dinitrofenol.	25
Figura 2 -	Sequência operacional de um reator em batelada.	29
Figura 3 -	Representação das etapas de oxidação do nitrogênio.	41
Figura 4 -	Caminhos de reação para degradação fotocatalítica do 2,4-DNF.	42
Figura 5 -	Caminhos de degradação do 2,4-DNF formando (a) 2-amino-4-nitrofenol, (b) 4,6-dinitrohexanoato ou ácido 3-nitroadípico e (c) hidroquinona.	43
Figura 6 -	Microscópio Ótico e câmara de Neubauer.	49
Figura 7 -	Imobilização da biomassa fúngica de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 em cubos de poliuretano.	53
Figura 8 -	Reator em batelada sequencial com biomassa imobilizada com <i>Aspergillus niger</i> AN 400 nos tempos: a) 24 h b) 48 h c) 72 h d) 96 h e) 168 h.	55
Figura 9 -	Teste de Toxicidade com 0 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 40.	58
Figura 10 -	Teste de Toxicidade com 5 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	58
Figura 11 -	Teste de Toxicidade com 10 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	58
Figura 12 -	Teste de Toxicidade com 20 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	59
Figura 13 -	Teste de Toxicidade com 40 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	59
Figura 14 -	Teste de Toxicidade com 50 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	59
Figura 15 -	Teste de Toxicidade com 60 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 40.	60
Figura 16 -	Teste de Toxicidade com 80 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	60
Figura 17 -	Teste de Toxicidade com 90 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 40.	60
Figura 18 -	Teste de Toxicidade com 100 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	61
Figura 19 -	Teste de Toxicidade com 200 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	61
Figura 20 -	Teste de Toxicidade com 300 mg.L ⁻¹ de 2,4-DNF ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	61
Figura 21 -	Relação entre DQO _{final} e DQO _{inicial} obtida nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 0,5 g.L ⁻¹ de glicose durante 144 h de experimento.	64
Figura 22 -	Variação da concentração de SSV (mg.L ⁻¹) obtido nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 0,5 g.L ⁻¹ de glicose durante 144 h de experimento.	66
Figura 23 -	Percentual de remoção do 2,4-DNF obtido nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 0,5 g.L ⁻¹ de glicose durante 144 h de experimento.	67

Figura 24 -	Relação entre DQO_{final} e $DQO_{inicial}$; Relação entre SSV_{final} e $SSV_{inicial}$ e Percentual de remoção de 2,4-DNF obtidos nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 3 g.L^{-1} , 5 g.L^{-1} e 10 g.L^{-1} de glicose nos tempos de 0 h e 144 h de experimento.	69
Figura 25 -	Variação de pH obtido nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 3 g.L^{-1} , 5 g.L^{-1} e 10 g.L^{-1} de glicose nos tempos de 0 h e 144 h de experimento.	70
Figura 26 -	Percentuais de remoção de DQO obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 96 e 168 h de experimento.	74
Figura 27 -	Variação das concentrações de nitrato e amônia (mg.L^{-1}) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 0 h, 96 h e 168 h de experimento.	76
Figura 28 -	Variação do pH obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 0 h, 96 h e 168 h de experimento.	78
Figura 29 -	Variação da concentração de nitrito (mg.L^{-1}) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 0 h, 96 h e 168 h de experimento.	80
Figura 30 -	Percentual de remoção de 2,4-DNF nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 96 h e 168 h de experimento.	81
Figura 31 -	Teste de adsorção realizado em espumas de poliuretano e 2,4-DNF com concentração inicial de $5,3\text{ mg.L}^{-1}$	82
Figura 32 -	Percentual de remoção de 2,4-DNF nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 48, 24 e 8 h de experimento.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades físicas do 2,4-DNF.	26
Tabela 2 -	Elementos químicos requeridos para a célula fúngica.	34
Tabela 3 -	Alguns estudos utilizando fungos na degradação de compostos poluentes.	36
Tabela 4 -	Padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde.	44
Tabela 5 -	Valor máximo permitido para lançamento de efluentes em corpos hídricos.	45
Tabela 6 -	Valores máximos permitidos de substâncias constantes em efluentes de fontes poluidoras.	45
Tabela 7 -	Padrões de qualidade de água para consumo.	46
Tabela 8 -	Composição química da Solução de Vishniac.	48
Tabela 9 -	Solução de Vishniac utilizada na biodegradação de 2,4-DNF.	48
Tabela 10 -	Divisão dos reatores com suas respectivas quantidades de glicose e fungos.	50
Tabela 11 -	Composição da água sintética de 2,4-DNF empregada nos reatores em bateladas com biomassa dispersa.	51
Tabela 12 -	Composição do meio mineral que alimenta o reator durante a imobilização da biomassa fúngica.	52
Tabela 13 -	Tempos reacionais de operação nas bateladas sequenciais com biomassa imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	54
Tabela 14 -	Valores de pH obtidos nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 0,5 g.L ⁻¹ de glicose durante 144 h de experimento.	62
Tabela 15 -	Valores da concentração de DQO (mg.L ⁻¹) obtidos nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 0,5 g.L ⁻¹ de glicose durante 144 h de experimento.	64
Tabela 16 -	Valores das concentrações de 2,4-DNF (mg.L ⁻¹) obtidos nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 0,5 g.L ⁻¹ de glicose durante 144 h de experimento.	67
Tabela 17 -	Variáveis utilizadas para analisar a água sintética do reator em batelada com biomassa dispersa nas concentrações de glicose de 3, 5 e 10 g.L ⁻¹ nos tempos de 0 h e 144 h.	68
Tabela 18 -	Variáveis utilizadas para analisar a água sintética do reator em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada no Ciclo 1 do TR de 168 h.	72
Tabela 19 -	Valores de pH e concentrações de DQO, nitrito, nitrato, amônia e 2,4-DNF expressos em (mg.L ⁻¹) obtidos na água sintética dos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada no Ciclo 2 do TR de 168 h.	72
Tabela 20 -	Valores de pH e concentrações de DQO, nitrito, nitrato, amônia e 2,4-DNF expressos em (mg.L ⁻¹) obtidos na água sintética dos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada no Ciclo 3 do TR de 168 h.	73

Tabela 21 -	Valores de pH e concentrações de DQO, nitrito, nitrato, amônia e 2,4- DNF expressos em (mg.L ⁻¹) obtidos na água sintética dos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada no Ciclo 4 do TR de 168 h.	73
Tabela 22 -	Variação de concentrações de DQO (mg.L ⁻¹) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nas 48, 24 e 8 h de experimento.	83
Tabela 23 -	Variação das concentrações de nitrato (mg.L ⁻¹) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nas 48, 24 e 8 h de experimento.	83
Tabela 24 -	Variação das concentrações de amônia (mg.L ⁻¹) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nas 48, 24 e 8 h de experimento.	84
Tabela 25 -	Variação das concentrações de nitrito (mg.L ¹) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nas 48, 24 e 8 h de experimento.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-DNF	2,4-dinitrofenol
2,6-DNP	2,6-dinitrofenol
3-NP	3-nitrofenol
ADP	Adenosina difosfato
AGV	Ácidos graxos voláteis
ATP	Trifosfato de adenosina
BIN	Pó de bagaço da casca de coco <i>in natura</i>
BOD ₅ /COD	Relação entre Demanda Biológica de Oxigênio e Demanda Química de Oxigênio
BT	Pó de bagaço <i>in natura</i>
CA	Carvão ativado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
FDA	Administração Federal de Drogas
HMX	octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7- tetrazocina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HPTLC	Cromatografia Líquida em Camada fina em alta pressão
KI	Constante de inibição
K _M	Constante de Michaelis-Menten
K _{max}	Taxa máxima de degradação específica
K _S	Constante de saturação
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
N-amoniacal	Nitrogênio-amoniacal
OD	Oxigênio dissolvido
PET	Polietileno de tereftalato
PVA	Álcool polivinílico
RCe	Reatores controle com espuma de poliuretano
RCp	Reatores controle com PET
RDX	hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina

RFD	Dose de referência
Rfe	Reatores com fungos com espuma de poliuretano
RFp	Reatores com fungos e com PET
RFSe	Reatores com fungos, com sacarose e espuma de poliuretano
RFSp	Reatores com fungos, com sacarose e PET
RSB	Reator Sequencial em Batelada
SEMACE	Superintendência Estadual do Meio Ambiente
SNC	Sistema Nervoso Central
TNT	Trinitrotolueno
TR	Tempo de reação
UASB	Reator de Manta de lodo anaeróbio de fluxo ascendente
$V_{\max}$	Velocidade máxima de reação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVO GERAL	23
2.1 Objetivos específicos	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Compostos Nitroaromáticos	24
3.2 Reatores biológicos em bateladas	26
3.3 Importância do cossubstrato ou produtos primários nos processos de degradação de poluentes tóxicos.....	30
3.4 Fungos	32
3.5 Biorremediação dos nitrofenóis	39
3.6 Levantamento sobre Legislação Brasileira referente aos parâmetros pH, DQO, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal e fenóis.	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Preparo do eluente sintético	47
4.2 Cultivo, produção e contagem do inóculo (<i>Aspergillus niger</i> AN 400)	49
4.3 Teste de toxicidade do 2,4-dinitrofenol ao <i>Arpergillus niger</i> AN 400	50
4.4 Operação em Reatores em Bateladas com biomassa fúngica dispersa.	50
4.5 Ensaio de adsorção ao meio suporte.....	52
4.6 Operação em Reatores em Bateladas Sequenciais com biomassa fúngica imobilizada.....	52
4.6.1 Imobilização da biomassa	52
4.6.2 Montagem e operação do reator em batelada sequencial com biomassa imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1 Toxicidade do 2,4-Dinitrofenol ao <i>Arpergillus Niger</i> AN 400	56
5.2 Operação em Reatores em Bateladas com biomassa fúngica dispersa	62
5.2.1 1º lote - Batelada contendo 0,5 g.L ⁻¹ de glicose	62
5.2.1.1 pH	62
5.2.1.2 DQO	63
5.2.1.3 Sólidos suspensos voláteis (SSV)	65

5.2.1.4 Composto 2,4-Dinitrofenol (2,4-DNF)	66
5.2.2 2º lote - Batelada contendo 3 g.L ⁻¹ , 5 g.L ⁻¹ e 10 g.L ⁻¹ de glicose.	68
5.3 Operação em Reator em Bateladas Sequenciais com Biomassa Fúngica	
Imobilizada.	71
6. CONCLUSÕES.....	87
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

Uma das preocupações mundiais referente ao meio ambiente está relacionada à grande quantidade de efluentes industriais e domésticos gerados, visto à complexidade de produtos descartados nos mananciais sem tratamento prévio. Estes produtos são geralmente de difícil degradação ou de alta carga poluidora, e se acumulam e contaminam organismos aquáticos e terrestres afetando os ciclos biológicos. Desta forma há uma necessidade de utilização de tratamentos que tornem a qualidade desses despejos aceitáveis, de forma a minimizar a poluição dos rios e lagos.

Um destes compostos poluidores são os nitrofenóis, utilizados como intermediários sintéticos no fabrico de pesticidas, corantes, borrachas químicas, explosivos, preservativos de madeira e solventes industriais (GUPTA *et al.*, 2006; GEMINI *et al.*, 2007; SHE *et al.*, 2012), sendo o 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF) considerado “poluente prioritário” e de concentração restrita (GEMINI *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007).

Sua exposição se dá pelo escoamento dos pesticidas à água e de lançamentos para o ar a partir das fábricas. Dentre os efeitos tóxicos causados pelo 2,4-DNF, estão o aumento da taxa metabólica basal, náuseas, vômitos, sudorese, tontura, dor de cabeça, perda de peso, formação de cataratas, lesões na pele e efeitos sobre a medula óssea, sistema nervoso central (SNC) e sistema cardiovascular. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) não classificou o 2,4-DNF para o potencial de carcinogenicidade, porém classificou-o como substância tóxica. A dose de referência (RFD) é de 0,002 mg/Kg/d com base na formação de catarata em humanos (US EPA, 2000).

O 2,4-DNF é pouco solúvel em água e solúvel em lipídeos, por este motivo é bem absorvido através da pele, por inalação e por via oral (MIRANDA *et al.*, 2006). Funciona como agente químico que desacopla o transporte de elétrons na fosforilação oxidativa evitando a fosforilação do ADP em ATP, sem inibição de transporte de elétrons, causando aumento das taxas de metabolismo dos lipídeos e consumo de O_2 (GRIFFIN, 1994). O 2,4-DNF foi um dos ingredientes empregados em medicamentos para perda de peso no início de 1930. No entanto, seus efeitos colaterais, incluindo catarata, insuficiência renal, podem levar o indivíduo até a morte por hipotermia. Tal ocorrência provocou a suspensão de seu uso como intermediários em medicamentos para perda de peso. Para os entusiastas da musculação o assunto voltou a ser de interesse. Embora a droga seja ilegal nos EUA, ela pode ser comprada pela internet com outros nomes (MIRANDA *et al.*, 2006).

Muitas pesquisas têm buscado soluções para eliminar os nitrofenóis por serem considerados nocivos, ao meio ambiente e à saúde do homem. Dentre os métodos de degradação dos nitrofenóis estão: degradação fotocatalítica em solução aquosa sobre reator de leito fixo contendo material poroso $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (NAKANO *et al.*, 2004); oxidação fotocatalítica heterogênea com diferentes catalisadores, como: TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-P25}$, CDs, WO_3 e ZnO (SWARNALATHA e ANJANEYULU, 2004); processos de Fenton e foto-Fenton na presença de radiação solar (KAVITHA e PALANIVELU, 2005); Fenton fotoassistido usando Al_2O_3 como catalisador, na presença de H_2O_2 e luz solar (WANG *et al.*, 2010); tratamento adsorptivo e fotocatalítico usando filme de TiO_2 com superfície de carbono ativado (CAO *et al.*, 2010); adsorção em pó de bagaço da casca de coco *in natura* (BIN), pó de bagaço *in natura* (BT) e carvão ativado (CA) e oxidação avançada tipo: fotoquímica e eletroquímica, Fenton e fotolítico em solução aquosa (NOGUEIRA, 2009). Processos eletroquímicos apesar de serem métodos de alta eficiência por utilizarem o elétron como principal reagente e ser uma espécie limpa (NOGUEIRA *et al.*, 2009), podem demandar custos mais elevados, quando comparados aos processos de biodegradação.

A degradação microbiana ou biodegradação é importante e eficaz na remoção de compostos xenobióticos no ambiente. Os micro-organismos têm a capacidade de interagir química e fisicamente com substâncias levando a alterações estruturais ou completa degradação da molécula alvo. Entre as comunidades microbianas, bactérias e fungos são os principais transformadores deste tipo de molécula. Os fungos são os principais produtores de enzimas oxidativas para remediações dos ambientes poluídos por xenobióticos. Estes organismos são mais eficazes, uma vez que são organismos resistentes e podem tolerar concentrações elevadas de poluentes mais do que as bactérias (SOARES *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2012).

Sampaio (2005) utilizou a espécie *Aspergillus niger* AN 400 na remoção dos pesticidas atrazina e metil-paration, alcançando respectivamente remoções de até 60% e 94% dos pesticidas; Pinto *et al.* (2012), utilizaram fungos isoladamente para avaliar a habilidade em degradar pesticidas (terbutilazina, difenoconazol e pendimetalina). Os percentuais de remoções encontrados mostraram que o processo depende da espécie fúngica e as melhores taxas de remoções obtidas foram: *Aspergillus oryzae* que removeu aproximadamente 80% de terbutilazina; *Fusarium oxysporum*, *Lecanicillium saksenae* e *Lentinula edodes* removeram acima de 90% de pendimetalina; *Penicillium brevicompactum* removeu o difenoconazol. SILVA *et al.* 2007 *apud* Soares *et al.* 2011, empregaram as seguintes espécies fúngicas para degradar compostos fenólicos a partir de águas residuárias de postos de gasolinas: *Aspergillus*

flavus, *Claddosporium* sp., *Penicilium* sp. e *Phoma* sp., mostrando resultados promissores; Perchet *et al.* (2008), investigaram a biodegradação dos compostos RDX, HMX, Dinoseb e Dinoterb, em condições anaeróbias, contidos em sedimentos de um sistema de lagoas. Os dados mostraram que depois de 75 dias, Dinoseb e Dinoterb foram 100% degradados, enquanto que RDX e HMX não foram consumidos.

Com base neste contexto, esta pesquisa investigou a capacidade do fungo filamentoso *Aspergillus niger* AN 400 em degradar 2,4-dinitrofenol presente em água sintética empregando reatores em bateladas com biomassa dispersa e imobilizada.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade do fungo filamentoso *Aspergillus niger* AN 400 em degradar 2,4-dinitrofenol de água sintética, suplementada com glicose e solução de micronutrientes, em reatores de bancada em regime de bateladas com biomassa dispersa e imobilizada.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade do 2,4-dinitrofenol nas concentrações de 300 mg.L⁻¹, 200 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹, 90 mg.L⁻¹, 80 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 40 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹ ao *Aspergillus niger* AN 400;
- Investigar o efeito da glicose, como cossubstrato, nas concentrações de 0,5 g.L⁻¹, 3 g.L⁻¹, 5 g.L⁻¹, 10 g.L⁻¹ na remoção do 2,4-dinitrofenol nos reatores em bateladas com biomassa dispersa;
- Avaliar a eficiência de degradação do 2,4-dinitrofenol em reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada;
- Comparar a eficiência de degradação do 2,4-dinitrofenol pelo *Aspergillus niger* AN 400 nos reatores com biomassa dispersa e com biomassa imobilizada.
- Otimizar o tempo de reação (TR) para remoção do 2,4-dinitrofenol, DQO, nitrato e amônia em reatores em batelada com biomassa fúngica imobilizada.
- Conferir as concentrações de 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF), DQO, nitrato e amônia ao final do tratamento visando adequação aos padrões de lançamento de efluente em corpos hídricos descritos pela Resolução CONAMA no. 430 de 2011 e pela Portaria SEMACE 154 de 2002.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Compostos Nitroaromáticos

Dentre o grande número de compostos orgânicos, os compostos aromáticos contendo nitrogênio tais como os nitrobenzenos, nitrofenóis e anilinas são produzidas em larga escala e são amplamente usados como material de partida para a síntese de pesticidas, corantes e fármacos (LIU *et al.*, 2007), produzidos a partir de compostos de aplicação pirotécnica (PERCHET *et al.*, 2008), produzidos da queima incompleta de combustíveis fósseis (KULKARNI e CHAUDHARI, 2007), intermediários de plásticos, corantes azóicos, pigmentos, preservativos de madeira, produtos químicos de borracha e explosivos (KULKARNI, 2013), ou seja, são considerados poluentes exclusivos de fontes antropogênicas (GEMINI *et al.*, 2005). Os compostos aromáticos nitrogenados são revelados como tóxicos ou mutagênicos e sua liberação para o meio ambiente é assunto de regulamentação governamental (LIU *et al.*, 2007).

Os compostos nitroaromáticos são estáveis, persistentes e altamente tóxicos. A presença do grupo nitro ($-\text{NO}_2$), que possui caráter elétron-retirante, reduz a densidade eletrônica do anel aromático e inibe o ataque eletrofílico oxidativo por oxigenase em bactérias aeróbias. O aumento no número de grupos nitro e substituintes elétrons retiradores conferem suscetibilidade ao ataque eletrofílico e facilidade na redução dos grupos nitros, consequentemente, compostos nitroaromáticos são reduzidos a derivados mais reativos e carcinogênicos quando introduzidos no sistema mamário (KARIN e GUPTA, 2006; KULKARNI e CHAUDHARI, 2007). A microflora intestinal e órgãos mamários contêm nitroredutase não específica que catalizam a conversão dos grupos nitro para grupos mais prejudiciais como nitroso e hidroxiamino (KULKARNI e CHAUDHARI, 2007).

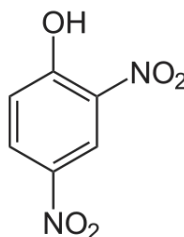
O grupo hidroxila ligado diretamente ao anel aromático é característico da estrutura fenólica, portanto o nitrofenol pertence ao grupo dos fenóis nitrados, com pelo menos um grupo nitro ($-\text{NO}_2$) ligado ao anel aromático do fenol (McMURRY, 2011).

Por serem lipossolúveis, os fenóis e seus derivados acumulam-se na gordura dos peixes e provê gosto ruim tanto aos peixes como às águas, mesmo em pequenas concentrações, abaixo de 1 mg.L^{-1} . Os peixes que consomem estes compostos apresentam movimentos natatórios rápidos, maior batimento opercular, alteração na cor, maior secreção do muco, convulsões, maior sensibilidade ao ataque de parasitas e lamelas branquiais

escurecidas. Em altas concentrações podem provocar hemólise e ação paralisante dos mecanismos neuromusculares, levando até o óbito¹.

O composto químico estudado nesta pesquisa pertence à família dos nitrofenóis, 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF), de fórmula estrutural apresentada na Figura 1. Produto químico utilizado no início do século XX para dar ignição a artefatos de dinamite e também para moldar tintura amarela em artigos artesanais de madeira. Logo depois estudos estatísticos demonstraram que os trabalhadores que manuseavam o 2,4-DNF diariamente, perdiam peso com frequência e de forma rápida. Uma pesquisa feita pela Universidade de Stanford demonstrou que o uso do 2,4-DNF causava emagrecimento, desta forma médicos começaram a prescrever este produto para obesos da época². O 2,4-DNF foi banido do mercado pelo FDA – Federal Drug Administration – em 1938 como uma droga de perda de peso porque ocorreram registros de formação de cataratas em usuárias femininas e depois que pessoas morreram ou ficaram doentes ao tomá-lo. Ressurgiu em 1980 e é utilizado em pesquisas científicas, como pesticida, no fabrico de corantes e conservantes de madeira. Mas apesar de todos os problemas ocorridos com essa substância, o 2,4-DNF pode ser ainda identificado em suplementos alimentícios comercializados na Internet³.

Figura 1- Fórmula estrutural do 2,4-dinitrofenol.



Fonte: Autor (2013).

Os fenóis são compostos que possuem ponto de ebulição mais alto do que se espera de compostos orgânicos devido à presença de ligações de hidrogênio (McMURRY, 2011). Ainda segundo McMurry (2011), o grupo hidroxila é ativador orto-para, pois tem um

¹CETESB - **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/causas_contaminantes_fenol.php> Acesso em 21/10/2013.

² SAÚDENAREDE-FÓRUM. **DNP – A Morte Amarela**. Disponível em <<http://www.saudeforum.com.br/viewtopic.php?f=1&t=24960>> Acesso em 25/10/2013.

³ CENTRODEARTIGOS.COM . **A dieta de Quatro – dinitrofenol**. Disponível em: <<http://centrodeartigos.com/emagrecimento/artigo-4602.html>> Acesso em 25/10/2013.

forte efeito de ressonância doador de elétrons, que supera o efeito indutivo retirador de elétrons mais fraco, formando intermediários de reação mais estabilizados.

Em geral, os fenóis substituídos são compostos ácidos e dependendo do grupo substituinte podem ser mais ou menos ácido que o próprio fenol. A presença do grupo nitro (-NO₂) no fenol, um substituinte retirador de elétrons, torna-o um composto aproximadamente 600 vezes mais ácido (ALLINGER *et al.*, 1978). Na Tabela 1 estão apresentadas algumas propriedades físicas do 2,4-dinitrofenol.

Tabela 1 - Propriedades físicas do 2,4-DNF.

Fórmula molecular ^(a)	C ₆ H ₄ N ₂ O ₅
Massa molecular ^(a)	184,11 g . mol ⁻¹
Pressão de vapor (25 °C) ^(a)	1,42 x 10 ⁻⁷ mm Hg
K _{ow} ^(a)	1,91
Solubilidade em água ^(b)	0,6g/100mL
Forma ^(a)	Cristais amarelados
pK _a ^(c)	4,1
Ponto de fusão. ^(b)	113°C

Fontes: ^(a) US EPA (2000), ^(b) SOLOMONS, (2009), ^(c) McMURRY, (2011).

3.2 Reatores biológicos em bateladas

Reator é qualquer espaço físico, delimitado, no qual processos físicos, químicos ou biológicos são conduzidos em condições controladas, visando atingir um propósito definido. Os reatores utilizados em escala laboratorial ou em escala industrial têm como objetivo estabelecer as bases para o seu projeto com finalidade definida⁴.

Biorreator é o centro de processos biológicos. Os sistemas biológicos envolvidos incluem enzimas, micro-organismos, células animais, células vegetais e tecidos. Para projetar um biorreator apropriado para um bioprocessamento particular, estudos intensivos sobre o sistema biológico, tais como o crescimento celular, o metabolismo, a manipulação genética e proteica ou outra expressão do produto, são necessários para entender a exigência das células em seu ambiente físico e químico. Também é necessário controlar e otimizar o ambiente do biorreator através das variáveis de operação, a fim de favorecer as funções desejadas para as células e

⁴ FERREIRA F., S. S. Reatores e Balanço de Massa. Escola Politécnica da USP - Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária. Disponível em: <http://200.144.189.97/phd/learq.aspx?id_arq=2628> acesso em: 18/11/2013.

alcançar produção em larga escala, de forma eficaz em termos de custos. Os efeitos das variáveis de processo do desempenho biológico, tais como a temperatura, o pH, a mistura e a transferência de oxigênio devem ser analisadas (ZHONG, 2011).

Os Reatores biológicos em batelada (RSB), Reatores intermitentes ou reatores sequenciais tornaram-se mais difundidos e utilizados na década de 80 devido ao tratamento de uma maior diversidade de efluentes. Este reator atualmente é usado extensivamente na produção de uma variedade de produtos farmacêuticos e biológicos, bem como no tratamento nas águas residuárias e na indústria de polimerização, e são geralmente considerados mais versáteis do que o processo contínuo equivalente (MING *et al.*, 2013).

O princípio do processo com operação em bateladas consiste na inclusão de todas as unidades de processos e operações normalmente associadas ao tratamento convencional em um único tanque, onde ocorrem todas as etapas do tratamento - como tanque de aeração e como decantador final - e a mistura completa é alcançada através da programação de ciclos em períodos definidos, com característica de fluxo intermitente. O período de cada ciclo pode ser modificado em função da vazão afluente, da necessidade do tratamento, das características do esgoto e da biomassa no sistema (von SPERLING, 1997).

A eficiência dos reatores biológicos em batelada dependerá dos fatores de grande relevância: aeração e aglomerado microbiano. A presença de um aerador garantindo o suprimento de oxigênio aos micro-organismos para sua proliferação e para, através do seu metabolismo, a biodegradação da matéria orgânica. Desta forma, faz-se necessário um sistema de aeração que possa iniciar tão logo haja o enchimento do seu volume útil (SANTOS *et al.*, 2011).

Após o tempo de aeração, inicia-se a fase do crescimento e sustentação da biomassa que se caracteriza pela formação de flocos ou filmes aderentes e superfícies sólidas (SANTOS *et al.*, 2011). No crescimento disperso a biomassa cresce de forma espalhada no meio líquido e não há estrutura de sustentação, os organismos se concentram formando flocos que apresentam estruturas heterogêneas contendo material orgânico adsorvido, material inerte das águas residuais, material microbiano, células vivas e mortas. No entanto, no crescimento em superfícies sólidas a biomassa cresce colada a um meio suporte, formando uma película chamada de biofilme. O meio suporte pode ser um material sólido natural ou artificial ou constituído pela própria biomassa aglomerada (von SPERLING, 1997).

O processo de crescimento em suporte sólido, também chamado de crescimento celular imobilizado, parece ser mais promissor do que aqueles com células livres, dispersas, uma vez que a imobilização permite a utilização de células microbianas repetidamente e de

forma contínua (COUTO, 2009). A imobilização de micro-organismos em polímeros naturais ou sintéticos, melhora a sua resistência mecânica, rigidez, tamanho e resistência às condições ambientais, sendo a seleção da matriz de imobilização crucial para a aplicação da imobilização da biomassa visto que características de porosidade dos grânulos imobilizados e a sua capacidade de adsorção são fundamentais. A retenção física ou imobilização de micro-organismos dentro de uma matriz polimérica é uma das técnicas mais amplamente utilizadas (WU e YU, 2007; FARKAS *et al.*, 2013).

Segundo El-Naas (2010), a biomassa imobilizada é uma importante técnica usualmente empregada para proteger a bactéria das altas concentrações de fenol e que permite sua reutilização. Em sua pesquisa utilizou gel de álcool polivinílico (PVA) para imobilizar as células bacterianas de *Pseudomonas putida* para biodegradação de fenol em um bioreator de leito expandido.

O fungo de podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium*, imobilizado em lascas de madeira de choupó italiano, foi utilizado para biodegradação de compostos fenólicos em águas residuárias do refino de petróleo. A taxa de remoção de compostos fenólicos por fungo imobilizado foi de 87,1% e 72,1% para biomassa dispersa, em seis dias. A alta taxa de remoção sugere a eficiência e conveniência do método imobilizado para tratamento de águas residuárias do refino petróleo (LU *et al.*, 2009).

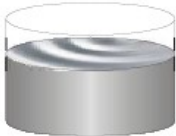
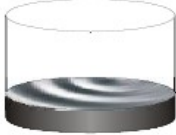
Numa pesquisa usando reator em batelada (RSB) foi utilizado lodo ativado para degradar uma mistura de fenóis monosubstituídos: *p*-nitrofenol (PNF), *o*-cresol e *o*-clorofenol. Os tempos de sedimentação foram progressivamente reduzidos para promover a granulação da biomassa. PNF foi totalmente biodegradado. A mistura de PNF e *o*-cresol também foi biodegradada embora algum acúmulo de intermediários tenha sido verificado (principalmente hidroquinona e catecol). O composto *o*-clorofenol não foi biodegradado e resultou na inibição da biodegradação do *o*-cresol e PNF, ocorrendo falha completa do RSB dentro de poucos dias. A biomassa tinha ótimas propriedades de sedimentação quando um tempo de repouso de 1 min foram aplicados (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009, FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

A modelagem e otimização de processos em batelada recebeu foco importante no mundo acadêmico durante as últimas décadas, no entanto muito dos modelos e estratégias de otimização são desenvolvidos e implementados apenas em escala laboratorial, com poucas exceções (LE LANN *et al.*, 1999; SIMON *et al.*, 2008; MING *et al.*, 2013). Segundo Hvala *et al.* (2011), reatores em batelada são os mais comumente usados em engenharia de polímeros. Zhang e Smith, (2004) estudaram uma metodologia sistemática de projeto de

reator em batelada a partir de várias perspectivas e variáveis operacionais de temperatura e de taxa de adição de alimentação.

Partindo desse princípio sobre RSB e através dos parâmetros de controle do processo, a questão operacional em reatores em batelada se reduz ao fornecimento de oxigênio, imobilização ou não da biomassa e a remoção do excesso de lodo necessário. A qualidade do tratamento é função das eficiências de aeração e do decantador final. Na Figura 2 está apresentada a sequência operacional de um reator em batelada sob aeração.

Figura 2 - Sequência operacional de um reator em batelada.

Representação gráfica	Fase do ciclo	Objetivo da fase	Estado de aeração
	Enchimento	Introdução do substrato no sistema de tratamento	Ligada ou desligada
	Aeração	Biodegradação do substrato	Ligada
	Sedimentação	Clarificação do efluente tratado	Desligada
	Descarga	Descarte do efluente tratado	Desligada
	Repouso	Reserva de tempo a ser transferida a outra fase caso seja necessário ajuste operacional	Ligada ou desligada

Fonte: Adaptado de SANTOS (2011).

Alguns estudos foram realizados utilizando este processo com destaque para: Influência do 2,4-dinitrofenol sobre as características de lodo ativado em reatores em batelada foi avaliada por CHEN *et al.* (2006). A biodegradação simultânea de nitrogênio contido em compostos aromáticos em uma sequência de reatores em batelada (LIU *et al.*, 2007); Remoção do nitrofenol por simultânea nitrificação e desnitrificação usando *T. Pantotropha* em reatores em batelada sequencial (KULKARNI, 2013); Protozoários como indicadores de processos em batelada sequencial para o tratamento de fenol (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2013).

Os reatores em bateladas sequenciais utilizados para o tratamento de águas residuais provaram ser eficiente processo gerando, grande atenção devido ao seu melhor desempenho de tratamento e os seus requisitos de espaços minimizados (LIU *et al.*, 2007; KULKARNI, 2013).

Esawy *et al.* (2013) estudando a eficiência do *Aspergillus niger* NRC1ami pectinase em hidrolisar cascas secas de laranja não tratadas, cascas secas de laranja tratadas com HCl e cascas secas de laranja tratadas com NaOH pela enzima pectinase livre e aprisionada em esponjas de álcool polivinílico (PVA) obtiveram resultados expressivos quando comparados. O estudo da estabilidade do pH de pectinase livre e imobilizada mostrou que o processo de imobilização da enzima protege fortemente do pH fortemente alcalino. O processo de imobilização melhorou a estabilidade térmica da enzima. A enzima imobilizada foi reutilizada 12 vezes em clarificação do suco de laranja com 9% de perda de atividade original. A taxa máxima de reação e a constante de Michaelis-Menten de forma parcialmente purificada foram significativamente alteradas após imobilização.

Os estudos de Liu *et al.* (2006) demonstraram que as águas residuais industriais que contém quatro grandes compostos aromáticos nitrogenados (CANs), nitrobenzeno, 4-nitrofenol, anilina e 2,4-dinitrofenol, foram remediados por RSB. A capacidade de remover simultaneamente vários CANs podem ser devido aos ciclos óxido/anóxico do reator RBS que renderam oxigênio dissolvido relativamente baixo que pode proporcionar condições mais adequadas para a degradação microbiana de CANs.

Por ser bastante versátil devido a sua capacidade de promover a remoção da matéria orgânica, a remoção dos nutrientes e a separação da fase sólida da líquida em uma unidade e a crescente necessidade de redução nas dimensões de estações de tratamento de efluentes, a utilização de reatores sequenciais em bateladas vem se tornando bastante difundida, no qual a eficiência no tratamento de compostos xenobióticos e recalcitrantes também são comprovadas.

3.3 Importância do cossustrato ou produtos primários nos processos de degradação de poluentes tóxicos.

Os fungos adaptam seu metabolismo de forma rápida a diferentes fontes de carbono e energia, que são fatores essenciais para sua sobrevivência, apresentando-se como agentes eficientes na biorremediação. Isso se deve à produção de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares capazes de degradar vários compostos, entre eles os mais

complexos como os polímeros. Muitas transformações operacionadas pelos fungos são realizadas pelo sistema enzimático intracelular citocromo P-450 monoxigenase, resultando em produtos solúveis em água e menos tóxicos, ou seja, compondo produtos metabolizados, um derivado orgânico do poluente original. O processo descrito chama-se cometabolização, no qual o fungo necessita de outro substrato como fonte de carbono e energia (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

Conforme relatou Griffin (1994), alguns fungos utilizam amplamente a glicose como fonte de carbono e energia porque promove um rápido crescimento. Este crescimento depende da natureza do inóculo e do tipo de nutrientes do meio. A presença de baixas concentrações de glicose no meio permite a iniciação do crescimento da cultura na fase lag e fornece material de energia suficiente para a indução de enzimas comparada à adição de frutose e manose. Por outro lado, a glicose em concentrações elevadas, provavelmente reprime a formação de transporte de enzimas necessárias para a utilização da fosforilação de manose.

Sampaio (2005) trabalhando com micélio de *Aspergillus niger* para remoção de metil paration e atrazina em meio sintético, realizou um experimento em batelada para conferir a influência do uso do cossubstrato e verificou, após 32 dias, que o fungo apresentou remoção de metil paration de 97% e constante cinética de $0,063 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ nos reatores sem glicose e 94% e constante cinética de $0,162 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$ nos reatores com glicose. Segundo a autora, a adição de glicose resultou em um aumento na velocidade de conversão do inseticida, todavia não teve influência sobre a remoção dos pesticidas.

She *et al.* (2012) utilizaram lodo ativado para a degradação aeróbia do 3-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol e 2,6-dinitrofenol em reatores em batelada sequencial na presença e ausência de glicose. Estes autores afirmaram que houve aumento da degradação dos nitrofenóis na presença de baixas concentrações de glicose e que em altas concentrações inibiam o processo.

Andrade (2013) trabalhou com o fungo *Phanerochaete chrysosporium* verificando a viabilidade de aplicação destes fungos na remoção de corante azo vermelho de congo em reator biológico operado em regime de bateladas sequenciais na presença de diferentes concentrações de glicose ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) como cossubstrato e em ciclos de 48 horas. De acordo com os resultados dos experimentos, o autor percebeu que o uso do cossubstrato na concentração de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ favoreceu a remoção média do corante, que foi de 97%, enquanto que a remoção média do corante na concentração de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ foi de 86%. A análise

enzimática realizada nesta pesquisa mostrou que o comportamento e liberação de enzimas para o meio extracelular dependem de vários fatores, incluindo a quantidade de carbono.

Os resultados da degradação do trinitrotolueno (TNT), sob condições aeróbias e anaeróbias foram analisados por Lin *et al.* (2013), indicando que a eficiência máxima de degradação do composto, em condições aeróbias, foi de 82% quando a concentração de glicose foi de 1 g.L⁻¹. No entanto, para concentração de glicose de 0,5 g.L⁻¹, foi observado um declínio na degradação do TNT. Sob condições anaeróbias, a melhor degradação foi de 77% quando a concentração de glicose foi de 1,5 g.L⁻¹. Conforme exposto, nas condições aeróbias, a maior concentração de glicose aumentou a eficiência da degradação do TNT porque a glicose foi uma fonte fácil de carbono disponível para a bactéria *Bacillus mycoides*.

A escolha do substrato como fonte fácil de carbono e energia deve ser feita de tal forma que o substrato escolhido não torne os custos elevados, dessa forma os rejeitos agrícolas e industriais utilizados como substratos são capazes de fornecer condições ótimas de produção das enzimas hidrolíticas, não somente por propiciar material de baixo custo como também pela reciclagem de biomassa e até mesmo de efluentes. Estes substratos são palha-de-trigo, palha-de-aveia, bagaço de cana, casca de arroz, serragem, rejeitos de processamento de café, rejeitos de colheitas de chá de uva, polpa de beterraba como fontes primárias de carbono (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

Tendo em vista os diversos trabalhos citados para tratamento de efluentes com o objetivo de degradar, remover ou metabolizar poluentes, são importantes pesquisas neste campo para a obtenção de condições ótimas e neste contexto o estudo de uso de cossustratos em concentrações diferentes se faz necessário.

3.4 Fungos

Os fungos são um grupo diversificado de organismos que apresentam a seguinte divisão: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota, Deuteromycota. As espécies variam de organismos simples a organismos muito complexos, chamadas respectivamente, de unicelulares e pluricelulares. São eucariontes, tendo consideravelmente mais genes do que as bactérias, que ainda tornam mais versátil em tolerar compostos inibitórios ((HANS) van LEEUWEN *et al.*, 2012). Heterotróficos, dependem da disponibilidade de nutrientes ricos em matéria orgânica e energia. São organismos saprófitas e obtêm o seu alimento a partir da degradação de matéria orgânica morta. A maioria é de vida livre e podem ser classificados em grupos, tais como fungos filamentosos (também chamados

de bolores ou micélio) e leveduras (MORE *et al.*, 2010). São de suma importância como agentes primários da degradação do ciclo do carbono, nitrogênio e outros nutrientes na biosfera e na deterioração dos materiais e produtos úteis. Possuem habilidades para sintetizar muitos compostos estranhos para nós e não se limitam a atividades prejudiciais, mas incluem a produção de muitos materiais importantes para a comida, drogas, e indústrias químicas (GRIFFIN, 1994).

Estes organismos são muito eficazes, uma vez que são resistentes e podem tolerar concentrações elevadas de poluentes mais do que as bactérias, pois possuem o maior número de genes oferecendo maior seletividade reprodutiva, o que pode resultar em melhores adaptações ambientais ((HANS) van LEEUWEN *et al.*, 2012). Produzem uma larga variedade de proteínas extracelular, ácidos orgânicos e outros metabólitos de suma importância, e possuem capacidade de adaptar-se a severas condições ambientais (COULIBALY *et al.*, 2003; MORE *et al.*, 2010).

Estudos sobre a diversidade de fungos têm diferentes estimativas, os números diferem muito entre os 1,5 milhão de espécies, 3,5-5,1 milhões de espécies ou 712 mil espécies em todo o mundo. Os fungos filamentosos têm sido tradicionalmente usados para produzir várias substâncias com relevância para as indústrias farmacêutica, de alimentos e de biotecnologia (VALENCIA e CHAMBERGO, 2013).

Qualquer que seja seu modo de nutrição, os fungos devem absorver os nutrientes necessários para seu crescimento em um substrato disponível, os nutrientes devem possuir um tamanho adequado para que possam atravessar as camadas celulares até alcançar o citoplasma onde serão metabolizados (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010). As hifas fúngicas têm pequenos volumes, mas grandes áreas de superfície, as quais aumentam a capacidade de absorção dos fungos ((HANS) VAN LEEUWEN *et al.*, 2012).

Na Tabela 2 são apresentados os principais componentes requeridos pelos fungos para o desempenho das atividades metabólicas.

Tabela 2 – Elementos químicos requeridos para a célula fúngica.

Elemento Químico	Fontes	Funções celulares
Carbono	Açúcares	• Elemento estrutural de célula fúngica em combinação com o hidrogênio e fonte de energia.
Hidrogênio	Prótons	• Próton transmembranar vital para o transporte de nutrientes na célula.
Oxigênio	Ar, O ₂	• Substrato para a respiração e outras enzimas oxidativas.
Nitrogênio	Sais de amônia, uréia, aminoácidos	• Participação na estrutura e formação de proteínas, aminoácidos e enzimas.
Fósforo	Fosfatos	• Formação de ácidos nucleicos e membranas celulares.
Enxofre	Sulfatos e metionina	• Formação de aminoácidos e vitaminas.
Potássio	Sais de K ⁺	• Atividade enzimática e balanço iônico.
Magnésio	Sais de Mg ²⁺	• Atividade enzimática e estrutura celular.
Cálcio	Sais de Ca ²⁺	• Processo de transdução.
Cobre	Sais cúpricos	• Pigmento redox.
Ferro	Sais férricos	• Hemoproteínas e citocromos.
Manganês	Sais de Mn ²⁺	• Atividade enzimática.
Molibdênio	Na ₂ MoO ₄	• Metabolismo do nitrato e vitamina B12.
Zinco	Sais de Zn ²⁺	• Atividade enzimática.

Fonte: Adaptado de Kavanagh (2005).

Os fungos obtêm sua energia a partir da quebra de compostos orgânicos. De um modo geral, os responsáveis pela quebra dos compostos orgânicos poliméricos para obtenção de fontes de carbono e de energia são as enzimas secretadas por esses micro-organismos. A capacidade enzimática é uma característica intrínseca de cada espécie e a ausência de enzimas específicas em um processo pode fracassar o crescimento do fungo em um substrato talvez pela sua incapacidade de digerir-lo (ANDRADE, 2013).

Segundo Lu (2012), a biorremediação por enzimas é atualmente um novo método atrativo para remoção de poluentes tendo foco no aumento no número de pesquisas para o efeito do íon comum na atividade enzimática.

Para a degradação de moléculas de baixo peso molecular, as lacases são enzimas fúngicas, uma vez que eles tenham sido isolados a partir de plantas e fungos (Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos), RIVERA-HOYOS *et al.* (2013), que possuem capacidade para catalizar a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos aromáticos, principalmente os compostos fenólicos (POMPEU, 2010), concomitantemente com a redução do oxigênio molecular para formar água (LU *et al.*, 2012; RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013). Uma característica fundamental destas enzimas é a relação direta do seu potencial redox (E°) com a energia necessária para remover o elétron do substrato redutor (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013).

Além disso, uma grande quantidade de compostos fenólicos são reconhecidos como desreguladores endócrinos de modo que interferem no sistema endócrino. Geralmente, estes compostos recalcitrantes produzidos em diversos tipos de indústrias, inclusive as de tintas, não podem ser degradados por estações de tratamento convencional. Então, o tratamento destes compostos com diferentes enzimas de modo a transformá-los em compostos degradáveis ou outros não tóxicos é a tendência. O uso de enzimas nestes processos têm uma série de vantagens devido à sua elevada atividade em condições ambientais, tais como a temperatura ambiente, o pH neutro ou a pressão atmosférica, sua elevada seletividade e especificidade (ADDORISIO *et al.*, 2013).

Outra enzima utilizada para degradação de compostos de difícil degradação é a citocromo P450 monoxigenase. Segundo SCHARF *et al.* 2000 *apud* Sampaio (2005), a enzima citocromo P450 monoxigenase acontece em todos os organismos celulares, e participa do metabolismo de xenobióticos. São hemoproteínas, induzidas por numerosas substâncias apolares e requerem NADPH como cofator para atividade catalítica. Reações importantes são conduzidas por este sistema enzimático: redução de grupos nitro, azo, N-óxido, peróxido e epóxido; clivagem de ligações C-C. Os substratos para este sistema enzimático incluem: esteróides, xenobióticos, hidrocarbonetos poliaromáticos, nitrosaminas, ácidos graxos, cetonas, entre outros (GRIFFIN, 1994).

O tratamento de corantes recalcitrantes e tóxicos com tecnologias tradicionais não é sempre efetivo ou pode ser desfavorável ao ambiente. Isto tem impulsionado a busca por tecnologias alternativas tais como a biodegradação por fungos. Em particular fungos

lignolíticos e suas enzimas oxidativas não específicas têm sido relatados como responsáveis pela descoloração de corantes sintéticos diferentes (COUTO, 2009).

Desta forma, por possuírem a capacidade de degradar diferentes e complexas moléculas na natureza, os fungos têm sido estudados em processos de biorremediação, conforme apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Alguns estudos utilizando fungos na degradação de compostos poluentes.

Fonte	Espécies Fúngicas	Poluente
Pinto <i>et al.</i> (2012)	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> e <i>Lecanicillium saksenae</i>	- Pesticidas terbutilazina, difenoconazol e pendimetalin.
Máximo <i>et al.</i> (2012)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	- Efluentes têxteis.
Xiao <i>et al.</i> (2011)	<i>Phlebia lindtneri</i> , <i>Phlebia brevispora</i> and <i>Phlebia</i>	- Pesticida organoclorado clordano.
Silva <i>et al.</i> (2012)	<i>Aspergillus niger</i>	- Efluente sintético de laticínio.
Lopes <i>et al.</i> (2011)	<i>Aspergillus niger</i>	- Efluente de indústria de castanha de caju.
Silva (2012)	<i>Aspergillus niger</i>	- Corante índigo carmin.
Andrade <i>et al.</i> (2013)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	- Corante vermelho de congo

Fonte: Autor (2014).

Pinto *et al.* (2012) avaliaram a degradação dos pesticidas terbutilazina, difenoconazol e pendimetalin por cultura de fungos. Os fungos *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus oryzae*, *Lentinula edodes*, *Penicillium brevicompactum* e *Lecanicillium saksenae* cresceram em um meio contendo solução de Vishiniac, nutrientes, glicose e extrato de levedura e a remoção dos pesticidas ocorreu nas primeiras horas de exposição. Os produtos foram removidos, na seguinte ordem de eficiência, por todos os fungos estudados pendimetalin > difenoconazol > terbutilazina.

Entretanto, o fungo lignolítico *Phanerochaete chrysosporium*, do filo basidiomicota, tem sido amplamente estudado pela capacidade de biodegradação e descoloração de efluentes têxteis, por apresentar disposição em degradar lignina em altas taxas, através de mineralização ou deslignificação seletiva ou não seletiva, produzindo dióxido de carbono (CO₂), água (H₂O) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (MÁXIMO *et al.* 2012).

Nos estudos de Xiao *et al.* (2011) a biodegradação do pesticida organoclorado clordano por fungos da podridão branca das espécies *Phlebia lindtneri*, *Phlebia brevispora* and *Phlebia aurea*, os autores declararam ser este o primeiro relato de transformação oxiclordano por micro-organismos e que as espécies *Phlebia* têm atividade específica para a biotransformação de compostos organoclorados, pois estas espécies utilizaram inibidores do citocromo P450 no estudo sendo os resultados dos experimentos consistentes referindo-se ao envolvimento de citocromo P450 mono-oxigenase em alguns passos do metabolismo clordano, especialmente nas epoxidação e processo de hidroxilação. Em outro estudo, Xiao *et al.* (2011), investigaram novos caminhos metabólicos por 20 fungos de podridão branca, pertencentes ao gênero *Phlebia*, capazes de degradar dieldrin e aldrin.

Andrade *et al.* (2013), estudando a habilidade do fungo da podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium*, em degradar o corante vermelho de congo em um meio enriquecido com glicose ou farelo de trigo como cossubstratos, verificou que a glicose foi mais eficiente na degradação do corante, chegando a um percentual de remoção de 97%, enquanto que o farelo de trigo não obteve remoção satisfatoriamente efetiva.

A espécie estudada nesta pesquisa foi *Aspergillus niger*, por possuir eficiência comprovada para degradação de compostos recalcitrantes (SAMPAIO, 2005).

O *Aspergillus* foi catalogado em 1729, pelo padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli, o qual observando o fungo ao microscópio verificou que sua forma lembrava um borrifador de água benta, chamada de *aspergillum*, nomeando a espécie de acordo com o objeto ⁵.

O fungo filamentosos *Aspergillus niger* é uma das espécies fúngicas mais comuns do gênero *Aspergillus*, causa doença denominada mofo preto em algumas frutas e vegetais, sendo um contaminante comum de alimentos (MILLER, 2001 *apud* SOUZA NETO, 2012). Tem a seguinte classificação: Divisão – Eumycota; Classe – Ascomycetos, é classificado como fungo de decomposição branda ou mole, pode degradar a lignina e polissacarídeos,

⁵ Disponível em: <<http://artigos.tol.pro.br/portal/linguagem-pt/Aspergillus>> Acesso em: 13/11/2013.

porém com velocidades muito baixas, está entre os microrganismos mais importantes na indústria de biotecnologia, e apresenta uma longa história de uso em aplicações agro-alimentares. Além de ser um hospedeiro para a produção industrial de ácidos orgânicos, *Aspergillus niger* é conhecido por secretar uma variedade de enzimas hidrolíticas capazes de degradar açúcares. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato da fermentação. Algumas destas enzimas secretadas foram recrutadas para aplicações industriais (TSANG *et al.*, 2009), principalmente envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários complexos, na degradação de compostos aromáticos, no desenvolvimento como produtor de proteínas heterólogas, como biofármacos, na maioria das vezes com sucesso limitado (SUN *et al.*, 2007).

A eficiência na biodegradação de poluentes recalcitrantes por *Aspergillus niger* tem sido demonstrada, como no tratamento de efluente sintético de laticínio disposto em reatores em bateladas sequenciais inoculados com *Aspergillus niger* AN 400, o qual foi estudado por Silva *et al.* (2012). Os autores estudaram a remoção de matéria orgânica e de nutrientes do efluente e observaram que os micro-organismos iniciaram a degradação do meio pela remoção de amônia à nitrato indicando que os fungos possuem a capacidade de consumir o nitrogênio amoniacal com maior velocidade do que o nitrato. Com relação à DQO, o fungo *Aspergillus niger* AN 400 foi eficiente na remoção de matéria orgânica, independente da presença ou não de sacarose alcançando um percentual de remoção máximo de 71,7% para DQO.

Lopes *et al.* (2011) estudaram a eficiência da remoção de nitrogênio e fósforo do efluente de indústria de castanha de caju, por uso de reator aeróbio em batelada com inóculo de *Aspergillus niger* AN 400. O acréscimo de glicose à água residuária, foi realizada em etapas distintas, na concentração de 1 g.L⁻¹ (Etapa I) e de 5 g.L⁻¹ (Etapa II). Durante a Etapa II, o reator alcançou bons resultados para remoção de nutrientes sem acúmulo de sua concentração no meio: 49% de fósforo total, 60% de ortofosfato, 79% de amônia, 78% de nitrato e 90% de nitrito, indicando que a menor liberação de nutrientes pelos micro-organismos ocorreu na presença de concentração elevada de glicose.

Em estudos de Silva (2012) o tratamento biológico com *Aspergillus niger* AN 400 inoculados em reator em bateladas sequenciais para degradação do corante Índigo Carmim contido em efluente têxtil industrial *in natura* à 10% foi investigado, mostrando que na etapa I do processo (ciclos 1º ao 24º), a qual contou com adição de compostos nitrogenados, a média de degradação do corante foi de 55% contra eficiência média de 83% na etapa II (ciclo 25º ao 43º) quando houve suspensão da adição dos compostos de nitrogênio. Neste caso,

possivelmente a presença de nitrogênio no meio afetou o metabolismo secundário do *Aspergillus*, inibindo a degradação do corante índigo carmim.

Em se tratando de remoção de 2,4-DNF por *Aspergillus niger*, não foram encontrados estudos que fossem relatados a remoção desse composto contaminante de solos e águas, tornando-se necessário o desenvolvimento de pesquisas utilizando-se o *Aspergillus niger* como agente degradante do 2,4-dinitrofenol, compostos de alta toxicidade ao meio ambiente.

3.5 Biorremediação dos nitrofenóis

Dentre as tecnologias para remoção dos compostos aromáticos, destacam-se biorremediação, técnicas físicas e químicas, bem como o processo combinado entre as tecnologias de biorremediação e química como opções para a degradação de elementos contaminantes do solo e água. Entre as tecnologias aplicadas para remoção de nitrofenóis, a biorremediação começa a ocupar um lugar em destaque, visto que pode constituir uma alternativa mais segura do ponto de vista ambiental em relação aos processos físicos e químicos utilizados para eliminar compostos nitrofenólicos.

Biorremediação consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos (micro-organismos e plantas), que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando, assim, contaminantes em substâncias inertes (SOARES *et al.* 2011).

Conforme Soares *et al.* (2011), esta biotecnologia vem sendo empregada em alguns países e, em certos casos, além de apresentar menor custo é mais eficiente na remoção dos poluentes do que as técnicas físicas e químicas.

A biodegradação é usada para descrever a completa mineralização do composto de partida para os compostos inorgânicos simples como CO₂, H₂O, NO₃⁻ e outros, constituindo a forma de biodegradação ideal para biorremediação de áreas contaminadas (SHARMA e GUPTA, 2012), mas nem sempre a mineralização é completa, podendo até haver formação de intermediários indesejáveis, formando substratos mais poluentes que os compostos a serem degradados.

Os micro-organismos por apresentarem diversos caminhos catabólicos na quebra dos muitos tipos de poluentes recalcitrantes e xenobióticos, sob condições variadas, são bastante investigados no tratamento de efluentes industriais e na remoção de compostos nitrofenólicos (ARORA *et al.*, 2014).

Dentre os processos biológicos, os de lodos ativados têm sido empregados com frequência para utilizar fenóis e seus derivados (*p*-nitrofenol e *o*-cresol) como fonte de carbono e energia, apresentando alta eficiência de remoção, embora haja acúmulo de alguns intermediários, principalmente hidroquinona e catecol (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Kulkarni e Chaudhari (2006) estudaram a capacidade da espécie de *Pseudomonas putida* em metabolizar *p*-nitrofenol (PNF), nas concentrações de 20 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 300 mg.L⁻¹, como única fonte de carbono, nitrogênio e energia. A degradação foi acompanhada por liberação de uma quantidade estequiométrica de nitrito. Neste trabalho, o efeito da adição de glicose sobre a degradação de PNF em condições semelhantes também foi avaliado. A glicose (0,4 g.L⁻¹) em 20 e 50 mg.L⁻¹ de PNF não acelerou a taxa de degradação, ao passo que em 300 ppm de PNF houve inibição. O estudo observou que a pH ácido (4,0 - 6,5) PNF não foi degradado, enquanto que o pH alcalino (7,5 - 9,5) aumentou significativamente a taxa de degradação de PNF. A degradação completa da PNF em concentração elevada (300 ppm) foi confirmada por análise de HPTLC.

Chen *et al.* (2006) investigaram a resposta das características de lodos ativados na presença de 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF), em culturas em batelada. A produção de lodos diminuiu ligeiramente com o aumento da concentração de 2,4-DNF. A 10 mg.L⁻¹, ou concentração inferior a esse valor, o 2,4-DNF reduziu significativamente o rendimento de lodos e na presença de 2,4-DNF entre as concentrações de 1 a 20 mg.L⁻¹ aumentou a taxa de consumo do oxigênio do lodo ativado e ligeiramente alterou sua hidrofobicidade. Uma análise indicou que a redução da produção de lodos foi atribuída, principalmente, pela presença de 2,4-DNF, que inibia de forma significativa o crescimento, em vez de reduzir a degradação do substrato.

She *et al.* (2012) determinaram a biodegradabilidade aeróbia de 3-nitrofenol (3-NP), 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF) e 2,6-dinitrofenol (2,6-DNF) através dos parâmetros de: razão DBO/DQO, produção de dióxido de carbono, taxa de consumo de oxigênio em relação e atividade enzimática relativa. Além disso, a cinética de biodegradação dos compostos foi investigada em reatores em batelada sequenciais, tanto na presença de glicose (como cossubstrato) e com nitrofenol como a única fonte de carbono. Entre os três compostos testados, o 3-NP mostrou a melhor biodegradabilidade, enquanto 2,6-DNF foi o mais difícil de ser biodegradado. A presença de glicose entre 0 a 660 mg.L⁻¹, acelerou o aumento da degradação dos nitrofenóis. Por outro lado, em elevadas concentrações de glicose, 1320 a 2000 mg.L⁻¹, foi menor do que o valor obtido na ausência de glicose, sugerindo que altas concentrações de cossubstrato poderia inibir a biodegradação de nitrofenóis.

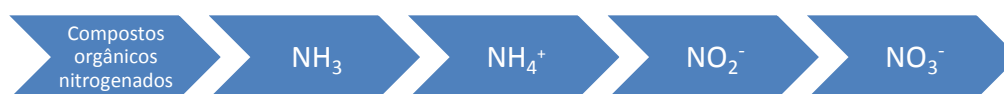
Em estudos de Kristanti *et al.* (2012) foi investigado a biodegradação dos nitrofenóis 2-NF, 4-NF e 2,4-DNF, em amostras de água de três rios, pela planta *Spirodela polyrhiza* na rizosfera, local onde as bactérias são micro-organismos predominantes. O experimento realizado mostrou que a remoção dos três nitrofenóis foi acelerada na presença da planta *S. polyrhiza* e que, de suas raízes, foram isolados várias bactérias degradantes de NF que contribuíram para a biodegradação acelerada dos NFS.

Kulkarni (2013) examinou a remoção de nitrofenóis por meio de quatro reatores em bateladas idênticas R (controle), R1 (4-NF), R2 (2,4-DNF) e R3 (2,4,6 -TNF). No referente estudo, foi adicionado, ao meio, extrato de levedura e peptona com intuito de melhorar o crescimento da biomassa sendo esta produzida especificamente pela *Thiosphaera pantotropha*. A concentração de cada um dos nitrofenóis foi gradualmente aumentada de 2,5 a 200 mg.L⁻¹, durante a adaptação. Os nitrofenóis foram utilizados como a única fonte de nitrogênio, durante o estudo. Observou-se que a remoção total de 4-NP, foi de 98%, as remoções de 2,4-DNP e 2,4,6-TNP variaram entre 83% e 84%, nesta ordem. A remoção de DQO para 4-NP foi de 99%, para 2,4-DNP e 2,4,6-TNP foi de 97 - 98% respectivamente durante a adaptação.

Compostos nitrogenados são utilizáveis como fonte de nitrogênio por vários fungos. Uma completa discussão sobre esse caminho não é fácil. Um princípio importante para todos estes compostos é que a via catabólica é, em geral, completamente diferente da via biossintética do mesmo composto (GRIFFIN, 1994).

Os fungos são capazes de utilizar o nitrogênio – N a partir de uma vasta gama de compostos orgânicos e minerais, por reações catabólicas, para fornecer energia para as reações anabólicas, sendo o amônio (NH₄⁺) considerado a fonte de nitrogênio preferida dos fungos e bactérias (GRIFFIN, 1994; GEISSELER *et al.*, 2010). Na Figura 3 estão representadas as transformações do nitrogênio resultantes do metabolismo microbiano a partir da decomposição orgânica.

Figura 3 - Representação das etapas de oxidação do nitrogênio.



Fonte: Autor (2014).

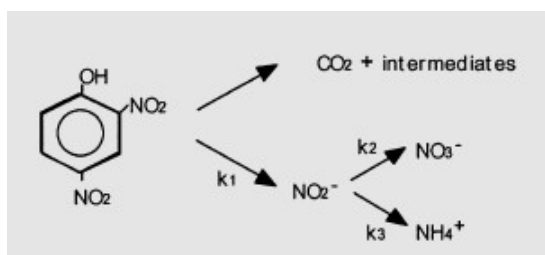
A amônia (NH_3) tende a ser convertida a amônio (NH_4^+) e este por sua vez é convertido a nitrito (NO_2^-) e depois à nitrato (NO_3^-) por processos microbianos utilizando o oxigênio como aceptor de elétrons, processo esse chamado de nitrificação (GABIATTI, 2010).

Das diversas naturezas de nitrogênio presentes, a amônia e em especial o nitrato, são aquelas que irão causar mais efetivamente a perda de qualidade da água dos mananciais próximos (GABIATTI, 2010). Os processos bioquímicos de oxidação do amônio a nitrito e deste para nitrato implicam em consumo de oxigênio dissolvido do meio, o que pode afetar a vida aquática quando a oxigenação do ambiente é menor que o consumo por esses processos, levando à mortandade da fauna (von SPERLING, 1996).

Um fator relevante a ser considerado na biodegradação do 2,4-dinitrofenol em uma parte da pista pesquisa, é a quantidade de nitrogênio liberada, nas formas de nitrato (NO_3^-) e amônia (NH_3), provenientes da degradação do composto 2,4-DNF e que não estão dentro dos padrões de lançamentos de efluentes em águas.

Nakano *et al.* (2004) investigaram, pelo tratamento fotocatalítico, a degradação do 2,4-DNF contido em efluente de uma cidade sob material poroso $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$. O caminho de reação descrito pelos autores para degradação fotocatalítica do 2,4-DNF mostrou que primeiro NO_2^- (íon nitrito) foi formado a partir de 2,4-DNF, em seguida, NO_3^- (íon nitrato) e NH_4^+ (íon amônio) foram formados consecutivamente. A partir deste, a oxidação ocorreu paralelamente, convertendo 2,4-DNF em dióxido de carbono e outros intermediários, ao mesmo tempo. O caminho da reação está descrito na Figura 4.

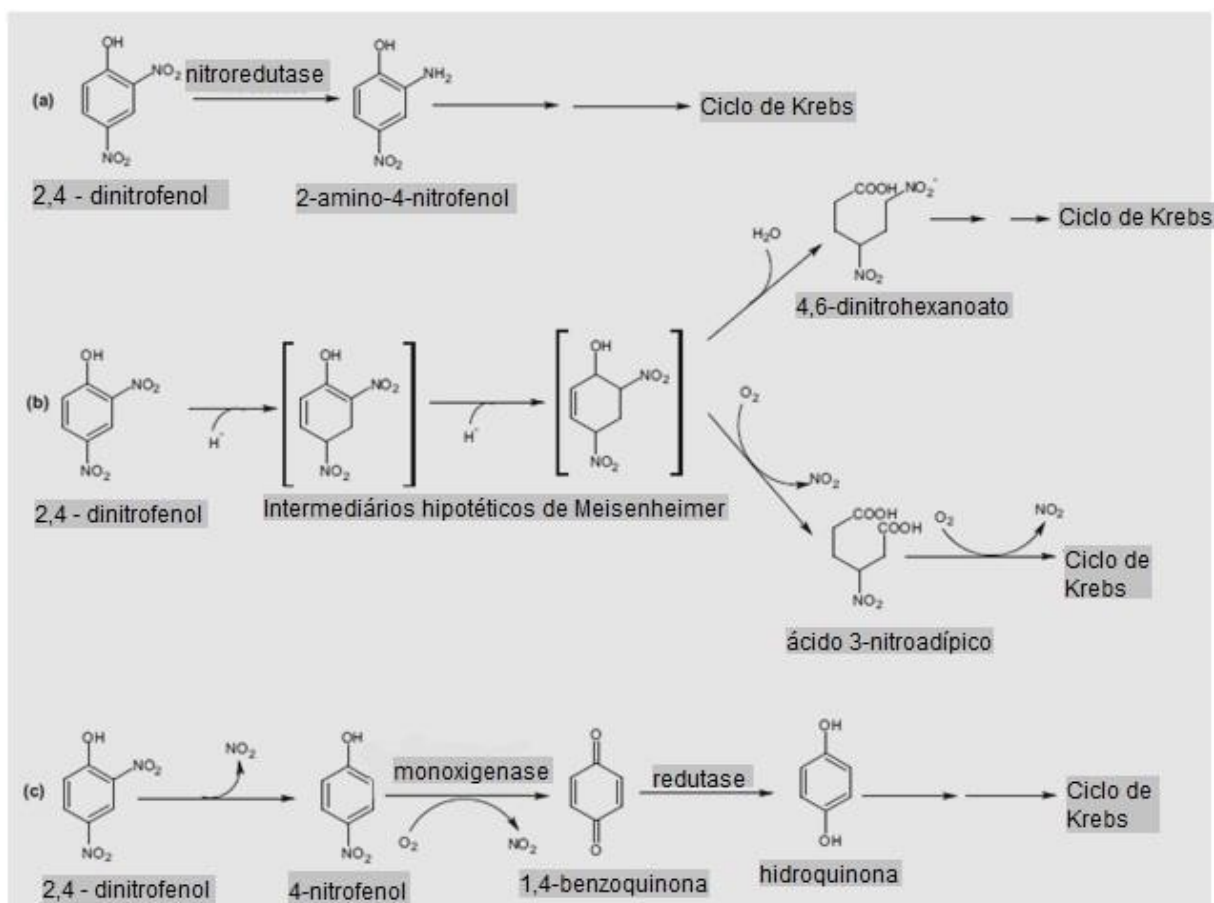
Figura 4 - Caminhos de reação para degradação fotocatalítica do 2,4-DNF.



Fonte: Nakano *et al.*, (2004).

Arora *et al.* (2014), em seu artigo de revisão sobre biodegradação de nitrofenóis e seus derivados, apresentaram caminhos de reação e demonstraram os produtos da degradação do 2,4-DNF por bactérias de acordo com as propostas (a), (b) e (c), conforme a Figura 5.

Figura 5 - Caminhos de degradação do 2,4-DNF formando (a) 2-amino-4-nitrofenol, (b) 4,6-dinitrohexanoato ou ácido 3-nitroadípico e (c) hidroquinona.



Fonte: Adaptado de Arora *et al.* (2014).

A proposta (a) apresenta a formação do 2-amino-4-nitrofenol. Hirooka *et al.* 2006 *apud* Arora *et al.* (2014) relataram a degradação de 2,4-DNF por uma cultura mista de cianobactérias *Anabaena variabilis* e *A. cylindrica*. A cianobactéria *A. variabilis* reduzindo o 2,4-DNP a 2-amino-4-nitrofenol pela enzima nitroredutase. Na proposta (b), via complexo de Meisenheimer, foi demonstrado a formação do 4,6-dinitrohexanoato (DNH) de acordo com a explicação de Lenke *et al.* (1992) ou a formação ácido 3-nitroadípico de acordo com Blasco *et al.* (1999). Lenke *et al.* (1992) *apud* Arora *et al.* (2014), isolaram duas linhagens de *R. erythropolis* HL 24-1 e HL 24-2 provenientes do solo e água do rio, que utilizaram 2,4-DNF como única fonte de carbono, nitrogênio e energia havendo liberação de íons nitrito, o DNH foi identificado como produto final minoritário. Já Blasco *et al.* (1999) *apud* Arora *et al.* (2014), relataram a mineralização do 2,4-DNF por *Rhodococcus* sp. B1, que degradou o 2,4-DNF com liberação de um grupo nitro na posição orto e formação do ácido 3-nitroadípico, que foi degradado, com a remoção de segundo grupo nitro. Para a proposta (c), a formação da hidroquinona foi justificado por Iwaki *et al.* (2007). Iwaki *et al.* (2007) *apud* Arora *et al.*

(2014), isolaram uma bactéria mineralizante do 2,4-DNF, *Burkholderia* sp. estirpe KU-46, que utilizou 2,4-DNF como única fonte de carbono e nitrogênio. A formação de 4-nitrofenol foi pela liberação de um grupo nitro ($-NO_2$) e logo após reduzindo o 4-nitrofenol a 1,4-benzoquinona pela enzima monoxigenase que foi ainda reduzida a hidroquinona pela enzima redutase.

3.6 Levantamento sobre Legislação Brasileira referente aos parâmetros pH, DQO, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal e fenóis.

A Portaria do Ministério da Saúde (MS) no. 2914 do ano de 2011 instituiu parâmetros de qualidade de água para consumo humano. Os nitrofenóis, de um modo geral, não foram mencionados como parâmetro, mas há padrões de qualidade de água para consumo humano referente às frações nitrogenadas, como nitrito, nitrato e amônia, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde.

Parâmetro	Valor Máximo Permitido
Nitrato (como N)	10 mg.L ⁻¹
Nitrito (como N)	1 mg.L ⁻¹
Amônia (como NH ₃)	1,5 mg.L ⁻¹

Fonte: Ministério da Saúde (2011).

A Resolução CONAMA nº 357 de 2005 estabeleceu padrões de lançamento de efluentes em águas. O artigo 3º da Resolução nº 430/2011 que complementa e altera a Resolução nº 357/2005 do CONAMA, não apresenta especificamente o parâmetro para 2,4-DNF, podendo este ser enquadrado em fenóis. Na Tabela 5, são apresentadas as concentrações máximas permitidas para lançamento de efluentes em corpos hídricos dos parâmetros fenol e nitrogênio, no qual o parâmetro referente a nitrogênio estabelecido trata-se de amônia total e não há padrões referentes à outras frações nitrogenadas, como nitrito e nitrato de fundamental importância para esta pesquisa.

Tabela 5 - Valor máximo permitido para lançamento de efluentes em corpos hídricos.

Parâmetro	Valor Máximo Permitido
pH	5 a 9
fenóis totais (substâncias que reagem com 4-aminoantipirina)	0,5 mg.L ⁻¹ C ₆ H ₅ OH
Nitrogênio amoniacal total	20 mg.L ⁻¹ N

Fonte: CONAMA (2011).

De acordo com a Portaria SEMACE no. 154 do ano de 2002, a qual dispõe sobre padrões e condições para lançamento de efluentes líquidos gerados por indústrias ou qualquer fonte poluidora no estado do Ceará, estabeleceu valores máximos permitidos de substâncias constantes em efluentes de fontes poluidoras localizadas em áreas que não são atendidas por rede pública de tratamento de esgoto e que deverão possuir estação de tratamento, de maneira a atender aos padrões de qualidade dos cursos de água. Na Tabela 6, são apresentados os valores correspondentes aos parâmetros descritos nessa portaria e que são apresentados nesta pesquisa.

Tabela 6 – Valores máximos permitidos de substâncias constantes em efluentes de fontes poluidoras.

Parâmetro	Valores Máximos Permitidos
pH	5 a 9
DQO	200 mg.L ⁻¹
Amônia total	5 mg.L ⁻¹
Índice de fenóis	0,5 mg C ₆ H ₅ OH/L

Fonte: Semace (2005)

Visto a não existência, na Resolução CONAMA, de certos parâmetros estudados nesta pesquisa para lançamentos de efluentes em água, como nitrato e nitrito, na Tabela 7 são apresentadas as concentrações máximas das condições padrões de qualidade de água para consumo.

Tabela 7 - Padrões de qualidade de água para consumo.

Parâmetros	Águas Doces		Águas Salobras
	Classe I	Classe III	Classe I
pH	6 a 9	6 a 9	6,5 a 8,5
Nitrato (mg.L ⁻¹ N)	10	10	0,4
Nitrito (mg.L ⁻¹ N)	1,0	1,0	0,7
N-amoniaco total (mg.L ⁻¹ N)	3 para pH ≤ 7,5;	13,3 para pH ≤ 7,5;	0,4
	2,0 para	5,6 para	
	7,5 < pH ≤ 8,0;	7,5 < pH ≤ 8,0;	
	1,0 para	2,2 para	
	8,0 < pH ≤ 8,5;	8,0 < pH ≤ 8,5;	
	0,5 para	1,0 para	
	pH > 8,5.	pH > 8,5.	
Fenol (mg.L ⁻¹)	0,003	0,01	0,003

Fonte: CONAMA (2011).

Novos caminhos de remediação têm sido propostos aos ambientes que contém os poluentes aromáticos tóxicos. Pesquisas envolvendo processos biológicos para remoção ou degradação de compostos nitroaromáticos ainda são restritos. Por outro lado, muitos estudos na área ambiental empregando fungos são crescentes, pois estes micro-organismos são biodegradadores potentes. Por esse motivo, o emprego de micro-organismos para remoção do 2,4-dinitrofenol em água, parece ser viável, podendo desta forma, contribuir para minimizar os problemas ambientais de contaminação por estes compostos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O composto químico 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF) foi escolhido mediante pesquisas que direcionavam a utilização deste composto como intermediário na produção de pesticidas. A seleção da concentração de 5 mg.L^{-1} foi baseado na pesquisa de Chen *et al.*, (2006). O 2,4-dinitrofenol padrão, da marca Sigma-Aldrich, de grau analítico, foi cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

A espécie escolhida para degradar o 2,4-DNF, *Aspergillus niger* AN 400, é um micro-organismo muito usado no campo da biotecnologia, devido às enzimas produzidas tais como amilases, lipases, celulasas, xinalases e proteases (SAMPALHO, 2005).

A pesquisa foi conduzida em 3 fases: Fase 1 - Preparo do inóculo fúngico e água sintética. Fase 2 - Testes de adsorção e Avaliação da toxicidade em placas. Fase 3 - Tratamento biológico: Operações em bateladas com biomassa dispersa, variando a glicose em concentrações diferentes de: $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, 3 g.L^{-1} , 5 g.L^{-1} , 10 g.L^{-1} e Operações em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada e glicose em uma concentração determinada ótima.

4.1 Preparo do eluente sintético

Para obtenção do eluente sintético foi preparado 1 litro (1L) de solução padrão de 2,4-DNF com quantidade de soluto suficiente para concentração de 2000 mg.L^{-1} . A solução foi estocada em frasco escuro de modo a evitar interferência da luz.

Em função da dificuldade do 2,4-dinitrofenol solubilizar em água, fez-se necessária adição do cossolvente, etanol, com percentual de 2,5% da solução, e utilização de chapa elétrica com rotação e aquecimento.

Com os devidos cuidados tomados para tornar a solubilização mais eficiente, o preparo da solução foi executado em um período de 5 horas, considerando o processo de pesagem até a estocagem da solução.

A curva de calibração padrão da solução estoque foi feita no intervalo de 2,5 - 100 mg.L^{-1} e está representada no anexo I.

Como as amostras do tratamento de 2,4-DNF com *Aspergillus niger* AN 400 precisariam ser examinadas no cromatógrafo, foi indispensável fazer análises das soluções empregadas para averiguação de qualquer interferência com relação aos picos no cromatograma e estes não serem confundidos com o pico do 2,4-DNF. Então as soluções examinadas foram 2,4-DNF, etanol e Vishniac.

A solução do 2,4-DNF que continha etanol foi analisada no cromatograma apresentando picos distintos, para o 2,4-DNF e outro para o etanol. Analisando a solução de Vishniac, foi observada a existência de picos semelhantes ao do 2,4-DNF, esse sinal forte ocasionaria influência no resultado da amostra a ser tratada, obtendo resultados não confiáveis. A composição química da solução de Vishniac de acordo com Sampaio (2006) está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Composição química da Solução de Vishniac.

Produto químico	g.L⁻¹ de solução
EDTA	10,0
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4,40
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,00
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,32
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,22
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,47
FeSO ₄ . 7H ₂ O	1,00

Fonte: Sampaio (2006).

Analizando a composição da solução de Vishniac observou-se a presença do produto químico EDTA, único composto orgânico da solução que possivelmente ocasionaria interferência na leitura dos picos das amostras de tratamento do 2,4-DNF. Com o resultado obtido fez-se necessário a remoção do EDTA da Solução de Vishniac, adaptando-se, desta forma, a composição da solução de Vishniac (Tabela 9) para o tratamento do 2,4-DNF.

Tabela 9 - Solução de Vishniac utilizada na biodegradação de 2,4-DNF.

Produto químico	g.L⁻¹ de solução
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4,40
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,00
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,32
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,22
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,47
FeSO ₄ . 7H ₂ O	1,00

Fonte: Adaptado de Sampaio (2006).

O eluente sintético aquoso foi obtido por diluição da solução estoque para uma concentração final de 5 mg.L^{-1} .

4.2 Cultivo, produção e contagem do inóculo (*Aspergillus niger* AN 400)

Os esporos de *Aspergillus niger* AN 400 foram cultivados em placas de Petri (16 placas) estéreis no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do IFCE, contendo 15 mL de meio de cultura *Sabouraud* meio específico para crescimento dos fungos o qual foi previamente esterilizado a 121°C , sob pressão entre 1 e 1,5 Kgf.cm² durante 15 minutos. Adicionou-se ainda às placas, solução de Vishniac, conforme a Tabela 9, na concentração de 1 mL.L^{-1} de meio de cultura.

Após a solidificação do meio de cultura, os esporos foram inoculados nas placas e estas foram mantidas sob temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ em estufa microbiológica por um período de sete dias, até se observar o crescimento do fungo na superfície das placas. Posteriormente, os esporos foram removidos com uso de solução salina isotônica acrescida de Tween 80, transferidos e guardados em frasco estéril e mantido sob refrigeração a 0°C . Para a contagem de esporos foi preparada solução utilizando 50 μL da suspensão, previamente agitada em agitador tipo vórtex, acrescidos de 950 μL de solução Tween 80, resultando uma diluição de 1:20. Em seguida foram transferidos 20 μL da solução preparada para câmara de Neubauer para a contagem dos esporos utilizando microscópio óptico da marca com aumento de 40 vezes como verificado na Figura 7.

Figura 6 - Microscópio Ótico e câmara de Neubauer.



Fonte: Autor (2014).

Para o cálculo do número de esporos foi empregada a equação (1).

$$\text{Esporos/mL} = \text{esporos contados} \times \text{diluição} \times 2,5 \times 10^5 \quad (1)$$

4.3 Teste de toxicidade do 2,4-dinitrofenol ao *Aspergillus niger* AN 400

O procedimento experimental foi baseado em Sampaio, (2005). Foram preparadas placas de Petri com meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose Cloranfenicol (ASDC) para o 2,4-DNF em duplicata, com concentrações variadas: 300 mg.L⁻¹, 200 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹, 90 mg.L⁻¹, 80 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 40 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹, além do controle que não possuía o 2,4-DNF. O número de esporos de *Aspergillus niger* inoculados por placa foi 2×10^6 esporos.mL⁻¹. A linhagem empregada foi cedida pelo Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do IFCE. 22 placas de Petri foram preparadas, as quais foram incubadas a 30°C ±1 e observadas diariamente a fim de se verificar o crescimento do fungo.

4.4 Operação em Reatores em Bateladas com biomassa fúngica dispersa.

O experimento foi realizado em agitadores rotatórios (shaker) com velocidade de 120 rpm, temperatura de 28°C ±2, usando frasco erlenmeyer como reator e com volume efetivo de 200 mL de solução, esterilizados em autoclave e fechados com tampas fabricadas por algodão e TNT, um material confeccionado em tecido a base de polipropileno e viscoso, o qual visava impedir a passagem de partículas ou gotas de fluidos contaminados. Os reatores foram cobertos com papel para evitar a fotodegradação do meio a ser analisado.

Os reatores foram divididos em grupos de controle, com fungo e fungo com glicose segundo a Tabela 10.

Tabela 10 - Divisão dos reatores com suas respectivas quantidades de glicose e fungos.

Reatores	Glicose (g.L ⁻¹)	Fungos (2 x 10 ⁶ esporos.mL ⁻¹)
Reator Controle (RC)	--	--
Reator com Fungo (RF)	--	X
Reator com Fungo e Glicose (RFG0,5)	0,5	X
Reator com Fungo e Glicose (RFG3)	3,0	X
Reator com Fungo e Glicose (RFG5)	5,0	X
Reator com Fungo e Glicose (RFG10)	10,0	X

Fonte: Autor (2014).

O 1º lote de reatores foi constituído de: RC, RF e RFG0,5, todos em duplicata. Os tempos de reação (TR) para a coleta das amostras para análises foram de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h, perfazendo um total de 36 reatores. O 2º lote foi constituído de: RC, RF, RFG3, RFG5, RFG10. O tempo de reação adotado foi de 144 h, perfazendo um total de 10 reatores. Os lotes foram trabalhados em momentos diferentes devido a quantidade total de reatores.

A composição da água sintética do 2,4-DNF empregada nos reatores em bateladas com biomassa fúngica dispersa está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 - Composição da água sintética de 2,4-DNF empregada nos reatores em bateladas com biomassa dispersa.

Reatores	Glicose (g.L ⁻¹)	2,4-DNF (5 mg.L ⁻¹)	Vishniac (1 mL L ⁻¹)	Fungos (2x10 ⁶ esporos. mL ⁻¹)	Água
RC	-	X	X	-	X
RF	-	X	X	X	X
RFG 0,5	0,5	X	X	X	X
RFG 3	3,0	X	X	X	X
RFG 5	5,0	X	X	X	X
RFG 10	10,0	X	X	X	X

Fonte: Autor (2014).

As análises realizadas nesta etapa foram: demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos voláteis (SSV), concentração de 2,4-DNF e pH, executadas de acordo com APHA (2005), exceto 2,4-DNF, cuja determinação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo metodologia adaptada de FAN *et al.* (2011). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A concentração de 2,4-DNF nas amostras durante o processo aeróbio foram monitorados utilizando cromatógrafo HPLC Varian ProStar com detector de arranjo de diodos (DAD/HPLC) no comprimento de onda de 254 nm. A coluna utilizada foi ODS Hypersil C18, 250 mm x 4,6 mm, tamanho da partícula 5 µm, fase reversa. O volume de amostra injetado foi de 20 µL, com fluxo isocrático foi de 1 mL.min⁻¹. A fase móvel foi constituída de 40% água e 60% de metanol. O percentual de remoção do 2,4-DNF, tanto para batelada dispersa como para batelada imobilizada, foi calculado usando a equação (2):

$$\text{Remoção (\%)} = (C_0 - C) / C_0 \times 100 \quad (2)$$

onde C_0 e C são as concentrações iniciais e finais de 2,4-DNF para $t = 0$ e t , respectivamente.

4.5 Ensaio de adsorção ao meio suporte

Este ensaio foi utilizado reator de vidro de 5L, ao qual foram adicionados 5 g de cubos de poliuretano acondicionados em redes de polietileno previamente secos em estufa. Este recipiente recebeu 1 L da solução de Vishniac acrescido de 5 mg.L^{-1} de 2,4-dinitrofenol.

A capacidade máxima de adsorção do 2,4-dinitrofenol nos cubos de poliuretano, empregada como material suporte da pesquisa foi monitorado a partir da sua concentração inicial no meio durante um período de 2 horas, sendo retiradas alíquotas de 20 em 20 min para análise no cromatógrafo.

4.6 Operação em Reatores em Bateladas Sequenciais com biomassa fúngica imobilizada.

4.6.1 Imobilização da biomassa

O meio suporte utilizado na imobilização dos micro-organismos foram cubos de poliuretano cortada em cubos de 1 cm de aresta, totalizando 15 g e esterilizado em autoclave a 121°C , sob pressão entre 1 e $1,5 \text{ Kgf.cm}^2$, durante 15 minutos. Depois de realizada a esterilização, os cubos de poliuretano foram acondicionados em três redes de polietileno dentro do reator, com capacidade de 5 L, que foi preenchido com 4 L de meio mineral, meio este composto segundo a Tabela 12.

Tabela 12 - Composição do meio mineral que alimenta o reator durante a imobilização da biomassa fúngica.

Composição	Concentração (g.L^{-1})
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,50
NaNO_3	0,25
KH_2PO_4	0,20
MgSO_4	0,25
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,08
H_2MoO_4	0,05
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0,05
ZnSO_4	0,04

Fonte: Adaptado de Rodrigues (2006).

Logo após a adição do meio mineral no reator, acrescentou-se glicose na concentração de 5 g.L^{-1} e em seguida inoculou-se a suspensão de esporos com 2×10^6 esporos mL^{-1} de concentração.

A aeração do reator era fornecida por mini-compressores, com capacidade de 50 L h^{-1} e potência de 5 W e difundida para o meio por pedras porosas, conforme a Figura 7. A imobilização teve duração de 15 dias, e a cada três dias o meio mineral era trocado para melhor crescimento dos fungos.

Figura 7 – Imobilização da biomassa fúngica de *Aspergillus niger* AN 400 em cubos de poliuretano.



Fonte: Autor (2014).

4.6.2 Montagem e operação do reator em batelada sequencial com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400

O reator utilizado foi confeccionado em vidro e possuía volume total de 5 L e volume útil de 4 L , vedado com tampa plástica. O ar era fornecido por mini-compressores, e a alimentação foi a partir do meio sintético preparado, acrescida de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose.

As análises realizadas foram de: demanda química de oxigênio (DQO), concentração de 2,4-DNF, pH, amônia, nitrato e nitrito, executadas de acordo com APHA (2005), exceto as concentrações de 2,4-DNF, cuja determinação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) adaptado de FAN *et al.* (2011).

O reator foi operado em 16 ciclos e no início de cada ciclo a matriz aquosa era renovada. A duração de cada ciclo está apresentada na Tabela 13.

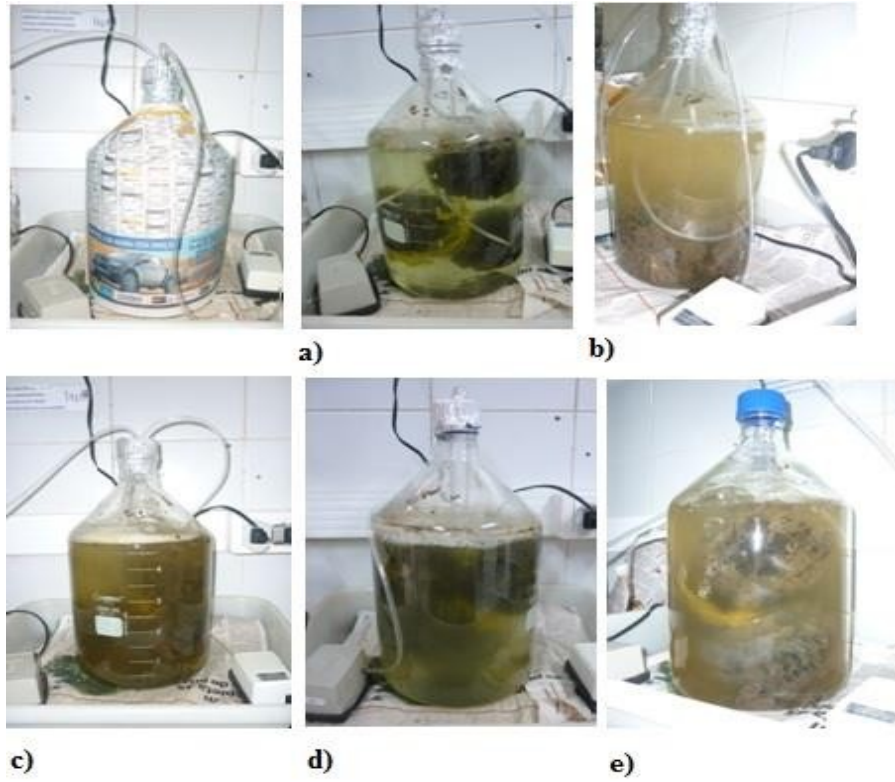
Tabela 13 - Tempos reacionais de operação nas bateladas sequenciais com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400.

Ciclos	Tempo reacional dos ciclos (horas)						
	0	8	24	48	72	96	168
Ciclo 1	X		X	X	X	X	X
Ciclo 2	X		X	X	X	X	X
Ciclo 3	X					X	X
Ciclo 4	X					X	X
Ciclo 1	X			X			
Ciclo 2	X			X			
Ciclo 3	X			X			
Ciclo 4	X			X			
Ciclo 1	X		X				
Ciclo 2	X		X				
Ciclo 3	X		X				
Ciclo 4	X		X				
Ciclo 1	X	X					
Ciclo 2	X	X					
Ciclo 3	X	X					
Ciclo 4	X	X					

Fonte: Autor (2013).

Na Figura 8 está representando o ciclo 1 nas 168 h de experimento, na qual visualiza-se o reator coberto com papel com a função de proteger o meio da luz para não interferir na degradação do 2,4-DNF.

Figura 8 - Reator em batelada sequencial com biomassa imobilizada com *Aspergillus niger* AN 400 nos tempos: a) 24 h b) 48 h c) 72 h d) 96 h e) 168 h.



Fonte: Autor (2014).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões foram abordados respeitando a ordem dos tópicos dos materiais e métodos utilizados.

As análises químicas identificaram e quantificaram as concentrações das substâncias tóxicas e o teste de toxicidade avaliou o efeito do contaminante sobre os sistemas biológicos, portanto, testes de toxicidade e análises químicas se complementaram.

5.1 Toxicidade do 2,4-Dinitrofenol ao *Aspergillus niger* AN 400

Segundo Griffin (1994), o 2,4-DNF é considerado um clássico agente de desacoplamento na bioquímica e foi o primeiro a ser usado como preservativo da madeira, por esse motivo, foi necessária a realização do teste de toxicidade para investigação do crescimento do fungo *Aspergillus niger* AN 400 no meio contendo o 2,4-dinitrofenol. De acordo com os resultados obtidos do teste de toxicidade verificou-se que o fungo foi capaz de crescer em todas as concentrações testadas. Assim sendo, foi decidido dar continuidade a pesquisa sobre degradação do 2,4-dinitrofenol pelo fungo *Aspergillus niger* AN 400.

O teste de toxicidade em placas mostrou que a espécie *Aspergillus niger* AN 400 foi capaz de crescer em concentrações de 2,4-DNF de 5 mg.L⁻¹ até 300 mg.L⁻¹.

Na primeira observação, 24 horas após a incubação, não foi verificado crescimento de esporos de *Aspergillus niger* AN 400 em nenhuma placa. Após 48 h de incubação ocorreu um discreto crescimento de esporos nas placas de concentrações de 2,4-DNF de: 5 mg.L⁻¹ e 10 mg.L⁻¹. Nas demais concentrações houve maior crescimento do micélio. Completada às 72 horas de incubação todas as placas, exceto a de 200 mg.L⁻¹ e 300 mg.L⁻¹ apresentaram esporos de *Aspergillus niger* AN 400 na metade da superfície das placas. Com 96 horas de incubação, as placas de 200 mg.L⁻¹ e 300 mg.L⁻¹ apresentaram esporulação em alguns pontos da superfície. Após 120 horas de incubação as placas de 200 mg.L⁻¹ e 300 mg.L⁻¹ apresentaram superfície quase totalmente coberta por esporos de *Aspergillus niger* AN 400. Portanto, o fungo examinado não teve seu crescimento inibido por nenhuma concentração. Nesta pesquisa, pode ser observado no teste de toxicidade que à medida que as concentrações do 2,4-DNF aumentavam, a esporulação diminuía ocorrendo inibição no crescimento microbiano, corroborando com que Alexieva *et al.* (2008) relatou em sua pesquisa, na qual maiores concentrações dos tóxicos investigados mostraram um efeito inibitório sobre o crescimento microbiano.

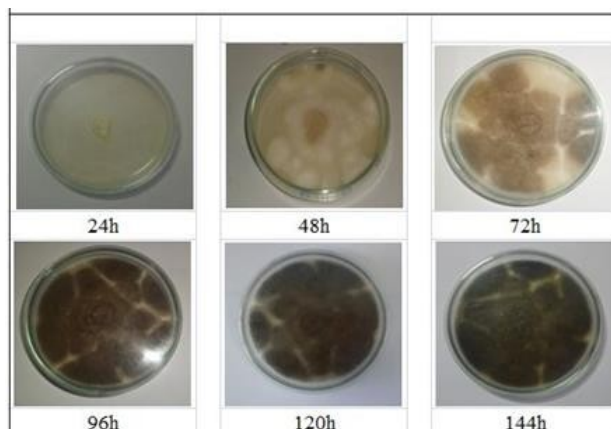
Sampaio (2005) realizou teste de toxicidade do fungo *Aspergillus niger* AN 400 na água sintética contaminada com o pesticida metil paration nas concentrações variando entre 0,075 e 60 mg.L⁻¹. Após 19 horas de incubação, não foi observado crescimento de esporos do fungo em nenhuma placa. Nas 43 horas de incubação, percebeu-se o crescimento do micélio nas placas com concentração de metil paration de: 0,075 mg.L⁻¹; 0,15 mg.L⁻¹; 0,30 mg.L⁻¹; 0,75 mg.L⁻¹; 1,50 mg.L⁻¹; 3,50 mg.L⁻¹ e 7,5 mg.L⁻¹. Após 96 h de incubação todas as placas já apresentavam esporos e foi nesse período que a placa de concentração de 60 mg.L⁻¹ apresentou esporos de *Aspergillus niger* por toda superfície.

Outro estudo sobre teste de toxicidade foi relatado por Souza Neto (2012), que estudou o grau de toxicidade do fungo *Aspergillus niger* AN 400 na água sintética dopada com os pesticidas atrazina, metil paration, paraquat e deltametrina nas concentrações de 0 mg.L⁻¹, 7,5 mg.L⁻¹, 15 mg.L⁻¹, 22,5 mg.L⁻¹ e 30 mg.L⁻¹, com 216 horas de incubação (9 dias) e observou que as placas apresentaram crescimento do fungo, porém a placa com concentração de 30 mg.L⁻¹ apresentou crescimento mínimo. Diferentemente da presente pesquisa, com 144 horas de incubação nas placas com concentração 40 mg.L⁻¹ de 2,4DNF, o crescimento foi visualizado por toda superfície.

Para Griffin (1994), interrompendo o fluxo metabólico através da glicólise, a via de monofosfato de hexose, e o ciclo de ácido tricarboxílico iria perturbar o maquinário biossintético de base do fungo, privando de ATP e intermediários essenciais. Embora os fungicidas inespecíficos certamente afetem estes processos, não há fungicidas específicos que interagem com estas etapas do metabolismo.

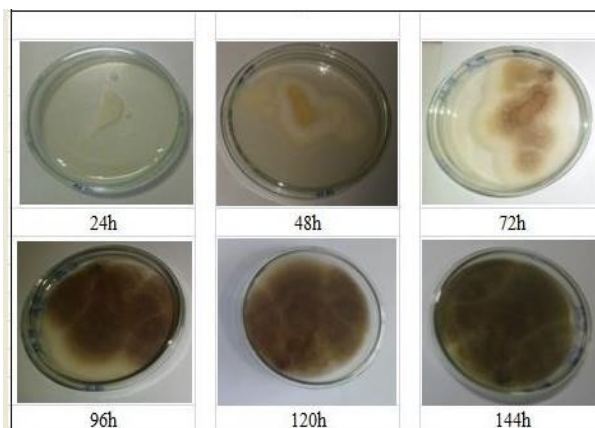
Apesar do meio imposto ao micro-organismo oferecer condições nutricionais adequadas, com fonte de carbono, proteínas, elementos-traço e temperatura ideal ao seu crescimento, a presença de 2,4-DNF em concentrações elevadas não impediu a reprodução da espécie. Nas Figuras de 9 a 20 estão apresentados o crescimento do *Aspergillus niger* AN 400 no meio em diferentes concentrações de 2,4-DNF.

Figura 9 - Teste de Toxicidade com 0 mg.L⁻¹ de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



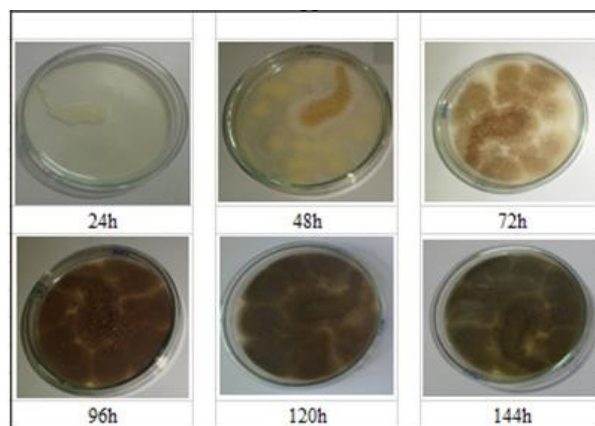
Fonte: Autor (2013).

Figura 10 - Teste de Toxicidade com 5 mg.L⁻¹ de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



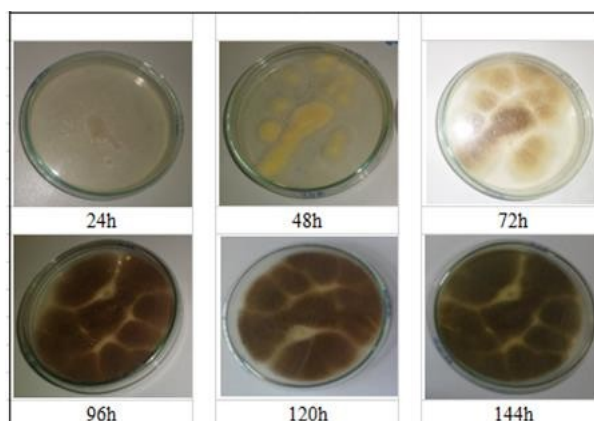
Fonte: Autor (2013).

Figura 11 - Teste de Toxicidade com 10 mg.L⁻¹ de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



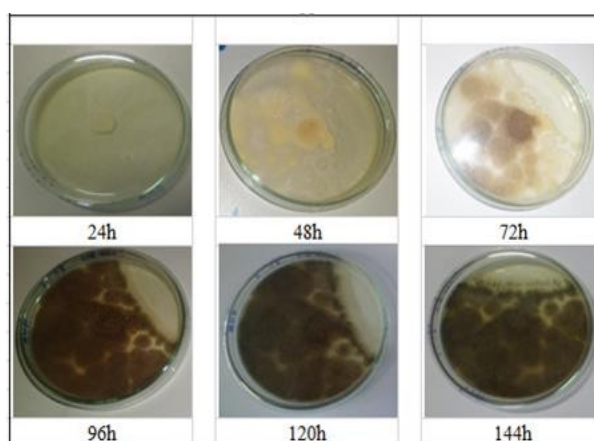
Fonte: Autor (2013).

Figura 12 - Teste de Toxicidade com 20 mg.L⁻¹ de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



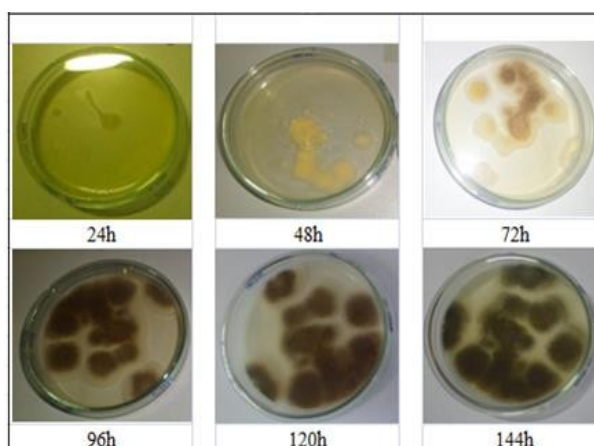
Fonte: Autor (2013).

Figura 13 - Teste de Toxicidade com 40 mg.L⁻¹ de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



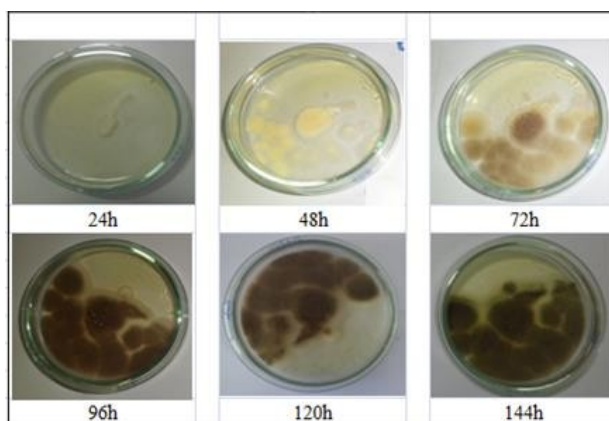
Fonte: Autor (2013).

Figura 14 - Teste de Toxicidade com 50 mg.L⁻¹ de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



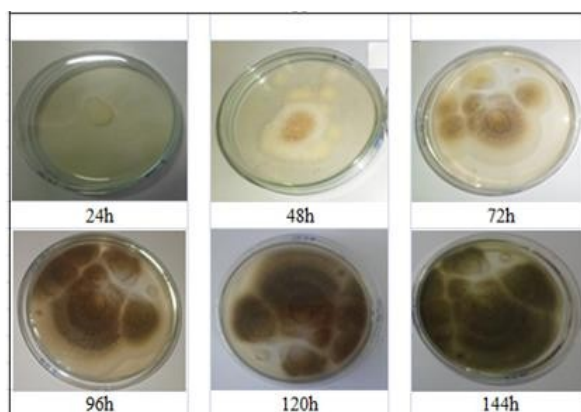
Fonte: Autor (2013).

Figura 15 - Teste de Toxicidade com 60 mg.L^{-1} de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



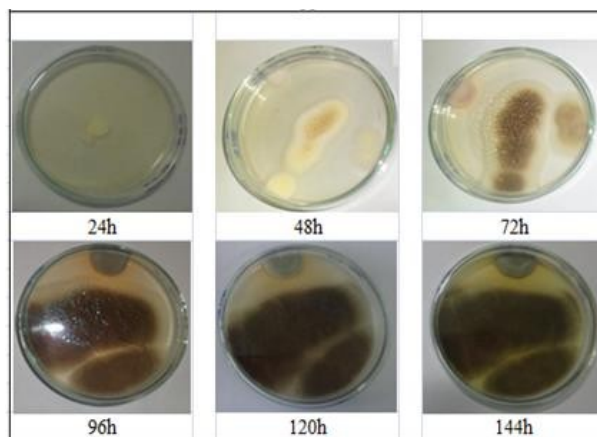
Fonte: Autor (2013).

Figura 16 - Teste de Toxicidade com 80 mg.L^{-1} de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



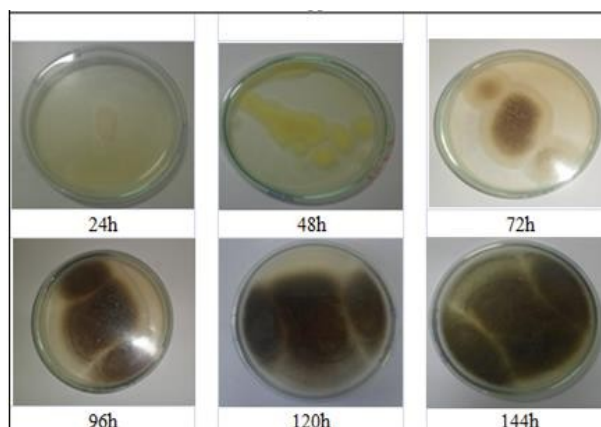
Fonte: Autor (2013).

Figura 17 - Teste de Toxicidade com 90 mg.L^{-1} de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



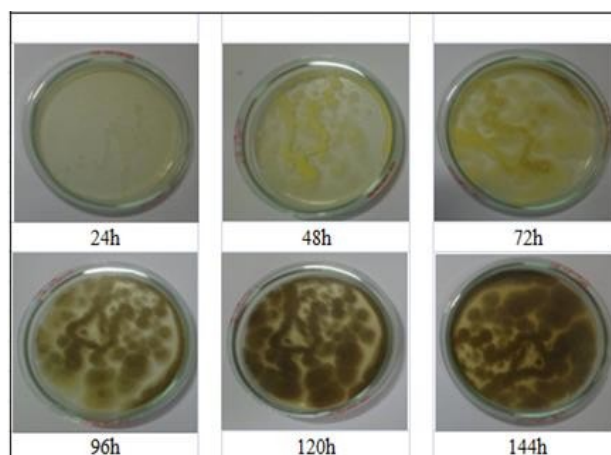
Fonte: Autor (2013).

Figura 18 - Teste de Toxicidade com 100 mg.L^{-1} de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



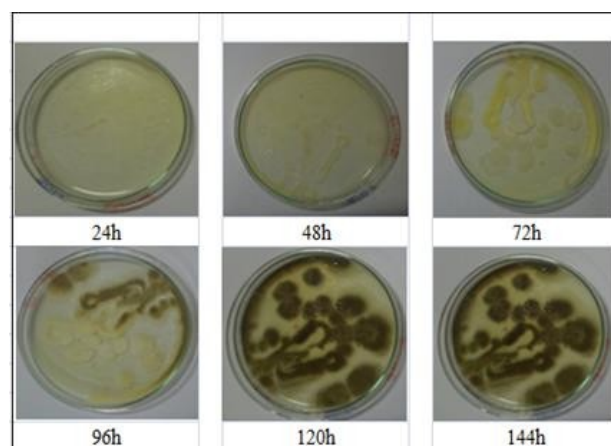
Fonte: Autor (2013).

Figura 19 - Teste de Toxicidade com 200 mg.L^{-1} de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



Fonte: Autor (2013).

Figura 20 - Teste de Toxicidade com 300 mg.L^{-1} de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.



Fonte: Autor (2013).

De acordo com o observado no teste de toxicidade em placas, desta pesquisa, o *Aspergillus niger* AN 400 foi capaz de se reproduzir em concentrações de 2,4-DNF que variaram de 5 a 300 mg.L⁻¹, possivelmente em concentrações menores que estas, poderão responder também ao tratamento biológico com o fungo *Aspergillus niger* AN 400.

5.2 Operação em Reatores em Bateladas com biomassa fúngica dispersa

5.2.1 1º lote - Batelada contendo 0,5 g.L⁻¹ de glicose

5.2.1.1 pH

O pH da solução padrão do 2,4-DNF é de $3,8 \pm 0,3$ e o seu pK_a é de 4,1, ou seja, $pH \approx pK_a$ induzindo ao raciocínio que para esses valores serem iguais ou aproximados. Por outro lado as concentrações do ácido, no caso o NH_4^+ , são iguais a concentração e sua base conjugada, NH_3 , espécies estas provenientes da solução de Vishniac, tornando a razão $[NH_3]/[NH_4^+]$ igual a 1, de acordo com a Equação de Henderson-Hasselbalch: $pH = pK_a + \log [base\ conjugada]/[ácido]$ (KOTZ, 2002).

Ao ser preparada a água sintética contendo 2,4-DNF juntamente com a solução de Vishniac e os fungos o pH inicial do meio passou para 6,8, valor superior ao da solução de 2,4-DNF mas na faixa ótima, entre 3,3 a 7,5, de crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* (WHELLER, 1991) e considerada como adequada para operação em processos aeróbios (SANT'ANNA JÚNIOR, 2010).

De acordo com o observado na Tabela 14, o pH do meio apresentou variações pequenas durante às 144 h da batelada nos reatores RC, RF e RFG.

Tabela 14 - Valores de pH obtidos nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 0,5 g.L⁻¹ de glicose durante 144 h de experimento.

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
RC	6,8	7,0	6,3	7,0	6,4	6,4	7,3
RF	6,8	7,2	7,0	7,3	7,6	7,3	6,5
RFG	6,8	7,3	7,0	7,0	7,1	6,9	6,9

Fonte: Autor (2014).

Nos reatores de controle o pH oscilou no intervalo de 6,8 a 7,3, indício de que não houve contaminação por micro-organismos ou devido ao efeito tampão formado no meio e

que não interferiu na acidez ou basicidade do meio, o que já era esperado neste reator devido ausência de fungos.

Nos reatores com fungos (RF) e fungos com glicose (RFG) foi observado pequeno aumento nos valores do pH do início do ciclo até 96 h, esse aumento de pH provavelmente foi devido ao consumo de ácidos como relatado também por Rodrigues (2006). No reator RF após o tempo de reação de 96 h foi verificado decaimento de pH 7,6 para 7,3 e continuou baixando até o final da batelada (144 h) chegando a 6,5. Comportamento semelhante ocorreu no reator RFG, após 96 h o pH decaiu de 7,1 para 6,9 permanecendo constante até às 144 h. Como nestes reatores havia existência do fungo a formação de ácidos orgânicos tornou o meio levemente ácido (SAMPAIO, 2005), possivelmente oriundos da degradação do 2,4-DNF.

Swamy e Ramsay (1999) em análise dos efeitos das concentrações de glicose e NH_4^+ na descoloração de corante por *Trametes versicolor* também verificaram valores decrescentes na concentração de corante com o pH constante, para isso utilizaram solução tampão para manter o mesmo pH sobre sucessivas descolorações de vários corantes. O aumento do percentual de remoção do 2,4-DNF com o tamponamento da água sintética também foi verificado nos reatores RF e RFG desta pesquisa. O acréscimo da solução tampão não foi necessário visto que a própria composição da água sintética do 2,4-DNF funcionou como tampão.

Lin *et al.* (2013) estudaram a variação do pH na degradação do trinitrotolueno em condições aeróbia pela espécie fúngica *Bacillus mycoides* e verificaram que o aumento de pH de 5 para 7, em condições aeróbias, alcançou degradação de 82% e diminuiu para 72% no pH 9. A explicação sugerida pelos autores foi que *Bacillus mycoides* e as enzimas associadas com esta espécie são potencialmente sensíveis a mudanças de pH. O valor de remoção de 2,4-DNF, Nesta pesquisa, no RF com pH 6,5 foi de 11,65%, menor que o RFG apresentando valor de pH igual a 6,9 tendo uma degradação do DNF de 23,5%.

5.2.1.2 DQO

As concentrações de matéria orgânica, na batelada com biomassa dispersa, nos reatores RC, RF e RFG são apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 - Valores da concentração de DQO (mg.L^{-1}) obtidos nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose durante 144 h de experimento.

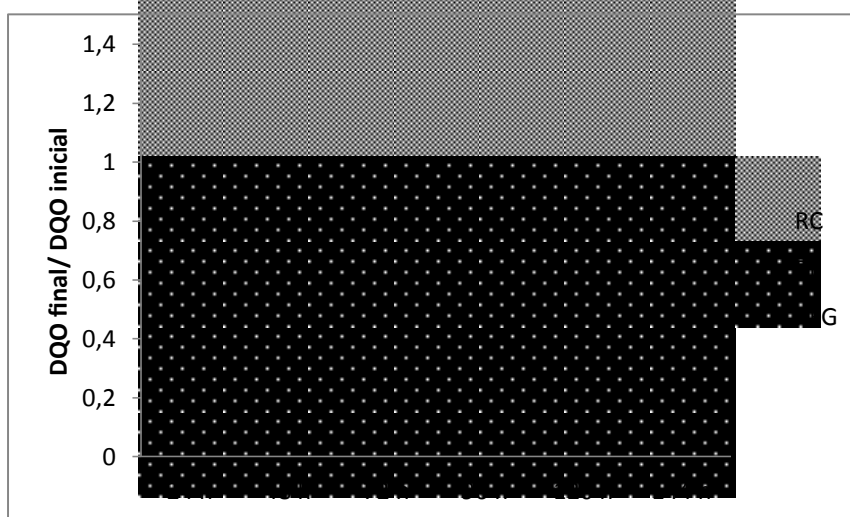
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
RC	152	107	170	199	199	181	201
RF	140	71	137	134	89	89	109
RFG	685	486	554	539	480	483	474

Fonte: Autor (2014).

Vale ressaltar que em 0 h os reatores com fungos e glicose (RFG) apresentaram aumento quantitativamente significativo na concentração de DQO em relação à RC e à RF. Verificou-se ainda que os reatores RC não apresentaram remoção de matéria orgânica, provavelmente devido à ausência do fungo e no reator e nos reatores RF a remoção foi pequena.

O decréscimo entre a razão de $\text{DQO}_{\text{final}}$ e $\text{DQO}_{\text{inicial}}$ é indicativo de alta remoção de matéria orgânica (Figura 21).

Figura 21 – Relação entre $\text{DQO}_{\text{final}}$ e $\text{DQO}_{\text{inicial}}$ obtida nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose durante 144 h de experimento.



Fonte: Autor (2014).

Nos reatores de controle (RC), a remoção de 29% ocorreu somente nas primeiras 24 h, de 48 h até às 144 h houve aumento nas concentrações de matéria orgânica, o que pode ser explicado provavelmente pela formação de biomassa fúngica e de subprodutos resultantes da degradação do 2,4-DNF.

Uma melhor eficiência de remoção de DQO foi verificada nos reatores com fungo (RF) e nos reatores com fungo e glicose (RFG) que apresentaram um percentual de degradação de 22% e 31%, respectivamente. A diferença de degradação observada entre os reatores pode ser devido à presença de glicose, que serve como fonte primária de carbono ao fungo, capaz de ativar seu sistema enzimático, e elevar o percentual de degradação. A glicose por ser um composto mais facilmente degradado, resultou no aumento mais rápido da biomassa e na eficiência de remoção de matéria orgânica, devido ao seu maior consumo pela população microbiana, também relatado por SAMPAIO *et al.*, (2007).

Segundo Hirooka *et al.*, (2006) para a remoção de baixas concentrações de 2,4-DNF por micro-organismos heterotróficos, é necessário adicionar uma fonte de carbono orgânico externo, a fim de aumentar a sua biomassa e capacidades de remoção. Como nesta pesquisa, o reator que continha o cossubstrato melhorou a degradação do 2,4 DNF.

Rodrigues e Marinho (2012) verificaram que na biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos em reator sequencial com inóculo de *Aspergillus niger* AN 400 os valores de DQO solúvel não diminuíram ao mesmo tempo em que os de benzeno, tolueno e xileno, também por consequência da intensa produção de subprodutos da biotransformação dos compostos BTX.

Sahoo *et al.* (2013), pesquisando eficiência da biodegradação de *p*-nitrofenol, como única fonte de carbono e energia, em reator de leito contínuo e fluxo ascendente utilizando *Arthrobacter chlorophenolicus* em diferentes taxas de cargas conseguiu remoção de mais do que 99,9 % de PNF para uma concentração afluenta de 1400 mg.L^{-1} em 18 h TRH. Segundo o autor, os 98% de remoção na DQO no processo sugere que não houve acúmulo de intermediários.

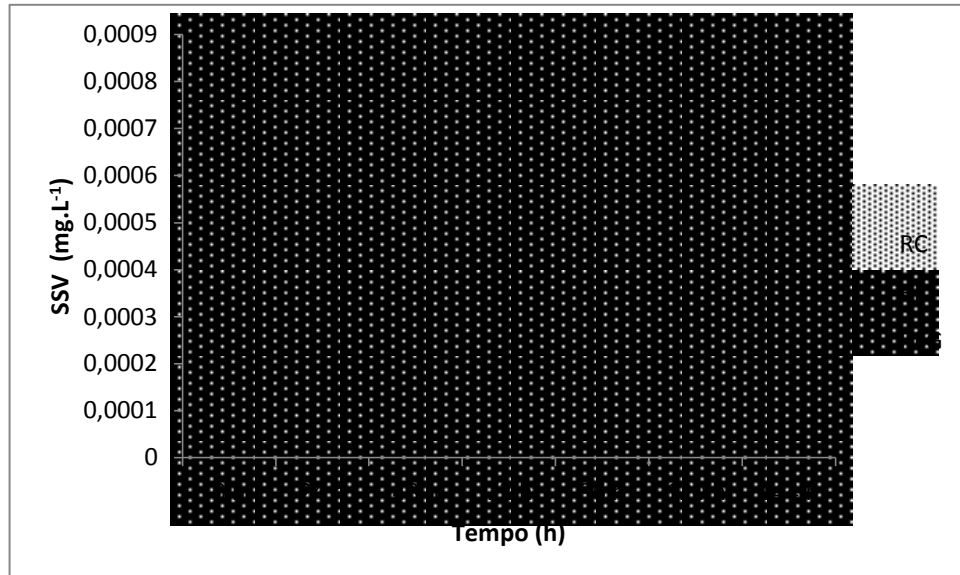
5.2.1.3 Sólidos suspensos voláteis (SSV)

Em relação às concentrações de SSV percebeu-se que os reatores RF e RFG tiveram um aumento gradativo e superior ao do RC. O que já era esperado, uma vez que a presença de fungos aumenta a concentração de biomassa.

De 0h às 48 h (Figura 22) não foi verificado aumento na formação de sólidos suspensos voláteis nos três tipos de reatores, que pode justificar o baixo percentual de remoção da DQO nesses tempos de reação. A partir das 72 h houve um incremento dos SSV nos reatores com fungo e fungo com glicose, e maior ainda para o tempo de reação de 144 h para os RFG, corroborando com a hipótese de que à medida que o fungo disponibiliza de

cossustrato, ele cresce, a matéria orgânica decai, a concentração de SSV aumenta, como observado nesta pesquisa.

Figura 22 - Variação da concentração de SSV (mg.L^{-1}) obtido nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose durante 144 h de experimento.



Fonte: Autor (2014).

Verificou-se que a melhor remoção de DQO, às 144 h e de 31%, coincide com o maior crescimento da biomassa, expressa como SSV. À medida que a população microbiana aumenta, desde que haja condições propícia para esse crescimento, menor será a disponibilidade de alimento e, conseqüentemente, melhor polimento da água residuária (KYRIACOU *et al.*, 2005).

5.2.1.4 Composto 2,4-Dinitrofenol (2,4-DNF)

Quanto ao 2,4-DNF, como se pode observar na Tabela 16, a sua concentração diminuiu com maior intensidade nas primeiras 24 h. Nos reatores RC o decréscimo ocorreu até às 24 h permanecendo praticamente constante nos outros tempos estudados. Entretanto, nos RFG houve pequenas variações de concentrações sucedidos nos tempos de 24 h e 72h.

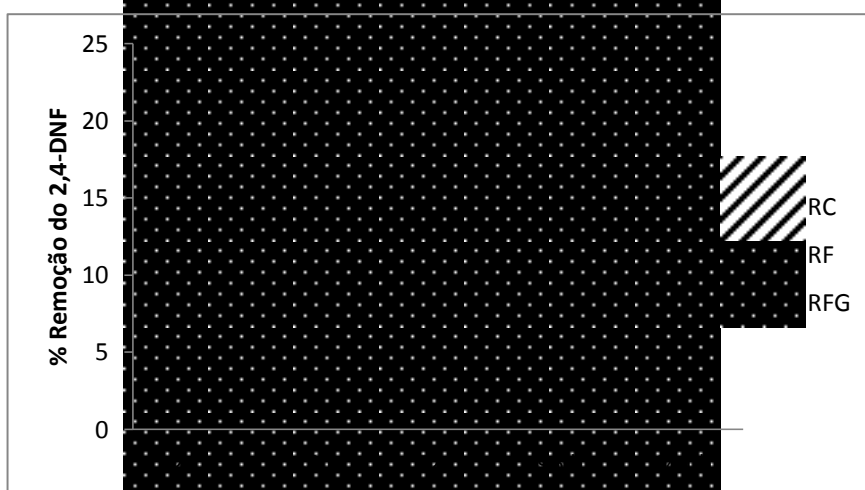
Tabela 16 - Valores das concentrações de 2,4-DNF (mg.L^{-1}) obtidos nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose durante 144 h de experimento.

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
RC	4,2	3,5	3,5	3,3	3,5	3,8
RF	4,3	3,5	3,5	3,5	3,8	3,8
RFG	4,3	4,0	4,0	3,3	3,3	3,3

Fonte: Autor (2014).

Na Figura 23 estão exibidos os percentuais de remoção do 2,4-DNF. Nos RF obtiveram-se 11,7% e RFG de 23,5% de remoção, revelando que os reatores contendo apenas o fungo obtiveram resultados inferiores aos reatores com fungo e glicose. Mais uma vez corroborando com a necessidade de um cossubstrato para degradar compostos persistentes, fato este também relatado por Marinho e Rodrigues (2012) em suas pesquisas com *Aspergillus niger* AN 400 e outros compostos recalcitrantes como atrazina, fenóis, corantes, entre outros.

Figura 23 – Percentual de remoção do 2,4-DNF obtido nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose durante 144 h de experimento.



Fonte: Autor (2014).

She *et al.*, (2005) investigando a toxicidade anaeróbia, biodegradabilidade e cinética do 2,4-dinitrofenol (2,4- DNF) e 3-nitrofenol (3-NF) utilizando como cossubstratos a glicose e os ácidos graxos voláteis (AGV), verificaram que com glicose como cossubstrato, a remoção do 3-NF foi de 36 - 73,6% e 3-NF não foi biodegradado completamente, mesmo em concentrações baixas. A remoção de 2,4- DNF foi 10 - 65,1%, e a remoção aumentou para as

concentrações iniciais de 2,4-DNF inferiores a 25 mg.L⁻¹. Ainda sobre o trabalho de She *et al.*, (2005) manifestaram que o 3-NP foi prontamente reduzido para os seus derivados aminados e 2,4-DNF foi parcialmente reduzido para 2-amino-4-nitrofenol ou 2,4-diaminofenol em sistema anaeróbio.

5.2.2 2º lote - Batelada contendo 3 g.L⁻¹, 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹ de glicose.

A variação na concentração de glicose apresentada nesta parte da pesquisa teve como objetivo verificar a influência do aumento do cossubstrato com a remoção do composto 2,4-DNF, tendo em vista que os resultados obtidos com 0,5 g.L⁻¹ de glicose não foram tão promissores. Para esta etapa estudou-se apenas o TR inicial e o TR final (144 h). Na Tabela 17 estão apresentados os valores dos parâmetros estudados nesta parte da pesquisa.

Tabela 17 - Variáveis utilizadas para analisar a água sintética do reator em batelada com biomassa dispersa nas concentrações de glicose de 3, 5 e 10 g.L⁻¹ nos tempos de 0 h e 144 h.

Tempo	pH		DQO (mg.L ⁻¹)		SSV (mg.L ⁻¹)		2,4-DNF (mg.L ⁻¹)	
	0 h	144 h	0 h	144 h	0 h	144 h	0 h	144 h
RC	6,9	7,5	190,7	248,6	51	51	4,2	3,8
RF	7,0	7,3	207,8	170,3	51	86	5,3	2,0
RFG3	6,9	7,2	2588,2	3132,8	67	156	5,1	1,0
RFG5	6,9	7,2	4392,2	4372,7	83	222	4,2	2,5
RFG10	6,9	7,1	8919,6	8885,6	120	244	4,6	3,5

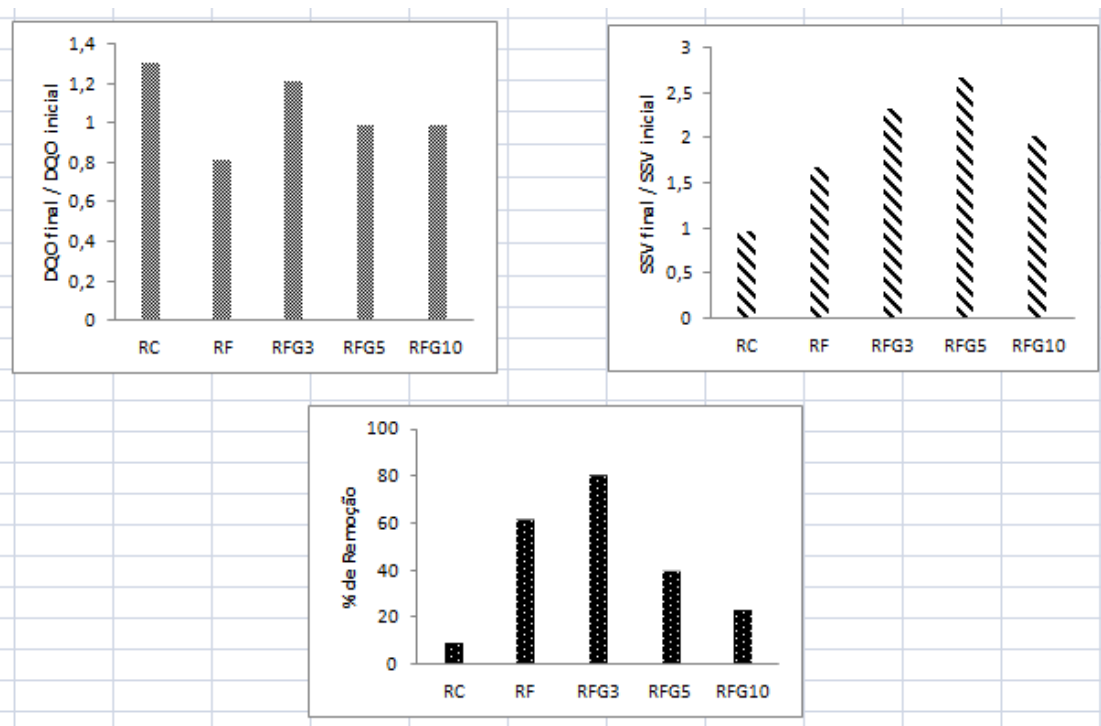
Fonte: Autor (2014).

O uso de glicose nas concentrações de 3 g.L⁻¹, 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹ não favoreceu as reduções de concentração de matéria orgânica, em termos de DQO. A melhor eficiência obtida foi no reator RF, na qual a concentração de matéria orgânica foi de 170,3 mg.L⁻¹ tendo-se obtido 18% de remoção. O RFG10 teve uma remoção de matéria orgânica de 0,38% considerada insignificante em detrimento ao encontrado no RF. Em contrapartida, ocorreu acúmulo de biomassa nos reatores RF, RFG3, RFG5, RFG10 com incremento de 40,7%, 53,3%, 62% e 50%, respectivamente na concentração de sólidos suspensos voláteis. Foi feita DQO bruta na análise, sendo este o possível motivo pelo qual a variável em questão tenha sido elevada em comparação ao SSV.

Kamath e Vaidyanathan (1990) em análise da degradação do indol pelo *Aspergillus niger* observaram que o fungo não cresceu na presença do indol, como única fonte de carbono. A presença de glicose inibiu seu crescimento, mesmo sendo adicionado cossustrato de 125 para 500 vezes em excesso comparado a quantidade de indol. Estes resultados sugeriram que indol provavelmente inibiu a absorção e utilização de glicose. Esta hipótese favorável encontrada a partir da observação de que indol foi metabolizado muito lentamente até cerca de 25 h, durante o qual tempo a glicose não foi metabolizada. Quando foram induzidas as enzimas para degradar indol notou-se um melhora na sua degradação. Também pode ser possível que o indol tenha reprimido o transporte de glicose ou inibiu as enzimas glicolíticas, causando a diminuição observada ao crescimento. Fato este que pode estar relacionado com a pesquisa em estudo, pois ocorreu um decaimento na remoção de 2,4-DNF com o aumento da concentração de glicose sendo a concentração de 3 g.L⁻¹ a ótima.

Na Figura 24 estão apresentados as relações entre DQO_{final} e DQO_{inicial}; Relação entre SSV_{final} e SSV_{inicial} e Percentual de remoção do 2,4-DNF obtidos nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 3 g.L⁻¹, 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹ de glicose.

Figura 24 – Relação entre DQO_{final} e DQO_{inicial}; Relação entre SSV_{final} e SSV_{inicial} e Percentual de remoção de 2,4-DNF obtidos nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 3 g.L⁻¹, 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹ de glicose nos tempos de 0 h e 144 h de experimento.



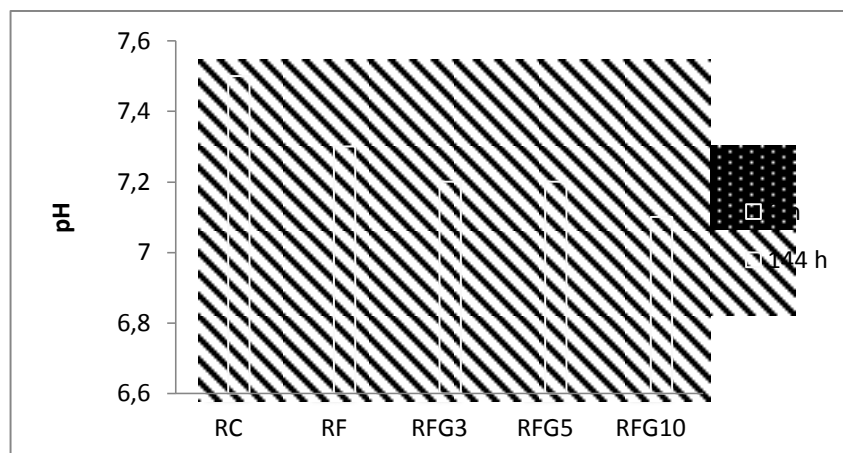
Fonte: Autor (2014).

A remoção do 2,4-DNF verificada foi, respectivamente para RC, RF, RFG3, RFG5 e RFG10, de 9,5%, 62,3%, 80,4%, 40,1% e 23,9%. Nos reatores RC e RFG10 foram alcançados os menores resultados da batelada. No reator RC já era esperado devido ausência de fungo. No reator RFG10 por conter maior quantidade de glicose, provavelmente houve inibição no crescimento fúngico. Conforme Griffin (1994) a adição de glicose em altas concentrações provavelmente reprimiria o desenvolvimento do transporte ou a fosforilação de enzimas requeridos no processo de crescimento fúngico. Em baixas concentrações de glicose a iniciação de crescimento de materiais e energia suficiente para indução da utilização de enzimas sem repressão de sua formação.

She *et al.* (2012), em análise da biodegradação do 3-NP; 2,4-DNF e 2,6-DNF por lodo em estágio aeróbio, constatou a inibição na remoção dos compostos citados com o aumento de glicose. O aumento na concentração de glicose de 320 mg.L^{-1} para 660 mg.L^{-1} levou ao aumento de K_{max} embora o aumento da concentração da glicose de 1320 para 2000 mg.L^{-1} , tinha feito com que o K_{max} diminuísse e foi ainda menor do que o valor observado com único substrato. Altas concentrações de cossustratos inibiram a degradação de 3-NP como também foi verificado nesta pesquisa.

Na Figura 25 está apresentada a variação de pH nos reatores RC, RF, RFG3, RFG5 e RFG10.

Figura 25 - Variação de pH obtido nos reatores em batelada com biomassa dispersa contendo 3 g.L^{-1} , 5 g.L^{-1} e 10 g.L^{-1} de glicose nos tempos de 0 h e 144 h de experimento.



Fonte: Autor (2014).

O pH oscilou entre 6,9 e 7,5 nas 144h de experimento, apresentando comportamento semelhante ao da batelada dispersa com glicose a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, manifestando que o aumento da concentração do cossubstrato não afetou o pH.

Os resultados conseguidos de remoção do 2,4-DNF analisados nessa batelada não apresentaram eficiência suficiente que suprissem os gastos com aumento de reagentes, no caso a glicose, portanto a pesquisa prosseguiu a fim de se obter melhores rendimentos de remoção.

5.3 Operação em Reator em Bateladas Sequenciais com Biomassa Fúngica Imobilizada.

Estudos têm mostrado que a utilização de biomassa fúngica aprisionadas em material suporte obtém melhores resultados de degradação ou remoção de poluentes alvos comparados aos de biomassa livre ou dispersa.

Os parâmetros comparados entre as bateladas com biomassa dispersa e biomassa imobilizada foram pH, DQO (mg.L^{-1}) e 2,4-DNF (%). Além dos parâmetros já relacionados, outros foram realizados como nitrito, nitrato e amônia, em (mg.L^{-1}). Nesta etapa foram realizados ciclos de 168 h (7 dias), 48 h (2 dias), 24 h (1 dia) e 8 h.

As amostras para análises feitas nos ciclos 1 e 2 foram coletadas nos tempos de reação 0, 24, 48, 72, 96 e 168 h, sendo suficiente para os ciclos 3 e 4 apenas os tempos de reação 0, 96 e 168 h.

Nos reatores com biomassa imobilizada foi verificado no TR 168 h, conforme as Tabelas 18, 19, 20 e 21, que houve redução nas concentrações de DQO em todos os ciclos, sendo possível visualizar aumento da concentração em alguns TRs. O incremento apresentado pode ter sido provocado pelo desprendimento da biomassa das espumas de poliuretano, considerado nesse TR, ocorrendo uma elevação da DQO pela presença de SSV.

Tabela 18 - Valores de pH e concentrações de DQO, nitrito, nitrato, amônia e 2,4-DNF expressos em (mg.L⁻¹) obtidos na água sintética dos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada no Ciclo 1 do TR de 168 h.

Tempo (horas)	Parâmetros analisados					
	pH	DQO (mg.L ⁻¹)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	Amônia (mg.L ⁻¹)	2,4-DNF (mg.L ⁻¹)
0	6,7	833,1	0,03	1,5	5,91	4,8
24	2,9	355,2	0,82	5,8	22,1	2,0
48	2,8	199,4	0,48	6,6	23,9	2,3
72	2,8	158,3	0,24	6,9	23,1	2,0
96	3,0	141,2	0,11	7,7	21,8	2,3
168	4,3	384,3	0,34	10,5	24,3	2,3

Fonte: Autor (2014).

Tabela 19 - Valores de pH e concentrações de DQO, nitrito, nitrato, amônia e 2,4-DNF expressos em (mg.L⁻¹) obtidos na água sintética dos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada no Ciclo 2 do TR de 168 h.

Tempo (horas)	Parâmetros analisados					
	pH	DQO (mg.L ⁻¹)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	Amônia (mg.L ⁻¹)	2,4-DNF (mg.L ⁻¹)
0	6,6	839,9	0,010	5,5	2,7	4,5
24	6,1	192,5	0,026	9,3	9,0	1,3
48	5,8	219,9	0,013	9,5	3,5	1,5
72	6,8	247,3	0,049	9,3	3,8	1,3
96	7,5	302,1	0,110	4,3	6,5	1,3
168	7,4	350,1	0,175	3,5	10,3	1,5

Fonte: Autor (2014).

Tabela 20 - Valores de pH e concentrações de DQO, nitrito, nitrato, amônia e 2,4-DNF expressos em (mg.L⁻¹) obtidos na água sintética dos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada no Ciclo 3 do TR de 168 h.

Tempo (horas)	Parâmetros analisados					
	pH	DQO (mg.L ⁻¹)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	Amônia (mg.L ⁻¹)	2,4-DNF (mg.L ⁻¹)
0	6,7	774,8	0,013	5,7	1,4	3,8
96	7,5	120,6	0,019	4,0	1,3	3,2
168	6,1	281,6	0,029	3,5	2,8	2,5

Fonte: Autor (2014).

Tabela 21 - Valores de pH e concentrações de DQO, nitrito, nitrato, amônia e 2,4- DNF expressos em (mg.L⁻¹) obtidos na água sintética dos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada no Ciclo 4 do TR de 168 h.

Tempo (horas)	Parâmetros analisados					
	pH	DQO (mg.L ⁻¹)	Nitrito (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	Amônia (mg.L ⁻¹)	2,4-DNF (mg.L ⁻¹)
0	6,8	867,3	0,01	7,7	1,2	4,3
96	7,7	100,1	0,05	3,9	1,2	0,3
168	7,2	148,0	0,01	0,01	1,0	0,3

Fonte: Autor (2014).

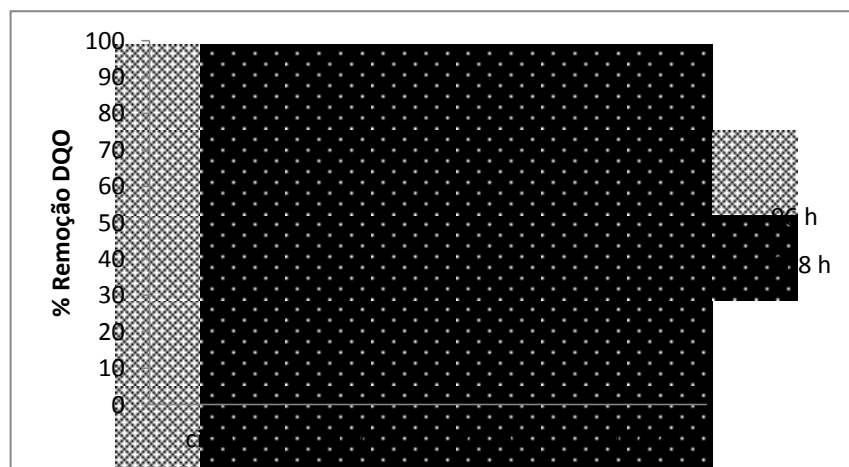
No processo aeróbio, muito sensível a certo número de parâmetros externos, tal como oxigênio dissolvido, pH, agitação e mistura características do biorreator, metais-traços, tipo de conteúdo do meio e concentração de açúcar, bem como a um número de fatores internos relacionados ao próprio fungo e em particular ao seu desenvolvimento morfológico mostraram certas diferenças características de crescimento e produção entre *Aspergillus niger* livre e imobilizado (PAPAGIANNI e MATTEY, 2004).

Mohammadi e Nasernejad (2009) averiguaram a degradação enzimática do antraceno por fungo da podridão branca *P. chrysosporium* imobilizado em bagaço de cana-de-açúcar e em células livres. Os resultados mostraram uma significativa redução na atividade enzimática do MnP em células livres, quando comparados aos das células imobilizadas após 7 dias de incubação.

No presente estudo, os parâmetros analisados mostraram uma diferença significativa quando comparados reatores de biomassa dispersa com os de biomassa imobilizada, apresentando melhores resultados de degradação de DQO e 2,4-dinitrofenol. Marinho *et al.* 2012, relataram estudos com melhoria na eficiência de degradação de compostos recalcitrantes e/ou xenobióticos por *Aspergillus niger* AN 400 em biomassa imobilizada.

Na Figura 26 estão apresentados os percentuais de remoção de DQO durante os 4 ciclos reacionais com tempos de reação de 96 h e 168 h.

Figura 26 - Percentuais de remoção de DQO obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 96 e 168 h de experimento.



Fonte: Autor (2014).

O comportamento da DQO nos ciclos 1, 2, 3 e 4 do TR de 168 h apresentou uma remoção de matéria orgânica de 54%, 58%, 64% e 83%, respectivamente, mostrando, assim, que a biomassa estava adaptando-se ao meio e melhorando as condições para a remoção. A instabilidade inicial em relação à DQO pode estar relacionada com a presença de subprodutos formados no meio, ou mesmo por substâncias excretadas pelos fungos provenientes do seu metabolismo (WANDERLEY, 2007).

Chen *et al.* (2006) investigaram sobre a resposta das características de lodos ativados na presença de 2,4-dinitrofenol (DNF), em reatores em batelada durante 3 horas. As eficiências de remoção de DQO com DNF de 2 mg.L⁻¹ e 20 mg.L⁻¹, foram de 91% e 53%, respectivamente, enquanto o valor correspondente para o controle foi de 89%. Portanto, comparado com o controle, DNF em uma concentração menor de 5 mg.L⁻¹ exibiu um efeito

estimulante sobre o substrato de degradação. Por outro lado, a inibição da DNF para o lodo ativado ocorreu quando a sua concentração foi maior do que 5 mg·L. Comparando-se os resultados obtidos pelo pesquisador citado com os desta pesquisa, observou-se que há necessidade de verificar os percentuais de remoção em menores tempos de reação, visto que os tempos utilizados foram maiores que os apresentados e as remoções obtidas encontram-se abaixo de eficiência relatada por Chen *et al.* (2006), porém pode-se que considerar o fato da pesquisa realizada por Chen *et al.* (2006) ser em lodos ativados.

Souza Neto (2012) em sua pesquisa investigou a remoção de matéria orgânica de água sintética contendo Atrazina, Deltametrina, Metil Paration e Paraquat, utilizando reatores em batelada sequencial, um com biomassa dispersa e outro com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400. Com biomassa dispersa, empregou tempos de reação de 0, 1, 3, 7, 10, 15, 20, 25 e 30 dias encontrando uma média de remoção de 37%. Já com biomassa imobilizada, os tempos de reação analisados foram de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 7 dias durante 4 ciclos. O último ciclo teve média de remoção de 73% e máxima de 92%, o que se pode estar interligado ao fato dos micro-organismos degradarem com mais eficiência estando imobilizados em meio suporte, como nesta pesquisa.

Silva *et al.* (2012) detectaram que o fungo *Aspergillus niger* AN 400 foi eficiente na remoção de matéria orgânica alcançando o percentual de remoção máximo de 71% para DQO em biomassa imobilizada, o que defende a viabilidade do tratamento de efluente sintético de laticínio na remoção dessa variável.

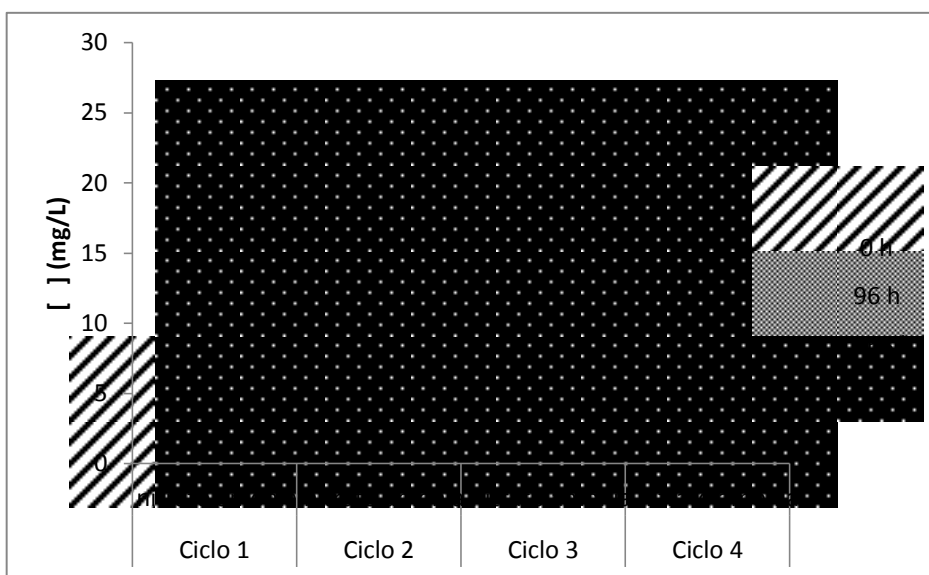
Comparando-se os resultados do tratamento desta pesquisa entre as bateladas com biomassa dispersa e imobilizada, verificou-se que a maiores remoções de matéria orgânica foram alcançadas com o segundo tipo de batelada. Segundo Sharma e Gupta (2012), imobilizar células de *Aspergillus niger* em processos em batelada tem melhor desempenho do que utilizar células livres, pois se reduz o tempo de adaptação e consequentemente o tempo de biodegradação do poluente. Conforme os autores, utilizar biomassa imobilizada melhora a estabilidade das células microbianas, permitindo à operação contínua do processo, e evita a separação líquido-biomassa.

Na Figura 27 está apresentada a variação das concentrações de Nitrato e Amônia (mg.L⁻¹) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada. O amônio (NH₄⁺) é considerado a fonte de nitrogênio preferida dos fungos e bactérias (GRIFFIN, 1994; GEISSELER *et al.*, 2010) por isso deveria ter sido consumida pelo *Aspergillus niger* AN 400 para seu crescimento e nutrição não sendo observado no ciclo 1. Foi a partir do ciclo 2, no qual o fungo já se encontrava adaptado ao meio imobilizado, que as variáveis nitrato e amônia

começaram a decair indicando o consumo, preferencialmente pelo nitrato e posteriormente a amônia.

As formas de nitrogênio inorgânico contidos em águas residuárias, seja íon amônio (NH_4^+) ou amônia (NH_3) dependem fortemente do pH. Para valores de pH menores ou iguais a 7, íon amônio é mais predominante. Para valores de pH entre 8 a 9 a amônia (NH_3) cresce de 8 para 70% e acima de pH 11 a amônia (NH_3) é dominante (SANT'ANNA JR, 2010). De acordo com o exposto, a espécie dominante nesta pesquisa foi o íon amônio (NH_4^+), em virtude do valor do pH máximo ter sido 7,6.

Figura 27 - Variação das concentrações de nitrato e amônia (mg.L^{-1}) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 0 h, 96 h e 168 h de experimento.



Fonte: Autor (2014).

Quanto aos parâmetros nitrato (NO_3^-) e amônia (NH_3) no ciclo 1 (Figura 28) houve aumento significativo das concentrações. Isso sugere que as fontes de nitrogênio foram bem superiores as necessidades de consumo do fungo, vale ressaltar que o nitrogênio no meio foi advindo do 2,4-DNF, dos nutrientes adicionados ao meio contidos na solução de Vishniac e pelo desprendimento da biomassa do material suporte observado nesta parte da pesquisa.

Magri *et al.* (2013), também verificaram o mesmo comportamento de desprendimento do biofilme do reator no processo de nitrificação utilizando conchas de ostras como material suporte. Nos primeiros dias do processo de nitrificação, os nutrientes foram necessários para a síntese celular, ou seja, as reações foram para formação e estabilização da biomassa no sistema e não para os processos oxidativos. Ainda segundo Magri *et al.* (2013), o

nitrato formado foi a partir de nitrogênio orgânico afluente que foi transformado em nitrogênio amoniacal e este entra no ciclo da nitrificação. O aumento da concentração de amônia foi proveniente do nitrogênio das células que formam o biofilme que foi desprendido. O desprendimento do biofilme favorece as taxas de transferência de oxigênio para o biofilme autotrófico elevando as taxas de nitrificação aumentando a concentração de nitratos.

Nesta pesquisa, podem-se observar as oscilações das quantidades de nitrato e amônia na batelada imobilizada. Já em Li e Kane (2008) explicaram os balanços de nitrato e amônia pelo fato de no metabolismo dos fungos haver armazenagem do excesso de nitrogênio em seus vacúolos. Sendo assim, sempre que há a necessidade de manter o equilíbrio do pH no interior das células, estas liberam para o meio amônia e H^+ , o que relaciona a concentração de nitrato no meio com a de amônia. Ainda Segundo Li e Kane (2008), há liberação de compostos nitrogenados armazenados no interior dos fungos na forma de aminoácidos para o meio sendo estes transformados diretamente a NH_4^+ , podendo justificar os baixos valores de remoções de amônia, semelhantemente ocorridas nesta parte da pesquisa.

Pode também ocorrer inibição na utilização do nitrato e amônia se o nitrito intracelular for convertido a nitrato dentro da célula (HAQ *et al.*, 2005), o que pode ter sucedido em alguns momentos nesta pesquisa, principalmente nos ciclo 1, em que ocorreu um menor consumo destas duas variáveis.

Zhao e Ward (2001) *apud* Kulkarni e Chaudhari (2007) relataram a transformação de todos os mono e di-nitroaromáticos por *P. putida* 2NP8 com produção estequiométrica de amônia, exceto 4-NP, 2,4-DNF, ácido nitro-benzóico, nitrofurano e TNT, igualmente observado nesta pesquisa, no qual os percentuais elevados de amônia e nitrato relatados na batelada imobilizada torna o balanço de massa ineficaz.

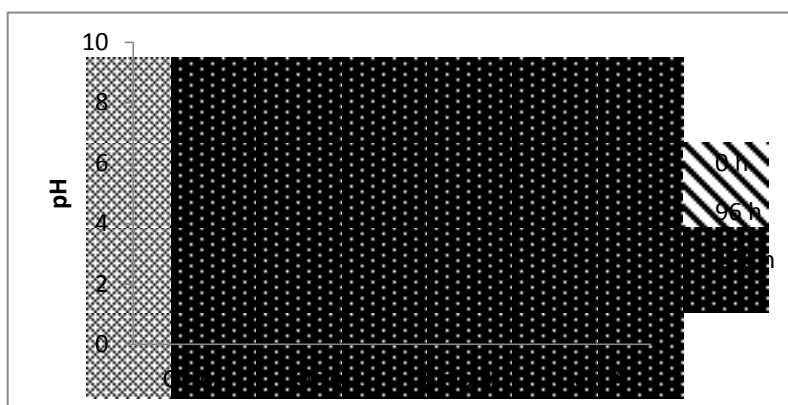
Uma diminuição no valor de pH foi apresentada no experimento (Figura 29), entretanto no intervalo entre 72 h e 168 h houve aumento. O valor de pH inicial 6,7 passando para 4,30 ao término do ciclo 1, mostraram boas condições para crescimento de *Aspergillus niger* AN 400, visto que os fungos toleram ampla faixa de pH, entre 2 e 9, sendo o pH ótimo aproximadamente de 5,6 (RODRIGUES, 2006). O decaimento verificado nos valores de pH pode ser justificado pela provável formação de ácidos orgânicos, ácido oxálico e ácido acético (KAVITHA e PALANIVELU, 2005) pelo fungo *Aspergillus niger* AN 400, como também pela produção de N-amoniacal (NH_4^+), que libera H^+ para o meio tornando-o ácido.

Para Nakano *et al.* (2004), o caminho da degradação fotocatalítica do 2,4-DNF é realizada da seguinte forma: primeiro é formado NO_2^- (nitrito) a partir do 2,4-DNF, em seguida NO_3^- (nitrato ou N-oxidado) e NH_4^+ (N-amoniacal) são formados consecutivamente e

as taxas de reação para cada componente foram postuladas para obedecer a uma lei de velocidade de primeira ordem. Segundo Sangtewan e Schmidt (2002) *apud* Marinho *et al.* (2012), a assimilação de amônia e nitrato pelos fungos ocorre em velocidades distintas, como no caso do *Aspergillus niger*.

Com relação ao pH, na Figura 28 está apresentada a variação deste parâmetro nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada.

Figura 28 - Variação do pH obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 0 h, 96 h e 168 h de experimento.



Fonte: Autor (2014).

De forma geral, analisando os valores de pH, amônia e nitrato, constata-se a relação direta entre esses parâmetros. Ao final de cada ciclo temos as seguintes correlações: No ciclo 1 o pH é igual a 4,3, houve produção tanto de íon amônio (75,7%) quanto de nitrato (85,7%), revelando que o fungo não utilizando nitrogênio como fonte de energia; No ciclo 2 para valor de pH igual a 7,4 temos consumo do nitrato (36,4%) e produção de íon amônio (73,8%), ciclo 3 obteve comportamento similar ao ciclo 2, consumo do nitrato (38,6%) e produção de íon amônio (50%) nestes casos, revelou-se a preferência do *Aspergillus niger* AN 400 ao nitrato; No ciclo 4 quando o pH é 7,2 houve consumo de nitrato (99,9%) e íon amônio (57%), revelando que o fungo estava adaptado ao meio.

Comparando-se os valores de pH entre as duas bateladas, dispersa e imobilizada, verificou-se que ambos tiveram oscilações diferentes de pH. Provavelmente, o sistema de aeração induziu, de forma mais acelerada, a oxidação do nitrogênio presente no meio elevando ou baixando o pH.

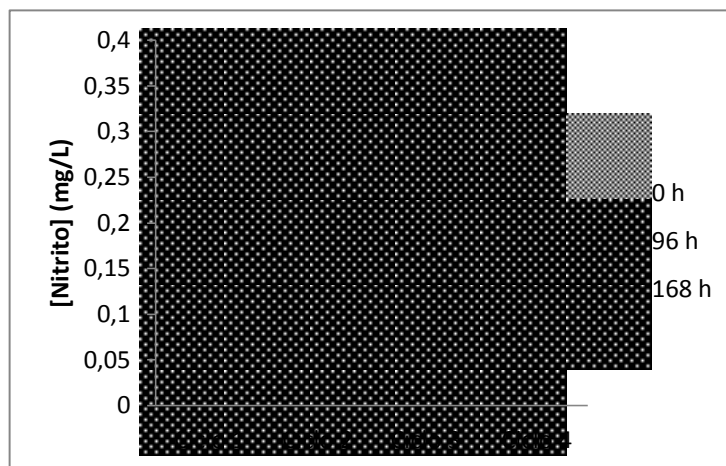
Com relação ainda ao pH, Wang *et al.* (2010), investigaram o efeito deste parâmetro na degradação de 2,4-DNF por processos oxidativos avançados que modificando o pH inicial da solução de 2,4-DNF entre 2,5 e 7,3 verificaram que a remoção de 2,4-DNF

diminuiu com o aumento do valor de pH 2,5 para 7,3. A degradação máxima de 2,4-DNF foi observada dentro de 70 min a pH 2,5, sendo este o pH ótimo. Isto pode ser atribuído a degradação de 2,4-DNF em ácidos orgânicos, como os rendimentos de degradação, levando a uma queda de pH da solução e, por conseguinte, uma aceleração do processo de remoção. Desta forma o pH é um parâmetro importante em reações photo-Fenton heterogêneos e processos biológicos. De acordo com o pH do meio, pode-se sugerir a características dos produtos formados da degradação.

Lu *et al.* (2009) pesquisaram a remoção de compostos fenólicos de coque em águas residuais com biomassa imobilizada com fungo da podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium*, e analisaram os efeitos do pH nos valores entre 3 e 9 a 30°C durante 3 dias. A taxa de remoção do fenol aumentou nos valores de pH variando entre 3 e 5 e, em seguida, diminuiu drasticamente com o aumento do pH, sendo a taxa máxima de remoção de compostos fenólicos de 84,88%. Este resultado sugeriu que o pH variando entre 4 e 6, o pH ótimo com valor 5 é adequado para a biodegradação do fungo da podridão branca. Estudos mostraram que valores de pH ótimos para o crescimento, enzimas secretoras e biodegradação do fungo da podridão branca são entre 3,5 a 5,5, sendo o valor 4,5 ótimo. Igualmente ocorrido nesta parte da pesquisa em que os resultados apresentaram variação de pH entre 2,8 e 7,7 apresentando os maiores percentuais de remoção, principalmente no ciclo 4 que mostrou 94,1% de remoção do 2,4-DNF com pH 7,2, podendo ser atribuído à imobilização fúngica na qual os fungos possuem maior habilidade de secretar enzimas e forte capacidade de adsorção.

Na figura 29 estão apresentando os valores de nitrito em mg.L^{-1} nos ciclos 1, 2, 3 e 4 nos TR de 96 h e 168 h.

Figura 29 - Variação da concentração de nitrito (mg.L^{-1}) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 0 h, 96 h e 168 h de experimento.



Fonte: Autor (2013).

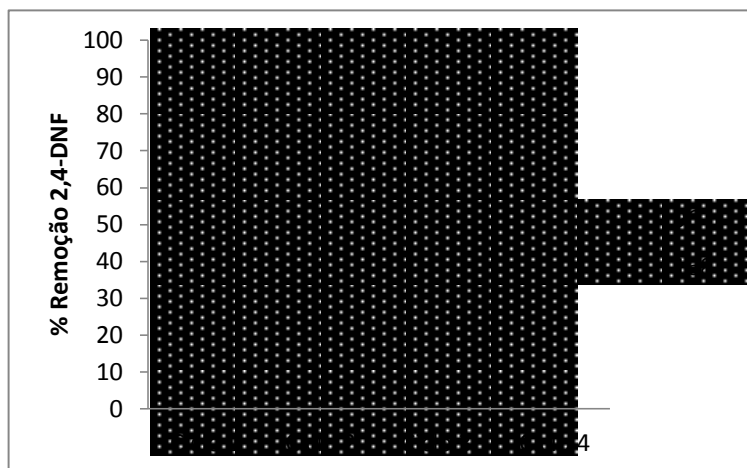
Nos 4 ciclos, as concentrações de nitrito liberados durante a degradação do 2,4-DNF foram baixas enquanto que as concentrações de nitrato na solução foi alto indicando que ocorreu oxidação do nitrito permanecendo este em menor concentração no meio.

O nitrato inorgânico é uma excelente fonte utilizável por muitos fungos filamentosos. Seu transporte para o meio intracelular é mediado pela permease do nitrato, e após sua assimilação, ocorre a redução sequencial do nitrato a nitrito e do nitrito a amônio catalisada respectivamente, pelas enzimas nitrato e nitrito redutase (GRIFFIN, 1994), como evidenciado nesta pesquisa em que as concentrações de nitrito foram pequenas, provavelmente, devido as grandes concentrações de nitrato e amônio no meio.

Gemini *et al.* (2007) afirmaram que o processo de remoção biológica do 2,4-DNF é complexo. Foi descrito que quando grupos nitros, elétrons-retirantes de elétrons, estão presentes como substituintes em anéis aromáticos, não são fáceis sofrer ataque das oxigenases, que pelo contrário é frequentemente observado em xenobióticos aromáticos como *o*-nitrofenol e *p*-nitrofenol. Desta forma a redução inicial dos sistemas aromáticos é provável ser biológica e não por ataque oxidativo. *Rhodococcus opacus* degradou 0,27 mM de 2,4-DNF em mais de 99,5% em 22h.

Na Figura 30 está representado o percentual de remoção do 2,4-DNF nos reatores em bateladas com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 96 h e 168h.

Figura 30 – Percentual de remoção de 2,4-DNF nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 96 h e 168 h de experimento.



Fonte: Autor (2013)

Nos ciclos 1 e 2 a batelada imobilizada demonstrou que as taxas de remoções mais altas do 2,4-DNF ocorreram nas primeiras 24 h (Tabelas 18 e 19), alcançando respectivamente 47,4% e 66,7%. O valor de pH para o ciclo 1 nas 24 h foi de 2,9 e no ciclo 2 o valor foi de 6,1. Nos ciclos 3 e 4, em que os tempos de reações analisados foram apenas de 96 e 168 h houve remoção do 2,4-DNF, de 33,4% e 94,1%, respectivamente indicando uma maior eficiência quando comparado ao reator em batelada com inóculo fúngico disperso de 23,5% às 144 h, tempo este próximo ao de 168 h. Como já foi citado, a utilização de biomassa imobilizada melhora o desempenho do reator, inclusive na degradação do 2,4-DNF.

No presente estudo não foi detectado nem quantificado os metabólitos prováveis da degradação do 2,4-DNF, podendo ter ocorrido uma provável mudança mecanística com formação de novos produtos, condensados ou mais recalcitrantes, que eventualmente são também mais nitrogenados, embora seja possível a redução de grupos nitros para hidroxilamino ou aminos derivados (Perchet *et al.*, 2006). 2-amino-4-nitrofenol (2-ANP) é conhecido como produto de degradação do 2,4-DNF (HIROOKA *et al.*, 2006; KARIM e GUPTA (2006); ARORA *et al.*, 2014), um potente agente mutagênico e também necessário ser removido de efluentes industriais (HIROOKA *et al.*, 2006).

Kavitha e Palanivelu (2005), em seu trabalho sobre degradação do 2,4-DNF por processos Fenton e foto-Fenton monitoraram ácidos alifáticos de baixo peso molecular, como os ácidos oxálico e ácido acético. Os ácidos acéticos e oxálicos acumularam-se no sistema chegando ao valor de pH 2 - 4. Nesta pesquisa os valores de pH no Ciclo 1 também variaram

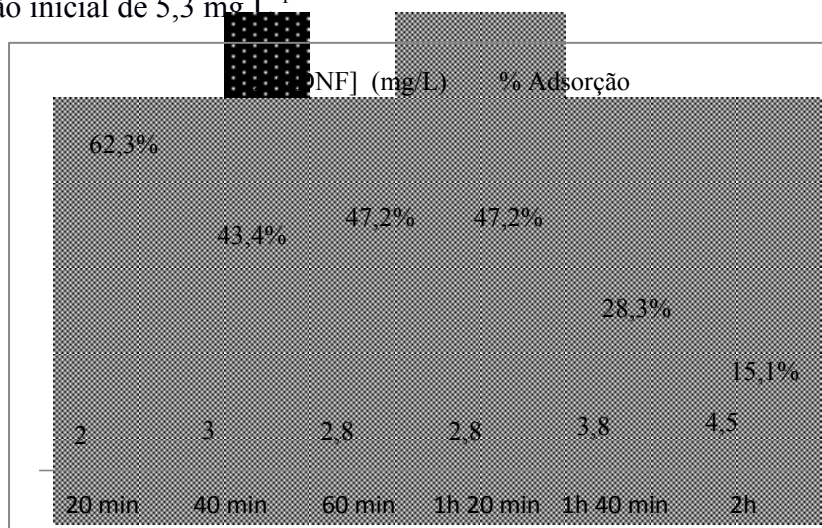
entre 2 e 4 sugerindo a presença desses ácidos no meio, apesar dos processos de tratamento serem distintos.

O decaimento da concentração do 2,4-DNF observado nos reatores em bateladas com biomassa dispersa e imobilizada não pode ser associado à foto decomposição, pois todos os reatores, durante o processo, foram cobertos com intuito de protegê-los da luz.

Na Figura 31 está apresentada a eficiência de adsorção da espuma de poliuretano ao 2,4-dinitrofenol na qual a solução do reator apresentou concentração inicial do poluente alvo de $5,3 \text{ mg.L}^{-1}$.

O ensaio de adsorção foi efetuado sem adição do fungo *Aspergillus niger* AN 400 no reator e, portanto, obtido sem interferência do fator biológico e foi importante como ferramenta para comprovar que a remoção do 2,4-dinitrofenol decorreu da ação dos micro-organismos presentes no reator e não da adsorção do meio suporte.

Figura 31 – Teste de adsorção realizado em espumas de poliuretano e 2,4-DNF com concentração inicial de $5,3 \text{ mg.L}^{-1}$



Fonte: Autor (2014).

A capacidade de adsorção na espuma de poliuretano revelou que o material adsorveu 62,3% do 2,4-DNF nos 20 min iniciais do teste e logo após mostrou decaimento na adsorção mostrando uma saturação ao material permanecendo a concentração praticamente constante, chegando ao final com apenas 15% de adsorção.

Chacara *et al.* (2010) avaliaram a habilidade de MgAl - hidróxidos duplos lamelares (LDHs) e seus produtos calcinados para adsorver contaminantes 2,4-dinitrofenol e 2-metil-4,6-dinitrofenol de água. Segundo os autores esses adsorventes são eficientes para remoção do 2,4-DNF em água e que a capacidade de adsorção é provavelmente limitada pela

solubilidade dos contaminantes. A adsorção de fenóis é potencialmente influenciado por fenômenos tais como o transporte do soluto (adsorvido) sobre a superfície externa do adsorvente, a difusão de soluto nos poros do adsorvente e a adsorção de soluto nas superfícies internas dos poros e espaços capilares.

Nesta pesquisa o adsorvente não foi responsável pela remoção do 2,4-DNF. O resultado do teste de adsorção realizado comprovou que os agentes que promoveram a remoção do 2,4-DNF foram os micro-organismos e que o meio suporte serviu apenas como meio de sustentação para o fungo.

Os resultados apresentados a seguir referem-se aos tempos de reação (TR) de 48 h, 24 h e 8 h. Nas Tabelas 22, 23, 24, 25 e 26 estão apresentadas as variações das concentrações de DQO, nitrato, amônia, nitrito e 2,4-DNF nos ciclos de 1 a 4.

Tabela 22 - Variação de concentrações de DQO (mg.L^{-1}) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nas 48, 24 e 8 h de experimento.

Tempo (h)	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4	
	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída
48 h	795,3	141,2	726,8	141,2	819,3	113	785,1	113,8
24 h	754,2	798,6	802,2	2439,3	761,1	182,3	781,6	165,1
8 h	713,1	514,6	747,7	577,6	747,7	530,4	741,4	527,2

Fonte: Autor (2014).

Tabela 23 - Variação das concentrações de nitrato (mg.L^{-1}) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nas 48, 24 e 8 h de experimento.

Tempo (h)	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4	
	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída
48	5,88	0,03	4,48	0,01	5,21	0,02	4,67	0,02
24	5,14	2,21	6,31	3,3	4,02	*	4,95	*
8	4,87	2,01	5,79	1,62	5,77	1,43	7,51	1,58

Fonte: Autor (2014).

* valor desprezível

Tabela 24 - Variação das concentrações de amônia (mg.L^{-1}) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nas 48, 24 e 8 h de experimento.

Tempo (h)	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4	
	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída
48	1,01	4,58	0,88	0,18	0,88	0,18	3,24	0,41
24	1,66	0,61	0,56	0,81	1,78	0,14	0,88	0,58
8	2	1,42	1,7	2	1,41	1,31	1,13	0,68

Fonte: Autor (2014).

Tabela 25 - Variação das concentrações de nitrito (mg.L^{-1}) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nas 48, 24 e 8 h de experimento.

Tempo (h)	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4	
	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída
48	0,06	0,52	*	0,11	0,03	0,05	*	0,15
24	*	1,56	*	0,82	0,02	0,03	0,02	0,03
8	*	13,5	*	13,6	*	8,22	*	*

Fonte: Autor (2014).

* valor desprezível

Tabela 26 - Variação das concentrações de 2,4-dinitrofenol (mg.L^{-1}) obtido nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nas 48, 24 e 8 h de experimento.

Tempo (h)	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4	
	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída
48	5,05	0,13	5,05	0,25	5,05	0,05	5,05	0,252
24	5,05	2,52	5,05	2,27	5,05	3,03	5,05	1,26
8	5,05	2,02	5,05	2,27	5,05	2,02	5,05	1,77

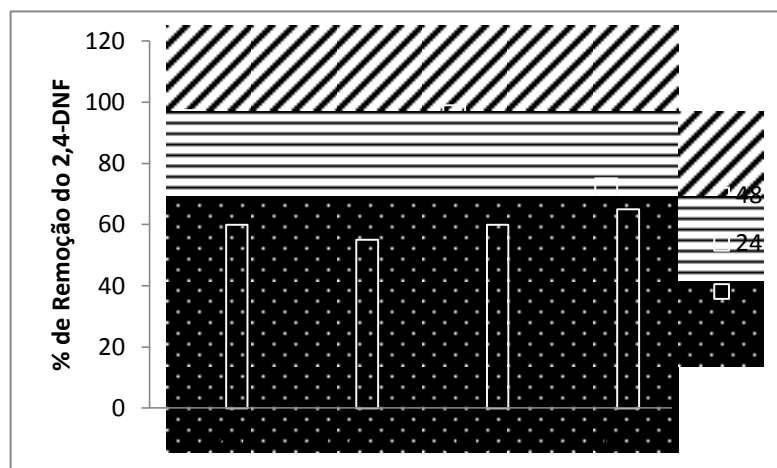
Fonte: Autor (2014).

Comparando as concentrações das variáveis em todos os TR, verificou-se que o tempo de 48 h foi aquele que propiciou o melhor desempenho ao fungo para a remoção de 2,4-DNF. Em contrapartida, o aumento do TR de 48 h para 168 h não proporcionou melhores

resultados, ainda que, o tempo de contato entre a água sintética e micro-organismo tenha sido bem maior.

Na Figura 32 estão apresentados os percentuais de remoção do 2,4-DNF para os TR de 48 h, 24 h e 8 h.

Figura 32 - Percentual de remoção de 2,4-DNF nos reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada durante os 4 ciclos reacionais nos tempos de 48, 24 e 8 h de experimento.



Fonte: Autor (2014).

Comparando os percentuais de remoção do 2,4-DNF nos TR de 8, 24 e 48 h, verificou-se que o tempo de 48 h foi aquele que propiciou o melhor desempenho ao fungo para a remoção de 2,4-DNF. Em contrapartida, o aumento do TR de 48 h para 168 h não propiciou os melhores resultados, ainda que, o tempo de contato entre a água sintética e micro-organismo tenha sido maior.

Santaella *et al.* (2009) avaliaram a influência do TDH em reatores com *Aspergillus niger* no tratamento de efluentes de refinaria de petróleo, obtiveram remoção média de 28, 83 e 88%, para TDH de 4h, 8h e 12h, respectivamente, na presença de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ glicose. No entanto nos dias posteriores, os valores médios de remoção alteraram para $40\% \pm 8$, $46\% \pm 8$ e $49\% \pm 10$, para 4h, 8h e 12h, respectivamente, sem a adição de glicose. Como não foi conseguido valores médios de remoção de fenóis expressivos, o TDH de 4h apresentou resultado satisfatório com remoção média de 40%, diferentemente desta pesquisa que para o *Aspergillus niger* degradar o 2,4-DNF foi necessário 48 h de reação.

Marinho *et al.* (2012) estudaram a variação do tempo de detenção hidráulica no pós-tratamento de efluente de filtro anaeróbio usado na remoção de corante têxtil de despejo

sintético por uso de reator biológico com fungos e verificaram que durante o TDH de 6 h, o valor de remoção de corante ficou próximo de 74%, mas que o aumento do TDH de 6 h para 8 h não proporcionou melhora na remoção do corante, provavelmente justificado pela quantidade maior de compostos excretados pelos fungos devido ao maior tempo de contato, resultando na diminuição da remoção de matéria orgânica e do corante. O mesmo foi verificado nesta pesquisa quando se observou um melhor desempenho no TR de 48 h em relação ao de 168 h, já que houve uma resposta de remoção de 2,4-DNF maior.

No presente trabalho o melhor TR para remoção das variáveis em questão foi o de 48 h. Os percentuais de remoção de DQO, 2,4-DNF, nitrato e amônia alcançados foi de 86,2%, 99%, 99% e 87,3%, valores estes conseguidos entre os ciclos 3 e 4. Esses resultados indicam ser o uso de fungos em reatores uma tecnologia promissora para aplicação em tratamentos efluentes e a busca pelo menor TR irá se refletir em menor custo para implantação do tratamento, devendo ser ressaltada a importância de mais estudos nessa área.

Apesar de a presente pesquisa preocupar-se com o maior percentual de remoção das variáveis na água dopada com 2,4-DNF, é preciso também relacionar os valores finais com os da legislação a fim de verificar a eficácia do tratamento, e da necessidade ou não de pós-tratamento para lançamento ao corpo receptor.

Em relação ao que estabelece a Portaria SEMACE nº 154 de 2002 para o lançamento de efluentes, nos reatores com biomassa dispersa e glicose $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, apenas o RF atende ao valor máximo de 200 g.L^{-1} de DQO, o efluente deste reator apresentou uma concentração final de 109 mg.L^{-1} , enquanto que o RFG resultou em 474 mg.L^{-1} . Nos reatores com biomassa dispersa e glicose com 3 g.L^{-1} , 5 g.L^{-1} , 10 g.L^{-1} , atingiu no final do tratamento valores bem acima de 200 mg.L^{-1} , não atendendo à legislação. Já os reatores com biomassa imobilizada, nos tempos de reação 168 h, 48 h e 24 h, alcançaram 148 mg.L^{-1} , 113 mg.L^{-1} e 165 mg.L^{-1} , respectivamente, enquanto que no TR de 8 h foi 514 mg.L^{-1} .

No reator em batelada imobilizada, o TR de 168 h apresentou as maiores concentrações de nitrato e amônia de toda pesquisa. As concentrações atingidas de amônia ao final do tratamento foram de $24,3 \text{ mg.L}^{-1}$ para 168 h, $0,41 \text{ mg.L}^{-1}$ para 48 h, $0,58 \text{ mg.L}^{-1}$ para 24 h e $0,68 \text{ mg.L}^{-1}$ para 8 h. Esses valores, exceto para o de 168 h, estão de acordo com o estabelecido na Resolução CONAMA no. 430 de 2011 a qual define como valor máximo de 20 mg.L^{-1} , para lançamento de efluentes em corpo receptor. Para padrões de qualidade de água para consumo, que também é definida por essa legislação como valor máximo de nitrato, a $\text{pH} \leq 7,5$; $3,7 \text{ mg.L}^{-1} \text{ N}$ o reator que operou no tempo de 168 h não se enquadrou.

6. CONCLUSÕES

A presente pesquisa se mostrou eficiente na remoção do 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF) pelo reator em batelada sequencial, obtendo valor mínimo de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$, atendendo à Resolução CONAMA, que define este parâmetro com valor máximo de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, portanto promissora para aplicabilidade de degradação de tóxicos persistentes.

O fungo *Aspergillus niger* AN 400 durante o teste de toxicidade em placas contendo a substância 2,4-DNF nas concentrações de 300 mg.L^{-1} , 200 mg.L^{-1} , 100 mg.L^{-1} , 90 mg.L^{-1} , 80 mg.L^{-1} , 50 mg.L^{-1} , 40 mg.L^{-1} , 20 mg.L^{-1} , 10 mg.L^{-1} , 5 mg.L^{-1} e 0 mg.L^{-1} , mostrou-se capaz de crescer contradizendo a hipótese de Griffin (1994) que refere-se a esta substância como sendo um fungicida;

A concentração de glicose mais eficiente encontrada quando se utilizou reator em batelada com biomassa dispersa foi de 3 g.L^{-1} (RFG3) sendo 80,4% o percentual de remoção do 2,4-DNF. Os testes realizados com concentração de glicose de 5 g.L^{-1} e 10 g.L^{-1} (RFG5 e RFG10) apresentaram remoção de 40% e 23,9%, respectivamente, apresentando decaimento de remoção com o aumento da glicose. Por conseguinte, o aumento na concentração de glicose não implica, necessariamente, em um aumento na eficiência de remoção do 2,4-DNF pelo fungo *Aspergillus niger* AN 400.

A realização do tratamento de água sintética com 2,4-dinitrofenol para degradação do 2,4-dinitrofenol em reatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada por *Aspergillus niger* AN 400 foi eficiente de forma que foi registrado 93,1% de remoção, utilizando $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose como cossubstrato em um período de 168 h.

A degradação do 2,4-dinitrofenol se mostrou mais eficiente quando se usou o reator em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada do que em bateladas com biomassa dispersa. Para uma concentração de 5 mg.L^{-1} de 2,4-dinitrofenol, nas mesmas condições de temperatura e pressão obteve-se os percentuais de remoção final do 2,4-DNF, analisados no CLAE, para os reatores em batelada imobilizada com inóculo fúngico nos ciclos 1, 2, 3 e 4 foram de 52,1%, 66,7%, 34,2% e 93,1%, respectivamente, indicando uma maior eficiência se comparado ao reator em batelada com inóculo fúngico disperso de 23,54%.

O melhor tempo de remoção para degradação do 2,4-DNF com biomassa fúngica imobilizada em cubos de poliuretano, foi 48 h. Os percentuais de remoção de DQO, 2,4-DNF, nitrato e amônia alcançados neste tempo foram de 86,2%, 99%, 99% e 87,3%.

As concentrações finais encontradas nesta pesquisa de DQO, nitrito, nitrato, amônia e 2,4-DNF, para o TR mais eficiente, 48 h (Ciclo 1) está abaixo dos limites estabelecidos no que se refere aos padrões de lançamento descritos pela Resolução CONAMA nº. 430 de 2011 e a Portaria SEMACE no. 154 de 2002.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade do tema desenvolvido neste trabalho são sugeridos os seguintes estudos ou investigações:

- Identificar os metabólitos formados da biodegradação do 2,4-dinitrofenol.
- Realizar experimento em reatores de fluxo contínuo.
- Utilizar efluentes *in natura* contendo 2,4-dinitrofenol.
- Verificar a atividade enzimática do fungo *Aspergillus niger* AN 400 na presença de 2,4-DNF.

REFERÊNCIAS

- ADDORISIO, V.; SANNINO, F.; MATEOA, C.; GUISANA, J. M. **Oxidation of phenyl compounds using strongly stable immobilized-stabilized laccase from *Trametes versicolor***. Process Biochemistry, v. 48, p. 1174-1180, 2013.
- AGRA, C. A. **Tratamento de águas residuárias domésticas em reatores de biomassa dispersa e biomassa aderida**. 2009. 90f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2009.
- ALEXIEVA, Z.; GERGINOVA, M.; ZLATEVA, P.; MANASIEV, J.; IVANOVA, D.; DIMOVA, N. **Monitoring of aromatic pollutants biodegradation**. Biochemical Engineering Journal, v. 40, p. 233-240, 2008.
- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. **Química Orgânica**. Editora Guanabara, 2ª ed., Rio de Janeiro, 1978.
- ANDRADE, M. V. F. **Biodegradação de corante têxtil por uso de reator biológico em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium***. 109f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Fortaleza, Ceará. 2013.
- ANDRADE, M. V. F.; SILVA, K. M. L.; SIQUEIRA, J. P. S.; WANDERLEY, C. R. P.; ARAÚJO, R. S.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. **Azo dye degradation by *Phanerochaete chrysosporium* in the medium enriched with nitrogen in the presence of primary co-substrate**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 56, 5, p. 867-874, 2013.
- BAGAL, M.V. ; LELE, B.J. ; GOGATE, P.R. **Removal of 2,4-dinitrophenol using hybrid methods based on ultrasound at an operating capacity of 7 L**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 20, p. 1217-1225, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE – MS. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html> Acessado em: 03 fev. 2014.
- CAO, X.; ODA, Y.; SHIRAISHI, F. **Photocatalytic and adsorptive treatment of 2,4-dinitrophenol using a TiO₂ film covering activated carbon surface**. Chemical Engineering Journal, v. 156, p. 98-105, 2010.
- CEARÁ. SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE – SEMACE. **Portaria no. 154 de 22 de julho de 2002**. Disponível em:
<http://antigo.semace.ce.gov.br/integracao/biblioteca/legislacao/conteudo_legislacao.asp?cd=95> Acessado em: 03 fev. 2014.
- CENTRODEARTIGOS.COM . **A dieta de Quatro – dinitrofenol**, 2013. Disponível em:
<<http://centrodeartigos.com/emagrecimento/artigo-4602.html>> Acesso em 25/10/2013.

CETESB - **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/causas_contaminantes_fenol.php> Acesso em 21/10/2013.

CHAND, R.; SHIRAISHI, F. **Reaction mechanism of photocatalytic decomposition of 2,4-dinitrophenol in aqueous suspension of TiO₂ fine particles**. Chemical Engineering Journal, v. 233, p. 369-376, 2013.

CHEN, G.-W.; YU, H.-Q.; XI, P.-G. **Influence of 2,4-dinitrophenol on the characteristics of activated sludge in batch reactors**. Bioresources Technology, v. 98, p. 729-733, 2006.

CHEN, G.-W.; YU, H.-Q.; XI, P.-G.; XU, D.-Q. **Modeling the yield of a activated sludge in the presence of 2,4-dinitrofenol**. Biochemical Engineering Journal, v. 40, p. 150-156, 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Resolução no. 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acessado em 03 fev. 2014.

COULIBALY, B.; GOURENE, G.; AGATHOS, N. S. **Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters: Review**. African Journal of Biotechnology, v. 12, p. 620 - 630, 2003.

COUTO, S. R. **Dye removal by immobilized fungi**. Biotechnology Advances, v. 27, p 227 - 235, 2009.

EL-NAAS, M. H.; AL-ZUHAIR, S.; MAKHLOUF, S. **Continuous biodegradation of phenol in a spouted bed bioreactor (SBBR)**. Chemical Engineering Journal, v. 160, p. 565-570, 2010.

ESAWY, M. A.; GAMAL, A. A.; KAMEL, Z.; ISMAIL, A-M. S.; ABDEL-FATTAH, A. F. **Evaluation of free and immobilized *Aspergillus niger* NRC1ami pectinase applicable in industrial processes**. Carbohydrate Polymers, v. 92, p. 1463-1469, 2013.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Revisada e ampliada. Caxias do Sul, EDUCS, 2010.

FAN, C.; TSUI, L.; LIAO, M-C. **Parathion degradation and its intermediate formation by Fenton process in neutral environment**. Chemosphere, v. 82, p. 229-236, 2011.

FARKAS, V.; FELINGER, A.; HEGEDÜSOVA, A.; DÉKÁNY, I.; PERNYESZI, T. **Comparative study of the kinetics and equilibrium of phenol biosorption on immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solution**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 103, p. 381-390, 2013.

FERNÁNDEZ, I.; SUÁREZ-OJEDA, M. E., PÉREZ, J.; CARRERA, J. **Aerobic biodegradation of a mixture of monosubstituted phenols in a sequencing batch reactor**. Journal of Hazardous Materials, v. 260, p. 563-568, 2013.

FLORES, E. R. **Biotransformation and biodegradation of n-substituted aromatics in methanogenic**. Thesis Landbouw Universiteit Wageningen, 1997.

GABIATTI, N. C. **Seleção de microrganismos para a conversão de amônio em nitrito e eliminação de nitrogênio de efluente sintético**. 2010. 154f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

GEISSELER, D.; HORWATH, W. R.; JOERGENSEN, R.G.; LUDWIG, B. **Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review**. Soil Biology & Biochemistry, v. 42, p. 2058 -2067, 2010.

GEMINI, V.L.; GALLEGGO, A.; OLIVEIRA, V. M.; GOMEZ, C.E.; MANFIO, G.P., KOROL, S.E. **Biodegradation and detoxification of p-nitrophenol by *Rhodococcus wratislaviensis***. International Biodeterioration e Biodegradation, v. 55, p. 103-108, 2005.

GEMINI, V.L.; GALLEGGO, A.; TRIPODI, V.; CORACH, D.; PLANES, E.I.; KOROL, S.E. **Microbial degradation and detoxification of 2,4-dinitrophenol in aerobic and anoxic processes**. International Biodeterioration e Biodegradation, v. 60, p. 226-230, 2007.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2 ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

GUPTA, S.K.; KARIM, K. **Effect of shock and mixed nitrophenolic loadings on the performance of UASB reactors**. Water Research, v. 40, p. 935 - 942, 2006.

HAQ, I. U.; ALI, S.; QADEER, M. A.; IQBAL, J. **Optimization of nitrogen for enhanced citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* NGd-280**. Bioresource Technology, v. 96, n. 5, p.645-6648, 2005.

(HANS) VAN LEEUWEN, J. H.; RASMUSSEN, M. L.; SANKARAN, S.; KOZA, C. R.; ERICKSON, D. T.; MITRA, D.; JIN, BO. **Fungal Treatment of Crop Processing Wastewaters with Value-Added Co-Products**. Sustainable Bioenergy and Bioproducts, p. 13-44, 2012.

HERNÁNDEZ, M. M.; CARRERA, J.; SUÁREZ-OJEDA, M. E. **Enrichment of a K-strategist microbial population able to biodegrade p-nitrophenol in a sequencing batch reactor**. Water Research, v. 43, p. 3871-3883, 2009.

HIROOKA, T.; NAGASE, H.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K. **Degradation of 2,4-dinitrophenol by mixed culture of photoautotrophic microorganisms**. Biochemical Engineering Journal, v. 29, p. 157-162, 2006.

HVALA, N.; ALLER, F.; MITEVA, T.; KUKANJA, D. **Modelling, simulation and control of an industrial, semi-batch, emulsion-polymerization reactor**. Computers and Chemical Engineering, v. 35, p. 2066-2080, 2011.

KAMATH, A. J.; VAIDYANATHAN, C. S. **New pathway for the biodegradation of indole in *Aspergillus niger***. American Society for Microbiology, v. 56, nº 1, p. 275-280, 1990.

KARIM, K.; GUPTA, S.K. **Effect of shock and mixed nitrophenolic loadings on the performance of UASB reactors**. Water Research, v. 40, p. 935 – 942, 2006.

KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. 1ª edition. New York: Wiley, 293p, 2005.

KAVITHA, V.; PALANIVELU, K. **Degradation of nitrophenols by Fenton and photo-Fenton processes.** Journal of Photochemistry and Photobiology, v. 170, p. 83-95, 2005.

KOTZ, J. C.; TREICHEL JR., P. **Química e Reações Químicas.** 4^a ed. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., v. 2, 2002.

KRISTANTI, R. A.; KANBE, M.; TOYAMA, T.; TANAKA, Y.; TANG, Y.; WU, X.; MORI, K. **Accelerated biodegradation of nitrophenols in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*.** Journal of Environmental Sciences, v. 24, p. 800-807, 2012.

KULKARNI, M; CHAUDHARI, A. **Biodegradation of *p*-nitrophenol by *P. putida*.** Bioresource Technology, v. 97, p. 982-988, 2006.

KULKARNI, M; CHAUDHARI, A. **Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview.** Journal of Environmental Management, v. 85, p. 496-512, 2007.

KULKARNI, P. **Nitrophenol removal by simultaneous nitrification denitrification (SND) using *T. pantotropha* in sequencing batch reactors (RSB).** Bioresource Technology, v. 128, p. 273-280, 2013.

KYRIACOU, A.; LASARIDI, K. E.; KOTSOU, M.; BALIS, C.; PILIDIS, G. **Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive processing wastewater.** Process Biochemistry, v. 40, n. 3-4, p. 1401-1408, 2005.

LE LANN, M. V.; CABASSUD, M.; CASAMATTA, G. **Modeling, optimization and control of batch chemical reactors in fine chemical production.** Annual Reviews in Control, v. 23, 25- 34, 1999.

LI, S. C.; KANE, P. M. **The yeast lysosome-like vacuole: Endpoint and crossroads of vacuoles.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research, v.1793, p. 650-663, 2009.

LIN, H-Y.; YU, C-P.; CHEN, Z-L. **Aerobic and anaerobic biodegradation of TNT by newly isolated *Bacillus mycoides*.** Ecological Engineering, v. 52, p. 270-277, 2013.

LIU, X-Y.; WANG, B-J.; JIANG, C-Y.; ZHAO, K-X.; DRAKE, H.L.; LIU, S-J. **Simultaneous biodegradation of nitrogen-containing aromatic compounds in a sequencing batch bioreactor.** Journal of Environmental Sciences, v. 19, p. 530-535, 2007.

LOPES, M. S. S.; OLIVEIRA, P. C. C.; ARAÚJO, R. S.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. **Remoção de macronutrientes de efluente da indústria de castanha de caju por uso de reator aeróbio em batelada com inóculo fúngico.** Engenharia Sanitária Ambiental, v. 16, n. 1, p. 17-26, 2011.

LU, C.; CAO, L.; LIU, R.; LEI, Y.; DING, G. **Effect of common metal ions on the rate of degradation of 4-nitrophenol by a laccase-Cu²⁺ synergistic system.** Journal of Environmental Management, v. 113, p. 1-6, 2012.

LU, Y.; YAN, L.; WANG, Y.; ZHOU, S.; FU, J.; ZHANG, J. **Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium***. Journal of Hazardous Materials, v. 165, p. 1091-1097, 2009.

MAGRI, M. A. **Otimização do processo de nitrificação com o uso de conchas de ostras como material suporte em reatores aeróbios com biomassa fixa**. Engenharia Sanitária Ambiental, v.18, p.123-130, 2013.

MARINHO, G.; RODRIGUES, K.; **Fungos e Águas Residuárias Industriais: Nova Tecnologia**. Recife: Imprima, 2012.

McMURRY, J. **Química orgânica**, combo. 7ª ed. Norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

MING, D.; GLASSER, D.; HILDEBRANDT, D. **Application of attainable region theory to batch reactors**. Chemical Engineering Science, v. 99, p. 203-214, 2013.

MIRANDA, E.J.; MCINTYRE, I.M.; PARKER, D.R.; GARY, R.D.; LOGAN, B.K. **Two deaths attributed to the use of 2,4-dinitrophenol**. Journal of Analytical Toxicology, v. 30, 2006.

MORE, T. T.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R.Y. **Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment**. Bioresource Technology, v. 101, p. 7691-7700, 2010.

MOHAMMADI, A.; NASERNEJAD, B. **Enzymatic degradation of anthracene by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse**. Journal of Hazardous Materials, v. 161, p. 534-537, 2009.

NAKANO, K.; OBUCHI, E. ; TAKAGI, S.; YAMAMOTOA, R. **Photocatalytic treatment of water containing dinitrophenol and city water over TiO₂/SiO₂**. Separation and Purification Technology, v. 34, p. 67-72, 2004.

NOGUEIRA, M. I. C. **Tratamentos adsortivos e de oxidação avançada de fenol, 2-nitrofenol e 4-nitrofenol em solução aquosa**. 2009. Universidade Federal do Ceará. Tese (Doutorado em Saneamento Ambiental), Fortaleza, 2009.

OLIVI, C. R. C. P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A. **Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação**. Química Nova, v. 31, n.7, p. 1820-1830, 2008.

PACA, J.; HALECKY, M.; BARTA, J.; BAJPAI, R. **Aerobic biodegradation of 2,4-DNT and 2,6-DNT: performance characteristics and biofilm composition changes in continuous packed-bed bioreactors**. Journal of Hazardous Materials, v. 163, p. 848-854, 2009.

PAPADIMITRIOU, C.A.; PETRIDIS, D.; ZOUBOULIS, A.I., SAMARAS, P.; YIANGOU, M. **Protozoans as indicators of sequential batch processes for phenol treatment: an auto ecological approach**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 98, p. 210-218, 2013.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. **Physiological aspects of free and immobilized *Aspergillus niger* cultures producing citric acid under various glucose concentrations.** Process Biochemistry, v. 39, p.1963-1970, 2004.

PERCHET, G.; SANGELY, M.; GOÑI, M.; MERLINA, G.; REVEL, J-C.; PINELLI, E. **Microbial population changes during bioremediation of nitroaromatic and nitramine-contaminated lagoon.** International Biodeterioration e Biodegradation, v. 61, p. 304-312, 2008.

PINTO, A.P.; SERRANO, C.; PIRES, T.; MESTRINHO, E.; DIAS, L.; TEIXEIRA, D. M.; CALDEIRA, A.T.; **Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures.** Science of the Total Environment, v. 435-436, p. 402-410, 2012.

POLAT, H.; MOLVA, M.; POLAT, M. **Capacity and mechanism of phenol adsorption on lignine.** International Journal of Mineralogy Process, v. 79, p. 264-273, 2006.

POMPEU, G. B. **Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol.** Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Biologia na Agricultura e no Ambiente), 96f, Piracicaba, São Paulo, 2010.

RIVERA-HOYOS, C. M.; MORALES-ÁLVAREZ, E. D.; POUTOU-PIÑALES, R. A.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, R.; DELGADO-BOADA, J. **M. Fungal Laccases, Fungal Biology Reviews.** British Mycological Society, p. 1-16, 2013.

RODRIGUES, K. A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética.** 2006. 145f. Tese (Doutorado em Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SAHOO, N. K.; PAKSHIRAJAN, K.; GHOSH, P. K. **Biodegradation of *p*-nitrophenol using *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 in a novel upflow packed bed reactor.** Journal of Hazardous Materials, v. 190, p. 729-737, 2013.

SAMPAIO, G. M. M. S. **Remoção de metil paration e atrazina em reatores de bancada com fungos.** 2006. 113f. Tese (Doutorado em Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SAMPAIO, G. M. M. S.; SANTAELLA, S. T.; RODRIGUES, K. A.; ZAIAT, M. **Influência da glicose sobre o consumo de fenol por *Aspergillus niger* AN 400 em reatores em batelada.** Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 12, n. 2, p. 222-228, 2007.

SANTAELLA, S. T.; SILVA JR., F. C. G.; GADELHA, D. A. C.; COSTA, K. O.; AGUIAR, R.; ARTHAUD, I. D. B.; LEITÃO, R. C. **Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*.** Engenharia Sanitária Ambiental, v.14, n.1, p. 139-148, 2009.

SANT'ANNA JR., G. L. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações.** 418p. Rio de Janeiro: Interciência, 2010.

SANTOS, R. C.O.; BARBOSA F., O.; GIORDANO, G. **Reatores biológicos para tratamento de esgotos: método racional de dimensionamento**. Coletânea em saneamento ambiental, Série Temática: Tecnologias Ambientais. Vol. 3, 1ª Edição, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

SAÚDE NA REDE- FÓRUM. **DNF – A Morte Amarela**. Disponível em <<http://www.saudeforum.com.br/viewtopic.phpf=1et=24960>> Acesso em 25/10/2013.

SHARMA, N.; GUPTA, V. C. **Comparative biodegradation analysis of phenol from paper e pulp industrial effluent by free and immobilized cells of *Aspergillus niger***. International Conference on Environmental Science and Technology, v. 30, p. 68-72, 2012.

SHE, Z.; GAO, M.; JIN, C.; CHEN, Y.; YU, J. **Toxicity and biodegradation of 2,4-dinitrophenol and 3-nitrophenol in anaerobic systems**. Process Biochemistry, v. 40, p. 3017-3024, 2005.

SHE, Z.; XIE, T.; ZHU, Y.; LI, L.; TANG, G.; HUANG, J. **Study on the aerobic biodegradability and degradation kinetics of 3-N, 2,4-DNF and 2,6-DNF**. Journal of Hazardous Materials, v. 241-242, p. 478 - 485, 2012.

SILVA, L. V. C.; ANDRADE, M. V.; RODRIGUES, K.; MARINHO, G. **Tratamento sintético de laticínio em reatores em batelada inoculados com *Aspergillus niger* AN 400**. Engenharia Sanitária Ambiental, p. 1-10, 2012.

SILVA, R.F.; ANTONIOLLI, Z.I.; ANDREAZZA, R.; JUNIO, C.O.M. **Seleção de fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre em meio de cultura**. 2007.

SIMON, L. L.; INTROVIGNE, M.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. **Batch reactor optimization under liquid swelling safety constraint**. Chemical Engineering Science, v. 63, p. 770-781, 2008.

SOARES, I. A. ; FLORES, A. C. ; MENDONÇA, M. M. ; BARCELOS, R. P. ; BARONI, S. **Fungos na biorremediação de áreas degradadas**. p. 341 - 350, 2011.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, volume 2, LTC, 9ª ed., Rio de Janeiro, 2009.

SOUZA NETO, A. **Remoção de matéria orgânica em matriz aquosa dopada com os pesticidas atrazina, metil paration, paraquat e deltametrina empregados em reatores em batelada inoculados com a *Aspergillus niger* AN 400**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 82f, 2012.

SUN, J.; LU, X.; RINAS, U.; ZENG, A. P. **Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics**. Genome Biology, v. 8: R182, p. 1-13, 2007.

SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE – Ceará - **SEMACE**. **Portaria no. 154 de 22 de julho de 2002**. Disponível em:

<http://antigo.semace.ce.gov.br/integracao/biblioteca/legislacao/conteudo_legislacao.asp?cd=95> Acessado em: 03 fev. 2014.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. **Effects of glucose and NH_4^+ concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor*.** Enzyme and Technology, 25, p. 278-284, 1999.

SWARNALATHA, B.; ANJANEYULU, Y. **Studies on the heterogeneous photocatalytic oxidation of 2,6-dinitrophenol in aqueous TiO_2 suspension.** Journal of Molecular Catalysis, v. 223, p. 161-165, 2004.

TSANG, A.; BUTLER, G.; POWLOWSKI, J.; PANISKO, E. A.; BAKER, S. E. **Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome.** v. 46, S153-S160, 2009.

U.S. EPA, **Water Quality Criteria**, U. S. EPA, Editor 2000: Washington, DC.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. **Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation.** Fungal Genetics and Biology, 10f, 2013.

VON SPERLING, M. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Princípios básicos de tratamento de esgoto.** Vol. 2. 2ª ed. Editora SEGRAC. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. Minas Gerais. 1996.

VON SPERLING, M. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Lodos Ativados.** Vol. 4. Editora SEGRAC. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. Minas Gerais. 1997.

WANDERLEY, C. R. ***Aspergillus niger* AN 400 como inóculo de reatores em batelada para remoção do corante vermelho de congo em meio aquoso sintético.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Ceará). Fortaleza, 2007.

WANG, H-L.; LIANG, W-Z.; ZHANG, Q.; JIANG, W-F. **Solar-light-assisted Fenton oxidation of 2,4-dinitrophenol (DNF) using Al_2O_3 - supported Fe(III)-5-sulfosalicylic acid (ssal) complex as catalyst.** Chemical Engineering Journal, v. 164, p. 115-120, 2010.

WHELLER, K.A. **Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*.** International Journal of Food Microbiology, n. 141-150, 1991.

WU, J.; YU, H-Q. **Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions.** Bioresource Technology, v. 98, p. 253-259, 2007.

XIAO, P.; MORI, T.; KONDO, R. **Biotransformation of the organochlorine pesticides *trans*-chlordane by woody-hot fungi.** New Biotechnology, v. 29, p. 107 -115, 2011.

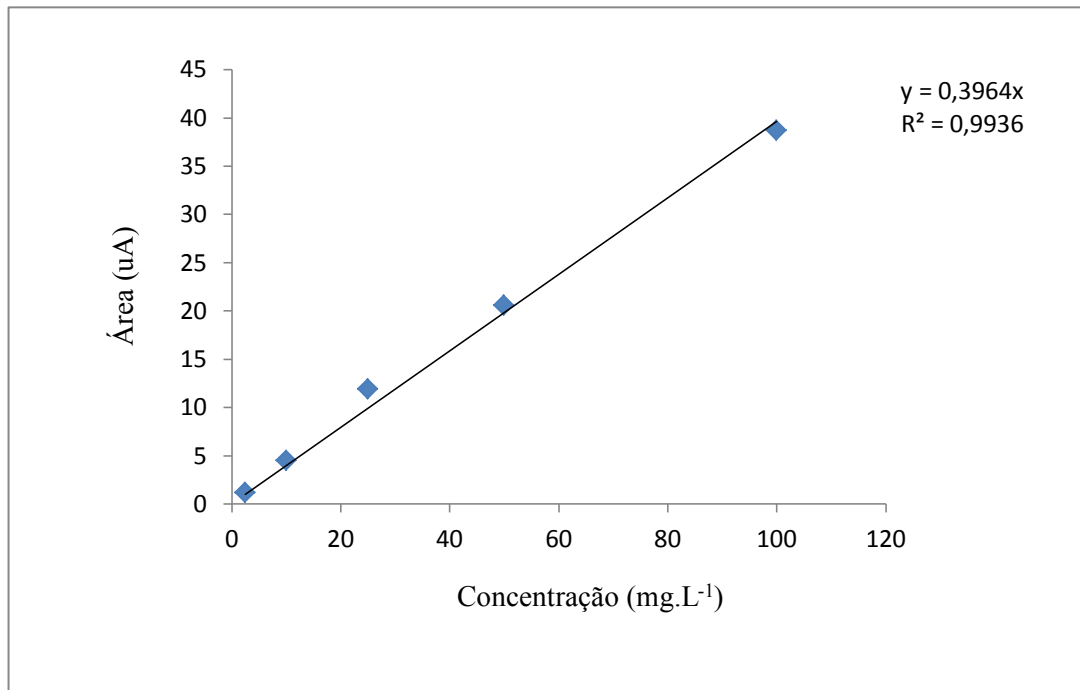
XIAO, P.; MORI, T.; KAMEI, I.; KIYOTA, H.; TAKAGI, K.; KONDO, R. **Novel metabolic pathways of organochlorine pesticides dieldrin and aldrin by the white rot fungi of the genus *Phlebia*.** Chemosphere, v. 85, p. 218-224, 2011.

ZHANG, J.; SMITH, R. **Design and optimisation of batch and semi-batch reactors.** Chemical Engineering Science, v. 59, p. 459-478, 2004.

ZHONG, J. J. **Bioreactor Engineering**. Engineering Fundamentals of Biotechnology, v. 2, p. 165-177, 2011.

ANEXO

Anexo I - Curva de calibração padrão do 2,4-dinitrofenol.



Fonte: Autor (2013).