

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**DEGRADAÇÃO DA VINHAÇA POR TRATAMENTO COMBINADO
COM *Pleurotus sajor-caju* E OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA**

Autora: Débora da Silva Vilar

Orientadores: Prof. Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira.

Prof^a. Dr^a. Manuela Souza Leite.

ARACAJU, SE - BRASIL

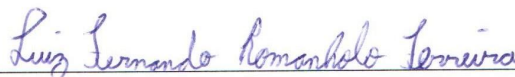
FEVEREIRO DE 2017

DEGRADAÇÃO DA VINHAÇA POR TRATAMENTO COMBINADO COM *Pleurotus*
sajor-caju E OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA

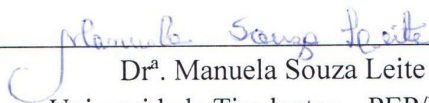
Débora da Silva Vilar

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS

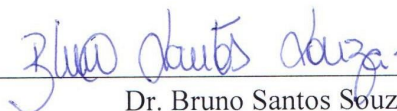
Aprovada por:



Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira
Universidade Tiradentes – PEP/UNIT



Dr.ª. Manuela Souza Leite
Universidade Tiradentes – PEP/UNIT



Dr. Bruno Santos Souza
Universidade Federal de Sergipe – UFS



Dr.ª. Nádia Hortense Torres
Universidade Tiradentes – ITP/UNIT



Dr. Giancarlo Richard Salazar Banda
Universidade Tiradentes – PEP/UNIT

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Vilar, Débora da Silva.

V697d Degradação da vinhaça por tratamento combinado com *Pleurotus sajor-caju* e oxidação eletroquímica. / Débora da Silva Vilar; Orientadores: Prof. Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira, Prof.^a. Dr.^a. Manuela Souza Leite – Aracaju: UNIT, 2017.

97 p.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Vinhaça. 2. Degradação. 3. Tratamento combinado. 4. *Pleurotus sajor-caju*. 5. Oxidação eletroquímica. I. Vilar, Débora da Silva. II. Ferreira, Luiz Fernando Romanholo (orient.). III. Leite, Manuela Souza (orient.). IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 661.722.094.3:544.613.26

Sem sonhos a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades
e corra riscos para executar seus sonhos.
Melhor é errar tentando que errar por se omitir.

Augusto Cury

Agradecimentos

À Deus, por me dar saúde, sabedoria e força para seguir mesmo com as adversidades do cotidiano.

A minha família, por todo amor e entenderem minha ausência.

Aos meus pais Delmário e Ecilene, pelo amor incondicional e apoio a minha educação e formação, sempre me incentivando a nunca desistir dos meus objetivos. Amo vocês!

A minha irmã Andra e a minha amiga Lays, pelo companheirismo e compreensão em todos os momentos.

Ao prof. Dr. Luiz Fernando, pela orientação, ensinamentos transmitidos, confiança, amizade e agradável convívio em todas as fases da pesquisa. E a prof. Dr^a. Manoela Leite, pelo apoio durante a execução desta pesquisa e amizade.

A prof. Dr^a. Nádia Torres, que com seu conhecimento muito acrescentou e auxiliou no encaminhamento dos ensaios ecotoxicológicos.

Ao prof. Dr. Giancarlo Salazar-Banda, pela disponibilidade do LEN e ricas contribuições para aperfeiçoamento do meu projeto de pesquisa.

A prof. Dr^a. Eliane Cavalcanti, pelo privilégio em trabalhar no seu grupo de pesquisa, e por conceder o LTRE para realização dos experimentos.

Ao prof. Dr. Luiz Pereira, pela contribuição nas análises físico-química da vinhaça.

As profs. Dr^a. Rebeca Padilla e Dr^a Alini Fricks, pelo uso do Laboratório de Engenharia e de Bioprocessos.

Ao prof. Dr. Bruno Souza pelas contribuições na banca de qualificação.

Ao doutorando Diego Batista, pela generosidade em auxiliar nas análises de atividade enzimática. E a doutoranda Marília Pupo, pelo auxílio nas análises eletroquímicas.

Aos alunos de iniciação científica, Giovana, Yago, Clara, Nara e Cadu pelas as inúmeras ajudas nos experimentos. E ao pessoal do LTRE, Dani, Raul, Nayara e Bella pelo convívio harmonioso.

Aos amigos de sempre, Isabelle, Milson, Talita, Maria Rosa e Cliff pela maravilhosa amizade, companhia e apoio, que muito me ajudaram.

A Universidade Tiradentes, pela bolsa de mestrado concedida, sem a qual não seria possível a concretização desse sonho. E ao ITP pela estrutura proporcionada.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e me incentivaram durante a caminhada acadêmica.

MUITO OBRIGADA!

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

DEGRADAÇÃO DA VINHAÇA POR TRATAMENTO COMBINADO COM *Pleurotus sajor-caju* E OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA

Débora da Silva Vilar

A vinhaça é um resíduo proveniente do processamento do etanol, a partir da cana-de-açúcar, com média variando entre 15-18 litros para cada litro de etanol produzido. Esse subproduto apresenta características ácidas e corrosivas, alto potencial poluente devido à presença de compostos recalcitrantes e tóxicos (melanoidina e fenóis) que impedem sua degradabilidade, bem como concentrações elevadas de matéria orgânica. A partir disso, torna-se necessária a aplicação de tecnologias de tratamento a fim de reduzir os poluentes da vinhaça que contaminam o meio ambiente, uma vez que é descartada inadequadamente nos corpos hídricos. A combinação de processos de tratamento de efluentes mostrou ser uma estratégia inovadora e economicamente atraente na eliminação de cargas poluentes. Desta forma, neste trabalho foi estudado o uso do fungo *Pleurotus sajor-caju*, sequenciado pela oxidação eletroquímica (OE) para degradar a vinhaça de cana-de-açúcar. O tratamento da vinhaça com *P. sajor-caju* proporcionou remoções eficientes da coloração (97%) e turbidez (99%), atingindo também remoções de 50,6% para demanda química de oxigênio (DQO) e 57,3% para o carbono orgânico total (COT). A produção de enzimas ligninolíticas foi observada, e as atividades da lacase mais elevadas foram obtidas no 12º dia de fermentação (variando entre 341- 400 UI/L) e entre o 9º e 12º dia para a manganês peroxidase (variando entre 1400-1494 UI/L). Concomitante, a biomassa micelial obteve alta concentração (13,62 g/L) no 15º dia de crescimento. Em condições otimizadas, a OE com o ânodo $Ti/(RuO_2)_{0.7}(IrO_2)_{0.1}(Sb_2O_3)_{0.2}$ aumentou a tratabilidade da vinhaça, alcançando remoção final de 100% da coloração, 66% em DQO e 61% em COT. Este procedimento adicional permitiu eliminar a toxicidade da vinhaça em 0% de letalidade para a *Lactuca sativa* e *Raphidocelis subcapitata*.

Palavras-chave: Vinhaça, degradação, tratamento combinado, *Pleurotus sajor-caju*, oxidação eletroquímica.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

DEGRADATION OF VINASSE BY COMBINED TREATMENT WITH *Pleurotus sajor-caju* AND ELECTROCHEMICAL OXIDATION

Débora da Silva Vilar

Vinasse is a residue that comes from the processing of ethanol from sugarcane, with an average of 15-18 liters for each liter of ethanol produced. This by-product presents acid and corrosive characteristics, high polluting potential due to the presence of recalcitrant and toxic compounds (melanoidin and phenols) that prevent its degradability, as well as high concentrations of organic matter. Thus, it becomes necessary to apply technologies of treatment in order to reduce the pollutants of vinasse which contaminate the environment, since it is inappropriately discarded in water bodies. The combination of effluent treatment processes has proven to be an innovative and economically attractive strategy to eliminate pollutants. In this work, it was studied the use of the fungus *Pleurotus sajor-caju*, sequenced by electrochemical oxidation (EO) to degrade vinasse. The treatment of vinasse with *P. sajor-caju* provided efficient color removal (97%) and turbidity (99%), reaching also removals of 50.6% for chemical oxygen demand (COD) and 57.3% for total organic carbon (TOC). The production of ligninolytic enzymes was observed, and the highest laccase activities were obtained on the 12th day of fermentation (ranging from 341-400 UI/L) and between the 9th and 12th day for the manganese peroxidase (ranging from 1400-1494 UI/L). Concomitantly, the mycelial biomass obtained high concentration (13.62 g/L) on the 15th day of growth. In optimized conditions, EO with the anode Ti/(RuO₂)_{0.7}(IrO₂)_{0.1}(Sb₂O₃)_{0.2} increased the treatability of the vinasse, reaching final color removal of 100%, 66% in COD and 61% in TOC. This additional procedure eliminated the toxicity of vinasse at 0% of lethality for *Lactuca sativa* and *Raphidocelis subcapitata*.

Keywords: Vinasse, degradation, combined treatment, *Pleurotus sajor-caju*, electrochemical oxidation.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	4
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO 3	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR	5
3.2. FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS	8
3.2.1. <i>Pleurotus sajor-caju</i>	10
3.3. ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS	11
3.3.1. <i>Lacase (EC 1.10.3.2)</i>	14
3.3.1.1. <i>Caracterização estrutural da Lacase</i>	15
3.3.2. <i>Manganês-peroxidase (EC 1.11.1.13)</i>	19
3.4. ECOTOXICOLOGIA	20
3.4.1. <i>Lactuca sativa L.</i>	23
3.4.2. <i>Raphidocelis subcapitata</i>	25
3.5. OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	26
3.5.1. <i>Diamante dopado com boro (DDB)</i>	28
3.5.2. <i>Âodos dimensionalmente estáveis (ADEs)</i>	29
CAPÍTULO 4	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS	31
4.1. VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR	31
4.2. MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO	31
4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO DA LINHAGEM	32
4.4. CULTIVO DE P. SAJOR-CAJU EM FRASCOS AGITADOS CONTENDO VINHAÇA.....	32
4.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CRESCIMENTO FÚNGICO.....	33
4.5.1. <i>Determinação da atividade da Lacase (Lac)</i>	34
4.5.2. <i>Determinação da atividade da Manganês Peroxidase (MnP)</i>	34
4.5.3. <i>Fórmula para cálculo das atividades enzimáticas</i>	34
4.5.4. <i>Determinação da descoloração da vinhaça</i>	35
4.5.5. <i>Quantificação da biomassa micelial</i>	35
4.6. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA IN NATURA E TRATADA	36
4.6.1. <i>Determinação do pH, turbidez e condutividade elétrica</i>	36
4.6.2. <i>Determinação de DBO</i>	36
4.6.3. <i>Determinação de DQO</i>	37
4.6.4. <i>Determinação de fenóis totais</i>	37
4.6.5. <i>Determinação de fósforo total</i>	37
4.6.6. <i>Determinação do nitrogênio total</i>	38
4.6.7. <i>Determinação do potássio</i>	38
4.7. CÉLULA ELETROQUÍMICA	39
4.8. PREPARO E MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS TESTES	40
4.8.1. <i>Raphidocelis subcapitata</i>	40
4.9. AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA	41
4.9.1. <i>Bioensaio com Lactuca sativa</i>	41
4.9.2. <i>Biensaio com Raphidocelis subcapitata</i>	42
CAPÍTULO 5	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44

5.1. TESTES PRELIMINARES NO CULTIVO DE PLEUROTUS SAJOR-CAJU COM VINHAÇA EM FRASCOS AGITADOS	44
5.1.1. DESCOLORAÇÃO E TURBIDEZ DA VINHAÇA	44
5.1.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA E BIOMASSA FÚNGICA	46
5.2. OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DA VINHAÇA	50
5.2.1. <i>Comparações entre ânodos de trabalho</i>	50
5.2.2. <i>Efeito da densidade de corrente</i>	51
5.2.3. <i>Efeito da concentração do eletrólito</i>	53
5.2.4. <i>Otimização do tratamento da vinhaça</i>	54
5.3. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA.....	55
5.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA VINHAÇA	57
5.4.1. <i>Lactuca sativa</i>	57
5.4.2. <i>Efeito da vinhaça na germinação das sementes</i>	58
5.4.3. <i>Efeito da vinhaça no crescimento relativo da raiz e índice de germinação das sementes</i>	59
5.4.4. <i>Toxicidade aguda da vinhaça</i>	61
CAPÍTULO 6	63
6. CONCLUSÕES	63
CAPÍTULO 7	64
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	64
CAPÍTULO 8	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO A	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA DA MELANOIDINA.....	7
FIGURA 2- ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO SÍTIO ATIVO DA LACASE (LAC) PERTENCENTE AO GÊNERO PLEUROTUS, QUE DESCREVE A ORIENTAÇÃO SOBRE ÁTOMOS DE COBRE E SUA DISTÂNCIA (AZUL, DISTÂNCIAS INTER ATÔMICA EM Å), SENDO INTEGRADO POR 4 ÁTOMOS DE COBRE DISTRIBUÍDOS EM 3 CENTROS CATALÍTICOS: CU (T1) E O GRUPO DE CU TRI NUCLEARES (T2-T3)..	16
FIGURA 3- ESQUEMA DA REAÇÃO DE MECANISMO DA LACASE.....	17
FIGURA 4- REAÇÃO OXIDAÇÃO DO SUBSTRATO PELA LACASE.....	17
FIGURA 5- ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO SÍTIO ATIVO DA MANGANÊS PEROXIDASE (MNP) PERTENCENTE AO GÊNERO PLEUROTUS.....	19
FIGURA 6- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS DE OXIDAÇÃO (DIRETA E INDIRETA) ATUANTES NOS PROCESSOS DE OE.....	27
FIGURA 7- CICLO DE OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS.	28
FIGURA 8- FUNGO BASIDIOMICETO PLEUROTUS SAJOR-CAJU CCB 020.	31
FIGURA 9- METODOLOGIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO PLEUROTUS SAJOR-CAJU.	32
FIGURA 10- METODOLOGIA DA INOCULAÇÃO DO PLEUROTUS SAJOR-CAJU EM FRASCOS AGITADOS, CONTENDO VINHAÇA.....	33
FIGURA 11- ACOMPANHAMENTO ANALÍTICO DAS AMOSTRAS NO DECORRER DO TRATAMENTO DA VINHAÇA.....	33
FIGURA 12- METODOLOGIA DA DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA SECA.	35
FIGURA 13- SISTEMA VOLTAMÉTRICO COMPOSTO POR (1) ELETRODOS DE TRABALHO (DDB E ADE), (2) ELETRODO AUXILIAR, (3) ELETRODO DE REFERÊNCIA, (4) POTENCIOSTATO/GALVANOSTATO, E (5) COMPUTADOR.	39
FIGURA 14- METODOLOGIA DO BIOENSAIO COM SEMENTES DE ALFACE (LACTUCA SATIVA).	41
FIGURA 15- METODOLOGIA DO TESTE DE TOXICIDADE COM RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA.	43
FIGURA 16- DESCOLORAÇÃO DA VINHAÇA IN NATURA E APÓS 15 DIAS DE CULTIVO COM TSG (A) E TCG (B) EM CONDIÇÕES DE FRASCOS AGITADOS.....	45
FIGURA 17- DESCOLORAÇÃO E REDUÇÃO DA TURBIDEZ DA VINHAÇA COM OS TRATAMENTOS TSG (■) E TCG (▲) DURANTE 15 DIAS DE FERMENTAÇÃO COM P. SAJOR-CAJU EM CONDIÇÕES DE FRASCOS AGITADOS.....	46
FIGURA 18- ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LAC E MNP E A BIOMASSA SECA PRODUZIDA POR P. SAJOR-CAJU NO TSG (■) E TCG (▲), DURANTE 15 DIAS DE INCUBAÇÃO EM CONDIÇÕES DE FRASCOS AGITADOS.....	48
FIGURA 19- INFLUÊNCIA DOS ÂNODOS (ADE E DDB) EM FUNÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRATAMENTO DO COT, DQO E ABS, PARA ELETRÓLISES DE 3 HORAS, APLICANDO UMA DENSIDADE DE CORRENTE DE 50 MA CM⁻², 0,1 M NA CL EM UM VOLUME DE 70 ML.....	51

FIGURA 20- INFLUÊNCIA DA DENSIDADE DE CORRENTE (MA CM^{-2}) EM FUNÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRATAMENTO DO COT (■), DQO (●) E ABS (▲), PARA ELETRÓLISES DE 3 HORAS UTILIZANDO O ADE, APLICANDO UMA DENSIDADE DE CORRENTE DE 12,5, 25 E 50 MA CM^{-2} , 0,1 M NaCl EM UM VOLUME DE 70 ML.....	52
FIGURA 21- INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO ELETRÓLITO NaCl (0,1, 0,05 E 0,025 M) EM FUNÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRATAMENTO DO COT (■), DQO (●) E ABS (▲), PARA ELETRÓLISES DE 3 HORAS UTILIZANDO O ADE, APLICANDO UMA DENSIDADE DE CORRENTE DE 25 MA CM^{-2} , EM UM VOLUME DE 70 ML.....	53
FIGURA 22- EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO BIOLÓGICO E COMBINADO EM FUNÇÃO DA REMOÇÃO DO COT (■), DQO (●) E ABS (▲), PARA ELETRÓLISES DE 3 HORAS UTILIZANDO O ADE, APLICANDO UMA DENSIDADE DE CORRENTE DE 25 MA CM^{-2} , ELETRÓLITO 0,025 M NaCl, EM UM VOLUME DE 70 ML.....	55
FIGURA 23- GERMINAÇÃO RELATIVA (GR) E GERMINAÇÃO ABSOLUTA (GA) DAS RAÍZES DE SEMENTES LACTUCA SATIVA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (%) DA VINHAÇA IN NATURA E APÓS O TSG COM FUNGO P. SAJOR-CAJU E SUBSEQUENTE OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	58
FIGURA 24- COMPRIMENTO RELATIVO DAS RAÍZES (CRR) E ÍNDICE DE GERMINAÇÃO (IG) DAS SEMENTES DE LACTUCA SATIVA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (%) DA VINHAÇA IN NATURA E APÓS O TSG COM FUNGO P. SAJOR-CAJU E SUBSEQUENTE OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	60

LISTA DE TABELAS

<i>TABELA 1- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA VINHAÇA DE ACORDO COM O TIPO DE MOSTO.....</i>	<i>6</i>
<i>TABELA 2- ENZIMAS FÚNGICAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA LIGNOCELULOSE.....</i>	<i>12</i>
<i>TABELA 3- ALGUNS TRABALHOS QUE RELATAM AS APLICAÇÕES DA LACASE.....</i>	<i>18</i>
<i>TABELA 4- ORGANISMOS TESTES PADRONIZADOS EM DIFERENTES NÍVEIS TRÓFICOS.....</i>	<i>21</i>
<i>TABELA 5- ALGUMAS APLICAÇÕES DE BIOENSAIOS DE TOXICIDADE COM SEMENTE DE ALFACE (LACTUCA SATIVA).....</i>	<i>24</i>
<i>TABELA 6- EXEMPLOS DA APLICAÇÃO DE BIOENSAIOS TOXICIDADE COM R. SUBCAPITATA.....</i>	<i>25</i>
<i>TABELA 7- COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA R. SUBCAPITATA.....</i>	<i>40</i>
<i>TABELA 8- CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA IN NATURA DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR, APÓS O TRATAMENTO BIOLÓGICO E COMBINADO COM A OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA.....</i>	<i>56</i>
<i>TABELA 9- VALORES DE CE₅₀ (%) E CI₅₀ (%) DE VINHAÇA PARA CADA ORGANISMO-TESTE, ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM PLEUROTUS SAJOR-CAJU E RESPECTIVA OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA, POR ADE.....</i>	<i>62</i>

LISTA DE EQUAÇÕES

<i>EQUAÇÃO 1- REAÇÃO DA QUEBRA DA MOLÉCULA DE ÁGUA.....</i>	<i>26</i>
<i>EQUAÇÃO 2- REAÇÃO DE ADSORÇÃO FÍSICA DO ($\cdot OH$) NA SUPERFÍCIE DO DDB.....</i>	<i>29</i>
<i>EQUAÇÃO 3- REAÇÃO DO PEROXIDISULFATO.....</i>	<i>29</i>
<i>EQUAÇÃO 4- REAÇÃO DO PEROXIDICARBONATO.....</i>	<i>29</i>
<i>EQUAÇÃO 5- REAÇÃO DO PEROXIDIFOSFATO.....</i>	<i>29</i>
<i>EQUAÇÃO 6- CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE (LAC) E MANAGNÊS PEROXIDASE (MNP)</i>	<i>34</i>
<i>EQUAÇÃO 7- CÁLCULO DA DESCOLORAÇÃO DA VINHAÇA.....</i>	<i>35</i>
<i>EQUAÇÃO 8- DETERMINAÇÃO DA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO (DBO)</i>	<i>36</i>
<i>EQUAÇÃO 9- DETERMINAÇÃO DA DETERMINAÇÃO QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)</i>	<i>37</i>
<i>EQUAÇÃO 10- QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS.....</i>	<i>37</i>
<i>EQUAÇÃO 11- QUANTIFICAÇÃO DE FÓSFORO TOTAL.....</i>	<i>38</i>
<i>EQUAÇÃO 12- GERMINAÇÃO RELATIVA DA LACTUCA SATIVA.....</i>	<i>42</i>
<i>EQUAÇÃO 13- GERMINAÇÃO ABSOLUTA DA LACTUCA SATIVA.....</i>	<i>42</i>
<i>EQUAÇÃO 14- CRESCIMENTO RELATIVO DA RAÍZ DA LACTUCA SATIVA.....</i>	<i>42</i>
<i>EQUAÇÃO 15- ÍNDICE DE GERMINAÇÃO DA LACTUCA SATIVA.....</i>	<i>42</i>

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Å: Ångström

AAD: Aril álcool dehidrogenase

AAO: Aril álcool oxidases

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

Abs: Absorbância

ADE: Ânodo dimensionalmente estável

BGL: β -glucosidases

CBH: Celobiohidrolases

CCB: Coleção de Culturas de Basidiomicetos

CE: Carboidratos esterases

CE₅₀: Concentração efetiva média

CENO: Concentração de efeito não observado

CEO: Concentração de efeito observado

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CL₅₀: Concentração letal média

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

COT: Carbono orgânico total

CRR: Crescimento relativo da raíz

Cys: Cysteine

DBB: Diamante dopado com boro

DBO: Demanda bioquímica de oxigênio

DQO: Demanda química de oxigênio

EC: Classificação enzimática

EPR: Ressonância paramagnética eletrônica

FAAS: Absorção atômica com chama

GA: Germinação absoluta

GH: Glicosil hidrolases

GR: Germinação relativa

His: Histidina

IG: Índice de germinação

kDa: Kilodalton

Lac: Lacase
LiP: Lignina peroxidase
mA: Miliampère
MEA: Extrato de malte-ágar
MnP: Manganês peroxidase
NTU: Unidade de turbidez nefelométrica
OD: Oxigênio dissolvido
OE: Oxidação eletroquímica
OH: Hidroxila
OS: Oligossacarídeos
PCB: Bifenilos policlorados
PEOA's: Processos eletroquímicos oxidativos avançados
PHA: Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
QR: Quinona redutase
SHE: Standard hydrogen electrode
TCG: Tratamento com glicose
TSG: Tratamento sem glicose
UI/L: Unidades internacionais por litro de caldo enzimático
UV: Ultravioleta
VP: Versátil peroxidases

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um significativo aumento na demanda por biocombustíveis, também conhecidos de “combustíveis verdes”, como alternativa para substituição de combustíveis fósseis. A partir disso, intensificou-se a produção de diferentes colheitas, tais como a de cana-de-açúcar e outros. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com cerca de 5 milhões de hectares de área cultivada e, 50% dessa produção é destinada ao etanol (SMEETS *et al.*, 2007; TSAO *et al.*, 2012).

Com aproximadamente 350 refinarias ativas, na safra de 2016/2017 o Brasil deverá produzir cerca de 690,98 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, gerando mais de 30 bilhões de litros de etanol. A estimativa é que a produção de cana-de-açúcar do país tenha um incremento de 3,8 % em relação à safra passada. O Estado de Sergipe é o 6º maior produtor da região Nordeste, com aproximadamente 2,8 milhões de toneladas produzidas na safra 2015/2016. Para a produção total de etanol no país, a safra 2015/2016 alcançou 29,21 bilhões de litros, com expectativa de 30,3 bilhões de litros para safra de 2016/2017, chegando a um aumento de 2,78 milhões de litros, o que denota a importância dessa monocultura tanto para o Brasil, quanto e também para o Estado de Sergipe. Entretanto, durante o processo de produção do etanol são gerados uma grande quantidade de bagaço de cana-de-açúcar, assim como de um subproduto residual com alto teor de carga tóxica, conhecido como vinhaça (CONAB, 2016; SEIXAS *et al.*, 2016).

A vinhaça é um efluente líquido de cor marrom e odor forte, produzida durante o processamento de etanol a partir de cana-de-açúcar. Neste processo, a fermentação dos açúcares provenientes da cana-de-açúcar e sua posterior destilação para etanol geram 18 litros de vinhaça a mais, para cada litro de etanol produzido. E esse resíduo é composto principalmente por água, minerais inorgânicos, sólidos suspensos e outros poluentes (melanoidina e fenóis). Além disso, é caracterizada por apresentar alta demanda química e bioquímica de oxigênio, e elevado efeito corrosivo devido ao seu baixo pH, a depender das condições de cultivo de cana-de-açúcar (CORTEZ *et al.*, 2014; UNICA *et al.*, 2016; SADEGHI *et al.*, 2016).

Seu descarte inadequado e indiscriminado no meio ambiente, há décadas tem chamado atenção devido aos seus efeitos de toxicidade. Esses efeitos podem ser analisados mediante o uso

de bioensaios, com emprego de organismos-testes para a detecção de agentes químicos presentes no resíduo, uma vez que este apresenta nível tóxico suficiente para provocar poluição dos mares, rios e solos, assim como a todos os seres vivos que residem nestes biosistemas (BIANCHI *et al.*, 2010). Diante disso, as indústrias sucroenergéticas viabilizam o desenvolvimento de alternativas que transformem a vinhaça em um produto sustentável e de maior valor agregado para a sociedade. No entanto, o principal problema está relacionado aos métodos de disposição aceitáveis deste resíduo, a partir da necessidade de proteger o ambiente em decorrência do grande acúmulo de vinhaça gerado pela produção industrial em larga escala de álcool (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013).

Usos alternativos como a reciclagem da vinhaça na fermentação, fertirrigação, produção de energia (combustão) e outras atividades industriais, são algumas das formas de reaproveitamento desse resíduo (LAIME *et al.*, 2011). Outra tentativa de contornar essa problemática, é a utilização de tratamentos e/ou biorremediação por meio de microrganismos promissores na degradação das moléculas deste poluente, a fim de obter viabilidade econômica e ambiental. Logo, destaca-se o gênero *Pleurotus* da classe dos basidiomicetos, pela sua capacidade degradadora de substâncias recalcitrantes presentes no resíduo, em virtude da produção de enzimas ligninolíticas que promovem alto potencial redox dos compostos orgânicos (JURADO *et al.*, 2011). A literatura retrata o uso desse gênero na degradação de efluentes contendo diversos tipos de compostos orgânicos, tais como fenóis, pesticidas, inseticidas, corantes e resíduo de laranja entre outros (BAZANELLA *et al.*, 2013; PURNOMO *et al.*, 2013; INÁCIO *et al.*, 2015).

Os produtos orgânicos que resistem à degradação biológica, podem ser facilmente removidos com os processos eletroquímicos oxidativos avançados (PEOA's), em específico através da oxidação eletroquímica (OE) que utiliza o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) gerado a partir da decomposição da água, com intuito de mineralizar completamente os compostos orgânicos do resíduo em CO_2 e H_2O (AMMAR *et al.*, 2016). As opções de ânodos comumente utilizados em reações de oxidação eletroquímica são o diamante dopado com boro (DDB) e o ânodo dimensionalmente estável (ADE). A reatividade, estabilidade e capacidade de geração de íons hidroxilas de ambos os materiais tem sido amplamente estudado de forma comparativa (SOPAJ *et al.*, 2015). De modo geral, na literatura foram encontrados apenas estudos de tratamentos combinados da vinhaça de cana-de-açúcar pelos processos de coagulação/floculação com oxidação por ADE ou com Fenton (ZAYAS *et al.*, 2007; GUERREIRO *et al.*, 2016).

Neste contexto, a proposta deste trabalho é avaliar a combinação das técnicas de tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar com o fungo *Pleurotus sajor-caju*, e por meio do processo de oxidação eletroquímica na degradação das moléculas persistentes no resíduo, utilizando o eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro (DDB) e ânodo dimensionalmente estável (ADE).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a degradação dos compostos recalcitrantes da vinhaça pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* e subsequente oxidação eletroquímica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer condição de cultivo do fungo que resulte na maior produção de enzimas ligninolíticas, em frasco agitado;
- Quantificar a produção das enzimas Lacase e Manganês Peroxidase produzidas pelo *Pleurotus sajor-caju*, bem como avaliar a descoloração e o aumento da concentração de biomassa durante o processo de biodegradação da vinhaça;
- Avaliar a eficiência do tratamento biológico da vinhaça por *Pleurotus sajor-caju* combinado com tratamento eletroquímico, utilizando os eletrodos DDB e ADE;
- Analisar a toxicidade da vinhaça *in natura* e vinhaça tratada, através de bioensaios de toxicidade, utilizando-se os organismos teste *Lactuca sativa* e *Raphidocelis subcapitata*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A vinhaça (resíduo líquido) e o bagaço (resíduo sólido) são os principais subprodutos gerados pela indústria sucroenergética. Este primeiro também é conhecido regionalmente como vinhoto, tiborna ou restilo, oriundo da fabricação do álcool da cana-de-açúcar após o processo da fermentação do mosto e destilação do vinho (KUMAR *et al.*, 1998).

España-Gamboa *et al.* (2011), relataram que a formação química da vinhaça varia em função da origem da matéria-prima, do procedimento utilizado no preparo do mosto, da técnica de fermentação selecionada, da espécie de levedura aproveitada e das condições operacionais da destilaria e instalações usadas. Cerca de 2 a 6 % de constituintes da vinhaça são sólidos, formada basicamente por matéria orgânica, sob a base de ácidos orgânicos e, em menor proporção, encontram-se principalmente o potássio (K) e também cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P), manganês (Mn) e nitrogênio (N) orgânico, conforme apresentado na Tabela 1 (FREIRE e CORTEZ, 2000; MARQUES, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007).

Estima-se que para produzir um litro de álcool é necessário cerca de 10 a 18 litros de vinhaça. Sua utilização pode ser realizada de várias maneiras: por caminhões tanques, por sulcos de infiltração, por aspersão e atualmente existe a possibilidade da dispersão da vinhaça diluída por meio de pivôs centrais (UNICA *et al.*, 2016).

Caracterizada por Silva *et al.* (2007) como a parte aquosa do vinho, a vinhaça é de grande importância para lavoura sucroalcooleira, devido à presença rica de elementos minerais como o potássio, da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO). Além de propriedades poluentes como: forte acidez pH (3,7-5,0), elevada corrosividade por causa do ácido sulfúrico livre disposto nas dornas de fermentação, apresenta ainda cor escura e cheiro característico, em razão da presença de meloidinas (Figura 1), que são polímeros com alto peso molecular e de difícil degradação. Estes são gerados a partir de uma reação Maillard com proteínas (NAIK *et al.*, 2008; SZYMANSKI *et al.*, 2010; CORTEZ *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016).

Tabela 1- Composição química da vinhaça de acordo com o tipo de mosto.

Parâmetro	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2 - 5,0	3,7 - 4,6	4,4 - 4,6
Temperatura (°C)	80 - 100	80 - 100	80 - 100
DBO (mg O ₂ /L)	25.000	6.000 - 16.500	19.800
DQO (mg O ₂ /L)	65.000	15.000 - 33.000	45.000
Sólidos totais (mg/L)	81.500	23.700	52.700
Sólidos voláteis (mg/L)	60.000	20.000	40.000
Sólidos fixos (mg/L)	21.500	3.700	12.700
Nitrogênio (mg N/L)	450 - 1.610	150 - 700	480 - 710
Fósforo (mg P ₂ O ₅ /L)	100 - 290	10 - 210	9 - 200
Potássio (mg K ₂ O/L)	3.740 - 7.830	1.200 - 2.100	3.340 - 4.600
Cálcio (mg CaO/L)	450 - 5.180	130 - 1.540	1.330 - 4.570
Magnésio (mg MgO/L)	420 - 1.520	200 - 490	580 - 700
Sulfato (mg SO ₄ /L)	6.400	600 - 760	3.700 - 3.730
Carbono (mg C/L)	11.200 - 22.900	5.700 - 13.400	8.700 - 12.100
Relação C/N	16 - 16,27	19,7 - 21,07	16,4 - 16,43
Matéria orgânica (mg/L)	63.400	19.500	3.800
Subst. redutoras (mg/L)	9.500	7.900	8.300

Fonte: Adaptado de Marques, 2006.

Por estes motivos, esse resíduo tem alto poder como fertilizante em solo e poluidor do ambiente. Seu potencial poluente é cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, além disso, apresenta altos índices de DBO e DQO, que varia de 35.000-50.000 mg L⁻¹ e 70.000-150.000 mg L⁻¹, respectivamente. Com esses dados podemos constatar que a vinhaça apresenta uma grande quantidade de matéria orgânica, que leva a eutrofização dos efluentes onde esse resíduo é despejado, tendo como resultados substâncias que podem comprometer a qualidade da água (FREIRE e CORTEZ, 2000; ROBLES-GONZALEZ *et al.*, 2012).

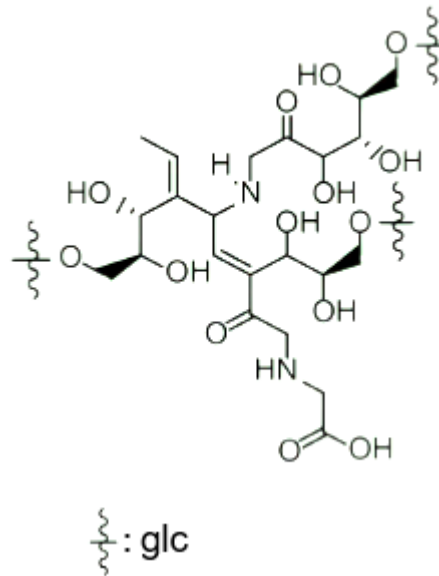


Figura 1- Estrutura da melanoidina.

Fonte: Adaptado de LEE *et al.*, 2015.

Sob o ponto de vista biológico, a vinhaça deve ser considerada também como um agente nocivo, responsável pelo aumento da atividade microbiana no solo, em virtude de ser um composto recalcitrante, possuir substâncias fitotóxicas, antibacterianas e propriedades antioxidantes, que provocam alterações nas propriedades físico-química do solo. Desta forma, se o resíduo não for tratado antes da destinação ou descarte no ambiente, e empregada de maneira correta, causará danos à fauna e flora, poluindo rios e mares, bem como os organismos que residem nestes ecossistemas (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011).

Diante disso, as indústrias procuram novas alternativas de disposição e reaproveitamento da vinhaça, uma vez que esse resíduo proporciona um elevado teor poluente no ambiente (SILVA *et al.*, 2007). O reaproveitamento da vinhaça aparece em diversas formas: processos de lavagem da cana, com o reuso da água, geração de biogás (biodigestão anaeróbica), reciclagem na fermentação, distribuição em zonas de sacrifício (solos não cultiváveis), incineração, combustão, geração de leveduras, irrigação da cultura através da fertirrigação e outras atividades intrínsecas ao processo industrial (LAIME *et al.*, 2011).

Este composto, que antes lançada *in natura* nos corpos d'água, passou a ser lançada no solo, na maioria das vezes por fertirrigação, colocando o uso dessa prática em destaque, pois não precisa de grandes investimentos, possui baixo custo de manutenção, não envolve a utilização de tecnologia complexa, possibilita uma rápida eliminação de grandes quantidades desse material, apresenta melhorias na fertilidade do solo, e atua como um agente redutor dos fatores que

provocam poluição nos recursos hídricos (CORTEZ *et al.*, 1992). No entanto, o uso da vinhaça na fertirrigação não pode ser em excesso, uma vez que pode trazer prejuízos ao ambiente, devido ao acúmulo de contaminantes, e sua lixiviação poderá contaminar os mananciais subterrâneos e salinizar os solos, podendo ainda propiciar a rápida decomposição microbiana da matéria orgânica, que conduz a proliferação de moscas e torna o ambiente insalubre e instável. Concomitantemente, tornou-se necessária a adoção de decretos nas diversas áreas de atuação dos órgãos fiscalizadores do meio ambiente, a fim de manter o equilíbrio ecológico e minimizar os impactos ambientais negativos causados quando a vinhaça é despejada nos corpos hídricos sem tratamento adequado (SOUZA *et al.*, 2015).

Dentro desses decretos destaca-se a norma técnica P 4.231 da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) do Estado de São Paulo, que definiu em março de 2005 os limites máximos de dosagem de aplicação da vinhaça (150 m³/ha) para enriquecimento dos solos agrícolas, que deve ser calculados considerando a capacidade de troca catiônica do solo, teores de potássio, e a extração média desse elemento pela cultura de cana em cada ciclo (CETESB, 2006).

O desenvolvimento do setor sucroenergético da vinhaça variou de forma acelerada para moderada, visto que se não seguir a norma técnica de vigência da classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para as condições e padrões de lançamento de efluentes, torna-se ambientalmente não sustentável. Estes são fatores essenciais para um desenvolvimento sem prejuízos na agricultura canavieira, principalmente quando envolve a substituição de uma parte do combustível fóssil por álcool, nos grandes centros urbanos (DE CASTRO, 2012; SOUZA *et al.*, 2015).

3.2. FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS

A biorremediação é uma das opções mais viáveis para minimizar ou remover xenobióticos do solo e da água a partir do uso de microrganismos (PASSARINI *et al.*, 2011; CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013). Nesse sentido a biorremediação da vinhaça pode se tornar uma ferramenta útil no tratamento deste resíduo, visto que a degradação desses efluentes xenobióticos e recalcitrantes, são promovidos em maior potencial e eficiência pelos fungos da podridão branca.

Esposito *et al.* (2004), relataram que grupo dos basidiomicetos que inclui os fungos de podridão branca, ou seja, degradadores de lignina se distinguem dos outros microrganismos

quando aplicados à biorremediação, devido à presença de filamentos septados chamados de hifas que atravessam facilmente o substrato e atingem os poluentes. Além disso, estes possuem uma rápida adequação a distintas fontes de carbono, uma vez que apresentam plasticidade metabólica, o que faz a passagem de resíduos a subprodutos. Estes resíduos estão envolvidos na alimentação animal e na indústria de biocombustível, no momento que são atribuídos a processos biotecnológicos de geração de metabólitos ativos, como alcaloides, antibióticos, enzimas e antioxidantes (JURADO *et al.*, 2011). Essas aplicações só são possíveis porque os diversos compostos recalcitrantes que se deseja remover dos processos industriais, apresentam estrutura molecular similar à molécula da lignina, sendo assim capazes de sofrerem oxidação pelo sistema enzimático inespecífico dos basidiomicetos (JURADO *et al.*, 2011).

O grupo dos basidiomicetos contém os fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio e popularmente chamados de cogumelos. A sua fase vegetativa é denominada de micélio, formado por hifas e este grupo é caracterizado a partir de dois tipos básicos de basidiósporos: balistósporos que são liberados violentamente dos basídios e os denominados estatismósporos, que são liberados passivamente. Dentro desse grupo se encontram os basidiomicetos lignocelulolíticos que secretam enzimas capazes de converterem os polímeros externos em moléculas menores, pelos quais são assimiladas e utilizadas como nutrientes (GUGLIOTTA e CAPELARI, 1998).

O sistema multienzimático inespecífico desses fungos da podridão branca é apropriado para desestabilizar moléculas quimicamente estáveis, e está associado à capacidade de degradação de forma aeróbia e a secreção de enzimas extracelulares no substrato que as colonizam, incluindo as hidrolases e oxidoredutases, esta última apresentando um papel importante na remoção da lignina. A lacase (Lac), manganês-peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP) são as enzimas oxidoredutases mais importantes e o padrão de expressão dessas enzimas depende dos organismos que as secretam. Neste sentido, além da função de reciclagem de resíduos agrícolas, esses fungos basidiomicetos de podridão branca e suas enzimas também são considerados eficientes na degradação de corantes, polissacarídeos, xenobióticos e compostos fenólicos, devido à sua eficiência está relacionada ao seu elevado potencial redox capaz de recuperar ambientes contaminados e a sua baixa especificidade do conjunto enzimático (ALI *et al.*, 2010).

No que diz respeito à aplicação destes fungos na biorremediação de solos, algumas vantagens podem ser destacadas: por serem extracelulares e com capacidade de reagir em substâncias insolúveis ou complexadas ao solo. Além disso, seu sistema de enzimas não precisa

ser induzido e a degradação pode ocorrer até níveis não detectáveis, com a mineralização da matéria-prima (BARR e AUST, 1994).

Os fungos se adaptam a uma grande variedade de substratos, devido à sua capacidade de reprodução e crescimento, no qual esses substratos são bioconvertidos em biomassa microbiana, sendo esta utilizada para extração de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, podendo ainda servir de matéria-prima para produção de fertilizantes e corretivos agrícolas (DONINI *et al.*, 2006; MUKHOPADHYAY e GUHA, 2015). Desse modo, como todos os organismos vivos, esses fungos podem modificar seu ambiente e utilizar os compostos químicos presentes no meio como fontes de energia e base para seu crescimento e reprodução (GALVANO e FORCHIASSIN, 2010).

3.2.1. *Pleurotus sajor-caju*

Os basidiomicetos de podridão branca são caracterizados pela habilidade de degradar compostos recalcitrantes, tendo como evidência o gênero *Pleurotus*. Cohen *et al.*, (2002) afirmaram que o *Pleurotus* é um gênero de cogumelo comestível, que faz parte de um grupo de fungos ligninolíticos, de relevância alimentar, ambiental, biotecnológica e medicinal. Neste último requisito, esses fungos apresentam características terapêuticas como antiviral, antitumoral, indução de atividades imunológica, atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa (NGAI e NG, 2004; GUILLAMÓN *et al.*, 2010). Além disso, este gênero se encontra na terceira posição mundial na produção comercial de cogumelos, por apresentarem um elevado valor nutricional, fibras, hidratos de carbono, vitaminas e minerais (GOLAN-ROZEN *et al.*, 2015).

A aplicação do sistema enzimático do *Pleurotus* vem sendo estudado em grande escala no processo de biorremediação, pois este é considerado mais eficiente quando comparado com uso de consórcios de microrganismos não ligninolíticos. Este grupo produz apenas as enzimas peroxidases, manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac), bem como apresentam uma tolerância a temperaturas baixas e alcançam menor atuação negativa da microbiota normal do solo, essas vantagens são primordiais em relação aos outros fungos. Os fungos do gênero *Pleurotus* encontrados nos materiais lignocelulolíticos podem ainda promover não só a degradação e descoloração da vinhaça, bem como dos substratos que possui lignina e celulose, usados para o cultivo de madeira, palha de arroz, folha de bananeira, polpa de café e outros resíduos agrícolas que podem ser reaproveitados e utilizados como ração animal ou na preparação de outros subprodutos (COHEN *et al.*, 2002; GAO *et al.*, 2010).

De forma específica, o *Pleurotus sajor-caju* é biologicamente versátil, pois o mesmo atua na transformação de macromoléculas orgânicas complexas em compostos simples, e assim como os demais fungos da podridão branca, são qualificados pela capacidade de degradar polímeros da lignina em tecidos vegetais. A lignina que é um polímero fenilpropanólico intensamente ramificado de alto peso molecular e biodegradabilidade restrita (PHILIPPOUSSIS *et al.*, 2001; MOORE *et al.*, 2011). Estes fungos ainda apresentam um notável crescimento em processos submersos, sendo também um interessante produtor de fenol-oxidases (BETTIN *et al.*, 2011).

3.3. ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

Os resíduos agroindustriais são ricos em materiais lignocelulósicos que inevitavelmente são produzidos em grandes quantidades por atividades agrícolas e industriais. A maioria desses materiais são parcialmente ou totalmente transformados em poluentes no ambiente. Diante disso surge o interesse nos avanços tecnológicos enzimáticos em favor de transformar essa enorme quantidade de matérias primas em novos produtos (ZOPPAS e MENEGUZZI, 2013).

Especializadas por serem catalisadoras versáteis e eficazes nos complexos biológicos, as enzimas ainda aumentam a velocidade de uma reação química mediante a diminuição da energia livre de ativação, tornando-as diferenciadas já que não interferem nas propriedades termodinâmicas da reação, além de realizar reações específicas, muitas vezes, a uma taxa tão elevada, que pelo método da química tradicional são inacessíveis. Estas são produzidas durante o metabolismo secundário do fungo e atuam na oxidação dos substratos externos às suas células, ainda encontram-se agregadas as biomoléculas, uma vez que apresentam influência catalítica maior que os catalizadores sintéticos ou inorgânicos, em razão da sua especificidade (HOFRICHTER, 2002; RAO *et al.*, 2014).

De modo geral, as enzimas lignocelulolíticas são classificadas como hidrolases e oxidases (Tabela 2), empregadas na degradação lignocelulósica de forma sinérgica e estão contidas num complexo enzimático versátil, bem como caracterizadas pela heterogeneidade de sua composição (SANCHEZ, 2009; LIU *et al.*, 2013). Os atributos dessas enzimas lignocelulolíticas se tornam possíveis na atuação de processos de degradação de resíduos e tratamentos de poluentes, por serem proveitosas em relação aos tratamentos convencionais, além de propiciar menor consumo de energia (DEMARCHE *et al.*, 2012).

Tabela 2- Enzimas fúngicas envolvidas na degradação da lignocelulose.

Enzima	Código da Enzima	Família CAZy ^a	Substrato ^b	Produto ^b
Celobiohidrolase	EC 3.2.1.91	GH6,7	Celulose	Celobiose
Endo-1,4-β- glicanase	EC 3.2.1.4	GH5,7,12,45	Celulose	Celodextrina, glicose
β-glicosidase	EC 3.2.1.21	GH1,3	Celodextrinas	Glicose
Celulose monooxigenase	-	- ^c	Celulose	Celodextrina oxidada
Celobiose desidrogenase	EC 1.1.99.18	-	Celobiose	Celobiono-1,5-lactona
Expansina	-	-	Celulose	Celulose rompida
Endo-1,4-β-xilanase	EC 3.2.1.8	GH10,11,30	Xilana	Xilo-OS, xilose
β-Xilosidase	EC 3.2.1.37	GH3,30,43	Xilo-OS	Xilose
Exo-1,5-α-L-arabinase	EC 3.2.1.-	GH43,93	Arabinana	Arabino-OS, arabinose
Endo-1,5-α-L-arabinase	EC 3.2.1.99	GH43	Arabinana	Arabino-OS, arabinose
α-L-arabinofuranosidase	EC 3.2.1.55	GH3,43,51,54,62	Arabinana, arabino-OS, arabinoxilana	Arabinose
Endo-1,4-β-manase	EC 3.2.1.78	GH5,26	Manana	Mano-OS
β- manosidase	EC 3.2.1.25	GH2	Mano-OS	Manose
Endo-1,4-β-galactanase	EC 3.2.1.89	GH53	Galactana	Galacto-OS, galactose
β-galactosidase	EC 3.2.1.23	GH2,35	Galactana, xiloglucana	Galactose
α-galactosidase	EC 3.2.1.22	GH27,36	Galactomanana	Galactose

^a CAZy, base de dados de enzimas com atividade sobre carboidratos; GH, glicosil hidrolases; CE, carboidrato esterases.

^b OS, oligossacarídeos.

^c Classificação prévia como GH61 (endo- β-1,4-glicanases).

Fonte: LIU *et al.*, 2013.

Tabela 2 - Continuação

Enzima	Código da Enzima	Família CAZy ^a	Substrato ^b	Produto ^b
Xiloglucanase	EC 3.2.1.151	GH12,74	Xiloglucana	Xiloglucana-OS
Oligoxiloglucano redução-celobiohidrolase	EC 3.2.1.150	GH74	Xiloglicana OS	Celobiose (com ou sem substituição da xilosol)
Endo-1,3-1,4- β -glucanase	EC 3.2.1.6 EC 3.2.1.73	GH12,16	β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)-glucana	Gluco-OS
α -L-fucosidade	EC 3.2.1.63 EC 3.2.1.51	GH29,95	Xiloglucana	Fucose
α -glucuronidase	EC 3.2.1.139 EC 3.2.1.131	GH67	Glucuronoxilana	Ácido 4-O-metil glucurônico
Acetilxilana esterase	EC 3.1.1.72	CE1,2,3,5,12	Xilana	Ácido acético
Feruloil esterase	EC 3.1.1.73	CE1	Xilana, arabinana, xiloglicana	Ácidos hidroxicinâmicos
Glucuronoil esterase	EC 3.1.1.-	CE15	Xilana	Ácido 4-O-metil glicurônico
Lacase	EC 3.1.10.3.2	-	Lignina	Radicais aromáticos
Lignina peroxidase	EC 3.1.11.1.14	-	Lignina	Radicais aromáticos
Manganês peroxidase	EC 3.1.11.1.13	-	Lignina	Radicais aromáticos
Versátil peroxidase	EC 3.1.11.1.16	-	Lignina	Radicais aromáticos

^a CAZy, base de dados de enzimas com atividade sobre carboidratos; GH, glicosil hidrolases; CE, carboidrato esterases.

^b OS, oligossacarídeos.

^c Classificação prévia como GH61 (endo- β -1,4-glicanases).

Fonte: LIU *et al.*, 2013.

As ações sinérgicas dessas enzimas ocorrem por endoglucanases (por exemplo, endo-1,4- β -D-glucanases, ou EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações em celulose via clivagem aleatória em locais internos da cadeia de celulose. As exo-glucanases ou celobiohidrolases (CBH, 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolases, ou EC 3.2.1.91) que hidrolisam as ligações em celobiose via clivagem

sequencial tanto de forma redutoras ou não redutoras nas extremidades da cadeia de celulose, e β -glucosidasas (BGL, celobiasas ou EC 3.2.1.21) que especificamente converte celobiose e celooligosacáridos em glicose (BALAT, 2011).

Abdel-Hamid *et al.* (2013), descrevem a função de cada enzima ligninolítica envolvida no conjunto de reações que leva à degradação da lignina, tal conjunto é agrupado entre fenoloxidasas (oxireduções e peroxidases) e enzimas acessórias. As oxireduções como as lacases (Lac, EC 1.10.3.2) catalisam reações de transferências de elétrons, ou seja, reações de oxirredução que promovem a redução de uma molécula ao mesmo tempo que oxida a molécula de interesse e independe do H_2O_2 para atuarem. Já as peroxidases como a lignina peroxidases (LiP; EC 1.11.1.14), manganês peroxidases (MnP; EC 1.11.1.13), e versátil peroxidases (VP; EC 1.11.1.16) catalisam um conjunto de reações oxidativas e hidroxilações utilizando o peróxido de hidrogênio H_2O_2 como aceitador de elétrons. As produtoras de H_2O_2 compreendem as enzimas acessórias, como glicose oxidases (EC 1.1.3.4), piranose-2-oxidases (EC 1.1.3.10), metanol oxidases (EC 1.1.3.13), aril álcool oxidases (AAO; EC 1.1.3.7) e glioxal oxidase (EC 1.1.3.9). As enzimas aril álcool desidrogenase (AAD) e quinona-redutase (QR) reduzem os compostos derivados da degradação da lignina (DASHTBAN *et al.*, 2010; DEMARCHE *et al.*, 2012).

Os fungos basidiomicetos de podridão branca se destacam na degradação da lignina, em razão de suas enzimas extracelulares não serem estereoespecíficas, o que promove a desestruturação da parede celular vegetal da lignina, resultando na conversão de polissacarídeos em açúcares de fácil assimilação. A importância das enzimas ligninolíticas vem sendo estudada por diversos autores, desde a década de 80 onde surgiu a primeira correlação do processo de degradação de xenobiótico com metabolismo ligninolítico a partir do *Phanerochaete chrysosporium*. Este tem potencial de transformação direta dos compostos xenobióticos durante o processo de fermentação, em alguns casos com significativas taxas de mineralização (ZOUARI *et al.*, 2002; AGUIAR e FERRÁZ, 2011).

3.3.1. Lacase (EC 1.10.3.2)

As enzimas lacases (benzenediol: oxigênio oxidoredução, EC 1.10.3.2) pertencem a família das polifenóis oxidases, sendo largamente encontradas em plantas, insetos, bactérias, e fungos filamentosos (EL-BATAL *et al.*, 2015). Apresentam massa molecular que varia de 50-140 KDa e são produzidas pela maior parte dos basidiomicetos, além de abranger quatro íons de cobre

(Cu) presentes em três sítios de ligação, no qual cada íon realiza uma função considerável na reação catalítica que acontece através da oxidação de substrato fenólico, à medida que oxigênio molecular é reduzido a água (MOROZOVA *et al.*, 2007a; MEKMOUCHE *et al.*, 2014).

Estas lacases fúngicas são classificadas em relação ao seu potencial redox, como alto (790 mV), médio (430-710 mV) e baixo (430 mV), pelo qual as possibilitam de transformar compostos tóxicos em metabólicos, através da oxidação desses compostos (PISCITELLI *et al.*, 2011). Entretanto, essas enzimas possuem dificuldades para penetrar o substrato (biomassa) e degradar a lignina, devido ao alto peso molecular. Além disso são capazes de degradar compostos fenólicos da lignina apenas na superfície do substrato. Em contrapartida, estes são incapazes de oxidar os compostos não fenólicos da lignina presente na superfície e de elevado potencial redox, pois geralmente estas enzimas apresentam baixo potencial redox (WIDSTEN *et al.*, 2008). Com o emprego dos mediadores químicos, no qual são compostos de baixa massa molecular que permitem os radicais oxidados reagirem quimicamente com os substratos alvo de elevado potencial redox, essas limitações conseguem serem vencidas, já que esses mediadores agem como substratos intermediários das lacases (RIVA *et al.*, 2006).

Grande parte dessas enzimas são induzíveis, logo os indutores como os compostos aromáticos ou fenólicos relacionados à lignina ou derivados da lignina são responsáveis pelo aumento da produção desta enzima através de processos fermentativos. Um mesmo indutor pode tanto aumentar a produção da lacase para uma determinada espécie de fungo, como não provocar efeito algum em outra espécie. Portanto, o indutor ótimo não é habitual a todos os fungos, a escolha do mesmo irá depender do fungo estudado (MANN *et al.*, 2015).

A produção da lacase é afetada pelas diferenças fisiológicas que existem nas condições de cultivo e entre as culturas de fungos, bem como nos procedimentos de baixo custo, que tornam aplicação dessas enzimas viáveis (KOCYIGIT *et al.*, 2012). A temperatura ideal de sua atividade, e sua estabilidade varia de acordo com as fontes distintas de enzimas, normalmente mais estáveis em pH ácido (MAJEAU *et al.*, 2010).

3.3.1.1. Caracterização estrutural da Lacase

De acordo com Mekmouche *et al.* (2014), a lacase é uma glicoproteína dimérica ou tetramérica de 520-550 aminoácidos, pertencente à família das enzimas de cobre azul que usualmente contêm 4 átomos de cobre distribuídos em 3 sítios de ligações diferentes (Figura 2). Conforme os estudos efetuados por ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e espectroscopia

UV/visível, este último tem oferecido maiores quantidades de informações acerca dos mecanismos moleculares das proteínas de cobre (MAYER e STAPLES, 2002; MADHAVI e LELE, 2009).

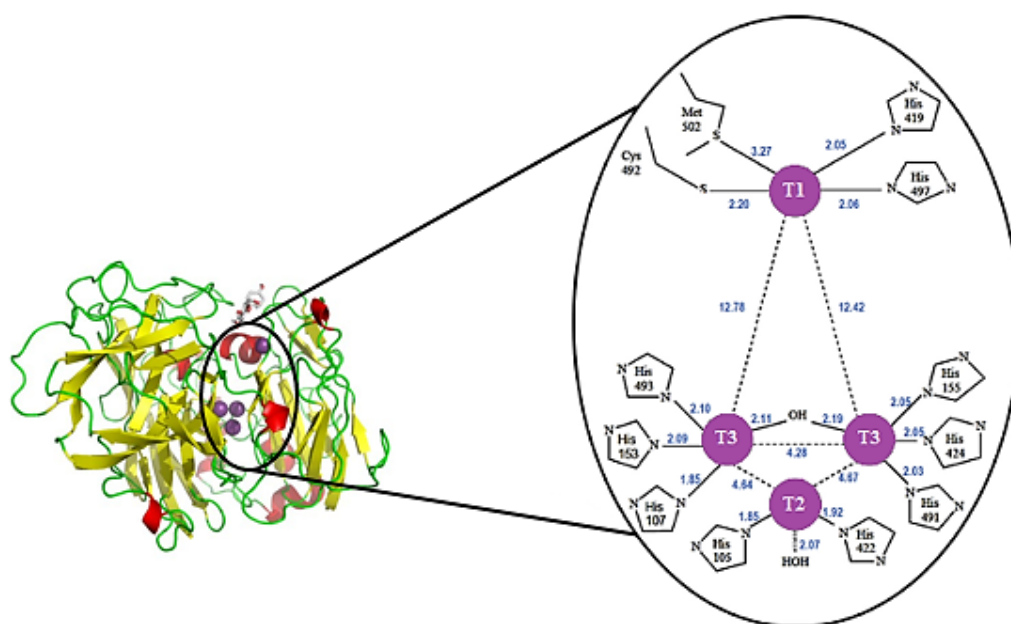


Figura 2- Estrutura tridimensional do sítio ativo da lacase (Lac) pertencente ao gênero *Pleurotus*, que descreve a orientação sobre átomos de cobre e sua distância (azul, distâncias inter atômica em Å), sendo integrado por 4 átomos de cobre distribuídos em 3 centros catalíticos: Cu (T1) e o grupo de Cu tri nucleares (T2-T3).

Fonte: Adaptado de DWIVEDI *et al.*, 2011.

Segundo Thurston (1994) o cobre está sistematizado com duas histidinas e uma cisteína em um arranjo triangular plano. Os átomos de cobre estão classificados em três tipos: cobre tipo 1 (T1), responsável pela oxidação do substrato e está covalentemente ligado a uma cisteína que proporciona a intensa cor azul-esverdeada da enzima, bem como apresenta uma máxima absorvância eletrônica a 610 nm, quando o cobre está no estado cúprico (Cu^{2+}) (GIARDINA *et al.*, 2010; STRONG e CLAUS, 2011). O cobre tipo 2 (T2) que atua como aceitador de um elétron, apresenta fraca absorção na região visível, não sendo detectado por absorção eletrônica, mas tem EPR detectável e o cobre tipo 3 (T3) que não evidencia sinal EPR, constituído por dois átomos de cobre fortemente acoplados e opera como aceitador de dois elétrons, além de ser responsável pela banda a 330 nm. A distância entre o centro T2 e T3 da enzima está entre 4,5- 5,0 Å e o íon de cobre T1 se encontra numa distância de 12-13 Å (POLLEGIONI, 2015).

O mecanismo catalítico da enzima Lac começa com a redução do T1 pelo substrato e, em seguida o cobre ligado à T1 remove elétrons do substrato e os transferem para o T2 e T3, através dos aminoácidos da cadeia polipeptídica que seguem uma sequência de tripeptídeos His- Cys- His, e devido à forte interação entre os T1 e T2 ocorre a redução de uma molécula de oxigênio a duas

moléculas de água no centro ativo desses cobres (Figura 3). A oxidação de quatro moléculas de substrato é necessária para produzir a redução completa de oxigênio molecular para água por meio de sucessivas oxidações monoelétrônicas do substrato (variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas) (BRIJWANI *et al.*, 2010; DESAI e NITYANAND, 2011).

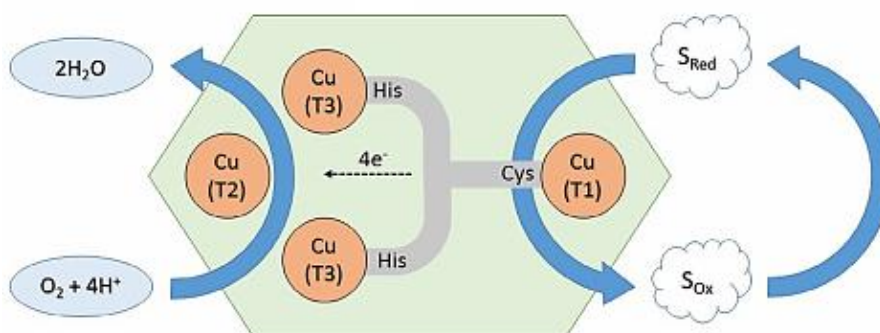


Figura 3- Esquema da reação de mecanismo da lacase.

Fonte: Rodríguez-Delgado *et al.*, 2015.

O processo catalítico da lacase é derivado do processo de oxidação de 4 moléculas de substrato para a produção de quatro radicais, sendo que a transferência de elétrons do substrato para o T1 possivelmente acontece pela diferença de potencial redox entre a lacase (maior potencial) e o substrato (menor potencial), causando neste último uma elevada taxa de oxidação (MADHAVI e LELE, 2009; STRONG e CLAUS, 2011). A remoção do benzenodiol da parte mais externa da cadeia, acontece pelo íon cobre (Cu^{2+}) presente no seu sítio ativo, provocando a formação de radicais fenoxila. Esses radicais atuam em reações catalíticas, como acoplamento radical-radical, desprotonação a ataques nucleofílicos pela água, provocando reações de polimerização de compostos fenólicos e anilinas, quebras e oxidações nos centros ativos assim como desmetilações (VISWANATH *et al.*, 2014). A reação característica da lacase é representada na Figura 4.

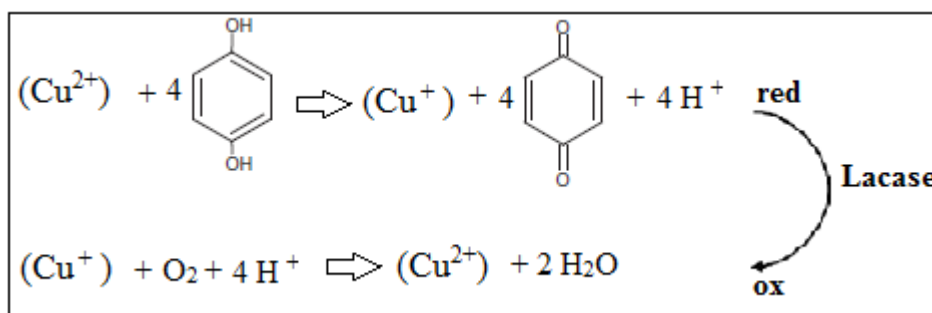


Figura 4- Reação oxidação do substrato pela lacase.

Fonte: Adaptado de MENALE *et al.*, 2012; DEMARCHE *et al.*, 2012.

As lacases possuem um grande potencial biotecnológico (Tabela 3) devido à sua capacidade para oxidar uma ampla gama de substratos que são utilizados em vários setores industriais e ambientais, como: processos da indústria de papel, processamento da madeira, têxtil, alimentos, farmacêutica, técnicas de síntese inorgânica, biorremediação, descontaminação de efluentes, degradação de xenobióticos, produção de detergentes e ainda catalisam a oxidação de vários compostos fenólicos (KUDANGA e LE ROES-HILL, 2014; GIARDINA e SANNIA, 2015).

Tabela 3- Alguns trabalhos que relatam as aplicações da lacase.

Setor	Aplicação	Referência
Indústria Têxtil	Modificação da superfície dos tecidos; branqueamento de tecidos; degradação de efluentes têxteis; síntese de corantes.	(AGHAIE-KHOUZANI <i>et al.</i> , 2012)
Móveis e Indústria da Construção Civil	Reticulação de materiais à base de lignina para obter os painéis de fibras de média densidade.	(ALCALDE, 2007)
Indústria de Celulose e Papel	Despolimezação da lignina; deslignificação da polpa na madeira; biobranqueamento da polpa Kraft; coloração de algodão de celulose ou fibras de linho.	(MOROZOVA <i>et al.</i> , 2007b)
Indústria Alimentar	Processamento de bebidas (vinho, suco de frutas e cerveja); determinação de ácido ascórbico; gelificação da beterraba sacarina pectina.	(OSMA <i>et al.</i> , 2010)
Indústria Cosmética	Preparações dermatológicas para clareamento da pele e tinturas de cabelo; fabricação de desodorantes para os produtos de higiene pessoal.	(TAKASE <i>et al.</i> , 2011)
Biocombustíveis	Desenvolvimentos de célula biocombustíveis; remoção de compostos fenólicos que inibem a fermentação dos açúcares presentes no hidrolisado de materiais lignocelulósicos.	(KUDANGA e LE ROES-HILL, 2014)
Química Orgânica	Acoplamento oxidativo dos radicais intermediários para obter compostos antitumorais e agentes farmacêuticos.	(MOGHARABI e FARAMARZI, 2014)
Biorremediação	Biodegradação ou remoção de componentes xenobióticos nos efluentes industriais.	(ZHENG <i>et al.</i> , 2014)

3.3.2. Manganês-peroxidase (EC 1.11.1.13)

De acordo com Maciel *et al.* (2010), a manganês peroxidase (MnP) é uma enzima extracelular glicosilada de ciclo catalítico similar ao da lignina peroxidase (LiP). Apresenta massa molecular que varia de 40-52 KDa, possui grupo prostético heme e é dependente do peróxido de hidrogênio como co-substrato responsável pela catálise da oxidação de Mn^{2+} a Mn^{3+} (HATAKKA *et al.*, 2005).

O ciclo catalítico da MnP é iniciado pela ligação de H_2O_2 ou um outro peróxido orgânico ao ferro nativo da enzima, formando um complexo ferro-peróxido (Figura 5). A quebra subsequente da ligação O-O do peróxido requer a transferência de 2 elétrons do grupo heme da enzima, que resulta na formação de um radical complexo Fe^{4+} -oxo porfirina (MnP-I). Com a quebra da ligação dos oxigênios, uma molécula de água é liberada, seguida de uma redução que causa a formação do Fe^{4+} -oxo porfirina não radicalar (MnP-II). Esse complexo intermediário ganha 1 elétron do íon Mn^{2+} , sendo assim oxidado a Mn^{3+} . A partir do Mn^{2+} , a redução da MnP-II acontece, e outro Mn^{3+} é gerado, o que leva a formação original da enzima e logo uma segunda molécula de água é liberada (HOFRICHTER *et al.*, 2002).

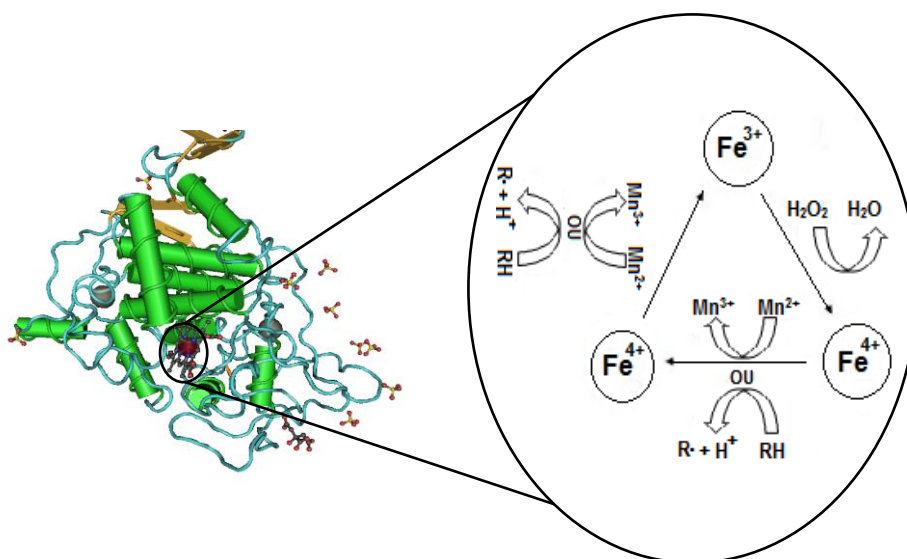


Figura 5- Estrutura tridimensional do sítio ativo da manganês peroxidase (MnP) pertencente ao gênero *Pleurotus*.
Fonte: Adaptado de AGUIAR e FERRAZ, 2011.

Durante a catálise, o Mn^{3+} formado e estabilizado por ácidos orgânicos produzidos pelo próprio fungo, pode deslocar elétrons de vários compostos orgânicos, que abrange também os fenóis, aminas aromáticas, compostos sulfurados e ácidos graxos insaturados de forma inespecífica, levando à formação de radicais altamente reativos, o que possibilita atingir estruturas

recalcitrantes com potencial de redução elevado, embora na presença de intermediários apropriados sua atuação pode ser ampliada também para estruturas não fenólicas (CARVALHO *et al.*, 2009).

A MnP de fungos de podridão branca é considerada uma das principais enzimas envolvidas na biotecnologia, devido à sua capacidade de oxidar vários compostos tóxicos, podendo ainda ser utilizada na biodegradação da lignina, ácidos húmicos, corantes sintéticos, bifenilos policlorados (PCB), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHA) e xenobióticos aromáticos (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Até então, não se revelou qualquer bactéria, levedura e basidiomiceto micorrízico capaz de produzir a manganês peroxidase, sendo aparentemente limitada a certos fungos basidiomicetos. A capacidade de sintetizar a MnP é generalizada entre os diferentes grupos taxonômicos de basidiomicetos (KULIKOVA *et al.*, 2011).

3.4. ECOTOXICOLOGIA

A ecotoxicologia e toxicologia ambiental são ramos que abrangem o estudo e diagnóstico dos efeitos nocivos observados nos organismos vivos, associados a exposição de produtos químicos liberados no ambiente. Como em muitas outras áreas da toxicologia, o estudo deve abranger não só a identificação dos produtos químicos responsáveis pelos efeitos, mas também a fonte desses produtos químicos, a fim de encontrar soluções, aplicando medidas de controle. Este princípio têm uma conexão direta com o objetivo de proteção, já que estes efeitos podem ser desde alterações comportamentais, de crescimento ou reprodução até a morte dos organismos (TARAZONA e RAMOS-PERALONSO, 2014).

Com o intuito de analisar os resultados de uma degradação, especialmente nos resíduos que apresentam uma composição complexa, o teste ecotoxicológico é considerado um método eficiente, já que as respostas biológicas evidenciam efeitos sinérgicos, aditivos, antagônicos e de potencialização que não aparecem em análises físico-químicas ou em avaliações isoladas dos contaminantes. Apesar disso, os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais. Visto que, os testes de toxicidade avaliam o efeito das substâncias tóxicas sobre sistemas biológicos, enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações dessas substâncias. Assim, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam, permitindo uma avaliação integrada da qualidade ambiental de áreas marinhas (RONCO *et al.*, 2004; MOZETO e ZAGATTO, 2009).

Os ensaios de toxicidade ou bioensaios realizados em condições experimentais específicas e controladas em laboratório ou *in situ*, são primordiais para avaliação dos efeitos tóxicos das substâncias químicas, efluentes industriais e amostras ambientais como água e sedimento. Além disso, podem ser utilizados na detecção da toxicidade de agentes químicos presentes nos efluentes líquidos, estabelecimento de critérios e padrões de qualidade das águas, determinação dos limites máximos de lançamentos de efluentes líquidos em corpos hídricos, caracterização e tratamentos de efluentes e resíduos sólidos. Nesses ensaios, os organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de uma determinada amostra e os efeitos tóxicos produzidos são observados e quantificados (COSTA *et al.*, 2008a; BIANCHI *et al.*, 2010).

Os organismos-testes podem ser pertencentes a quatro níveis tróficos já padronizados como mostra a Tabela 4. Estes devem apresentar as seguintes características: seletividade constante e elevada aos contaminantes, elevada disponibilidade e abundância, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade de seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo, ampla distribuição e importância comercial, facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório. Além disso, devem ser utilizadas espécies com fisiologia, genética e comportamento bem estabelecidos, para facilitar a interpretação dos resultados (RONCO *et al.*, 2004; DELLAMATRICE e MONTEIRO, 2006).

Tabela 4- Organismos testes padronizados em diferentes níveis tróficos.

Nível Trófico	Organismo	Espécie
Decompositores	Bactéria	<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Spirillum volutans</i>
Produtores Primários	Alga	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Raphidocelis subcapitata</i>
Consumidores Primários	Microcrustáceo	<i>Daphnia similis</i> , <i>Daphnia magna</i> , <i>Artemia salina</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>
Consumidores Secundários	Peixe	<i>Danio rerio</i> , <i>Pimephales promelas</i>

Fonte: Adaptado de Costa *et al.*, 2008a.

É importante que os testes de toxicidades sejam avaliados por vários representantes da biota aquática, principalmente quando escolhidos de distintos níveis tróficos da cadeia alimentar. Pois são os organismos-testes que vão indicar as concentrações de toxicidade de uma substância ou efluente. Assim, se faz necessário utilizar mais de uma espécie da biota aquática nos ensaios toxicológicos, para que os resultados obtidos com organismo mais sensível sejam comparados e forneçam os níveis de toxicidade dos contaminantes acumulados no corpo hídrico (COSTA *et al.*, 2008a).

Por outro lado, os bioensaios podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição, que pode ser curto (agudo) ou longo (crônico), ou ainda com relação ao efeito: modo de efeito (morte, crescimento ou germinação/reprodução) e resposta do efeito (sub-letal ou letal). Na exposição aguda mede-se os efeitos de agentes tóxicos causadas por uma amostra simples ou composta, em relação a um período de vida menor do organismo-teste, geralmente de 24 a 96 horas, tendo como base de avaliação a letalidade ou a imobilidade total. O resultado é expresso como concentração letal média (CL₅₀) e concentração efetiva média (CE₅₀), que são os valores de concentrações dos agentes tóxicos capazes de provocarem a mortalidade ou imobilidade a 50% dos organismos testes, após o tempo de exposição (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006; MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

Já o tempo de exposição crônica mede os efeitos tóxicos de substâncias químicas causadas por uma amostra simples ou composta, em relação a um período de vida maior do organismo teste, podendo abranger parte ou todo o ciclo da vida, normalmente o tempo de exposição é de 1/3 do seu ciclo. Os resultados obtidos são expressos como CENO (concentração de efeito não observado) ou CEO (concentração de efeito observado), que são os valores de concentrações sub-letais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos testes sob condições de exposições prolongadas, porém essa exposição afeta nas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação destes organismos (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

O órgão responsável pelo desenvolvimento e divulgação de protocolos de testes de toxicidade no Brasil é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Entretanto, os ensaios de toxicidade também são padronizados pela companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), sendo a resolução nº 357 a mais importante devido o estabelecimento das condições e padrões de lançamento de efluentes domésticos e industriais no ambiente aquático (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Na realização dos ensaios toxicológicos deste trabalho, foram escolhidos organismos-testes da biota vegetal e aquática, como as sementes de alface (*Lactuca sativa*) e *Raphidocelis subcapitata*, respectivamente, já que os bioensaios com diferentes organismos são uma forma sensível de avaliar o potencial de riscos ambientais dos contaminantes, sem a necessidade de grandes investimentos.

3.4.1. *Lactuca sativa* L.

Dentre as sementes vegetais mundialmente conhecidas, destaca-se a semente de alface (*Lactuca sativa* L.) pertencente à família *Asteraceae*, sendo a alface a principal hortaliça do Brasil considerada de grande importância na alimentação, pois são providas de fonte de vitaminas, sais minerais e fibra, o que influencia de forma positiva a saúde humana (SILVA *et al.*, 2008).

Por várias décadas, estudos sobre a fisiologia de germinação das sementes desta espécie vem sendo abordados entre os especialistas, devido à sua complexidade. A germinação depende de diversos fatores como: temperatura, água, oxigênio, luz, ausência de microrganismos, tipo de solo e profundidade de semeadura, dentre outros. A característica fisiológica das sementes é a primeira condição a ser analisada para obtenção de uma boa germinação. Quando hidratadas, as sementes saem do seu estado de dormência (inabilidade da semente germinar a condições favoráveis) e dá início à fase de germinação, onde as sementes serão submetidas a breves oscilações fisiológicas, tornando-as sensíveis a qualquer estresse ambiental (NASCIMENTO, 2002).

O uso dessas sementes em bioensaios de toxicidade para testar os efeitos tóxicos das amostras sobre a germinação e crescimento da raiz, têm se mostrado excelentes organismos testes. Uma vez que apresentam vantagens no que diz respeito a estocagem das sementes, por passar longos períodos sem perder sua viabilidade, são testes simples, rápidos e confiáveis, além de apresentarem baixo custo e não requerer equipamentos com infraestrutura complexa (VALERIO *et al.*, 2007). Diversos estudos prévios na literatura relataram o uso da *Lactuca sativa* em bioensaios (Tabela 5).

Tabela 5- Algumas aplicações de bioensaios de toxicidade com semente de alface (*Lactuca sativa*).

Aplicação	Referência
Avaliação da toxicidade em resíduos têxteis	(DELLAMATRICE e MONTEIRO, 2006)
Avaliação da toxicidade em solos com nutrientes	(PEZZAROSSA <i>et al.</i> , 2007)
Avaliação da toxicidade de metais mutagênicos em plantas	(MONTEIRO <i>et al.</i> , 2009)
Avaliação da toxicidade de nanopartículas de metal	(DOOLETTE <i>et al.</i> , 2015)
Avaliação da toxicidade em resíduos sólidos	(ANDRADE <i>et al.</i> , 2010)
Avaliação da toxicidade em extratos naturais	(CHAPLA e CAMPO, 2010)
Avaliação da toxicidade em águas com metais	(CHARLES <i>et al.</i> , 2011)
Avaliação da toxicidade em solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo	(TANG <i>et al.</i> , 2011)
Avaliação da toxicidade em efluentes domésticos	(ZALTAUSKAITE <i>et al.</i> , 2011)
Avaliação da toxicidade em solos agrícolas com metais	(LIU <i>et al.</i> , 2014; SACRISTÁN <i>et al.</i> , 2015; TANG <i>et al.</i> , 2016)
Avaliação da toxicidade em solos com biocombustíveis	(BAMGBOSE e ANDERSON, 2015)
Avaliação da toxicidade de cionobactérias/cianotoxinas em sistemas aquáticos	(FREITAS <i>et al.</i> , 2015)

3.4.2. *Raphidocelis subcapitata*

A espécie *Raphidocelis subcapitata* (antiga *Pseudokirchneriella subcapitata*) pertencente ao filo *Chlorophyta* são algas verdes e unicelulares de água doce, apontadas como organismos modelo de água doce e largamente utilizadas em bioensaios de toxicidade de poluentes ambientais que inibem o crescimento de algas, devido ao seu ciclo de vida curto, resposta sensível, cultivo de baixo custo e fácil crescimento em condições laboratoriais. Sua reprodução é através de auto-esporos, de forma assexuada (ARUOJA *et al.*, 2009; KACZALA *et al.*, 2011).

O teste empregado para este organismo é realizado de modo estático (não há renovação das soluções padrões ao longo do período de exposição). Seu cultivo está susceptível a certas condições ambientais que envolvem luz, oxigênio, temperatura e disponibilidade de nutrientes. Quando exposta a ambientes com fracos índices de oxigênio e ausência de luz, seu desenvolvimento torna-se limitado. Além de serem adequadas para a alimentação dos microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Os bioensaios com *R. subcapitata* já foram bastante utilizados em vários estudos da literatura, como elencado na Tabela 6.

Tabela 6- Exemplos da aplicação de bioensaios toxicidade com *R. subcapitata*.

Aplicação	Referência
Avaliação da toxicidade em nanopartículas	(ARUOJA <i>et al.</i> , 2009)
Avaliação da toxicidade em extratos medicinais	(VANNINI <i>et al.</i> , 2011)
Avaliação da toxicidade em derivados de petróleo	(DEBENEST <i>et al.</i> , 2012)
Avaliação da toxicidade em fármacos	(NIE <i>et al.</i> , 2013)
Avaliação da toxicidade de gases atmosférico	(PIRES <i>et al.</i> , 2014)
Avaliação da toxicidade em herbicidas	(TASMIN <i>et al.</i> , 2014)

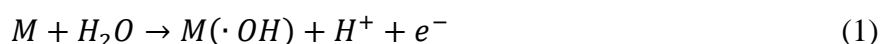
Tabela 6- Continuação.

Aplicação	Referência
Avaliação da toxicidade de lixiviados em solos	(NIE <i>et al.</i> , 2015)
Avaliação da toxicidade de metais em ambientes aquáticos	(GAO <i>et al.</i> , 2016)
Avaliação da toxicidade em compostos aromáticos	(GLOMSTAD <i>et al.</i> , 2016)
Avaliação da toxicidade em águas correntes	(BALDIGO <i>et al.</i> , 2016)

3.5. OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA

Dentre dos métodos mais potentes utilizados para destruir poluentes orgânicos tóxicos de águas residuais, encontram-se os processos eletroquímicos oxidativos avançados (PEOA's) que se destacam por ser ambientalmente compatíveis, possuir elevada eficiência energética, apresentar versatilidade e viabilidade econômica (SOLANO *et al.*, 2016).

Este processo baseia-se na geração de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), que possuem alto potencial redox ($E^\circ = 2,8 \text{ V/SHE}$ - eletrodo padrão de hidrogênio), capazes de mineralizar completamente os compostos orgânicos em CO_2 , água e íons orgânicos ou convertê-los em compostos orgânicos biodegradáveis, não sendo necessário qualquer purificação adicional dependendo das condições de operação aplicáveis. O processo eletroquímico mais comum é a oxidação eletroquímica (OE), em que os poluentes orgânicos podem ser diretamente oxidados na superfície do ânodo (M) e/ou mais rapidamente destruído pelo radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) formado a partir da oxidação da água em altas correntes aplicadas, como mostra a Equação 1 (BRILLAS *et al.*, 2010; DBIRA *et al.*, 2015).



Os poluentes podem ser removidos por oxidação direta e/ou indireta (Figura 6). Na oxidação eletroquímica direta ocorre transferência de elétrons diretamente para a superfície do

ânodo, onde os compostos são fracamente adsorvidos durante o processo de eletrólise (parcialmente oxidados), por causa da formação de uma camada de polímero do composto na superfície do ânodo que conseqüentemente provoca a desativação do eletrodo. Já a oxidação indireta acontece através da geração *in situ* de fortes agentes oxidantes como H₂O₂, O₃, e Cl₂, capazes de oxidarem os poluentes no seio da solução ou na superfície do eletrodo por intermédio de radicais hidroxila formados durante a descarga elétrica da água. Dependendo do material do ânodo, as mediações com os radicais hidroxila podem promover a oxidação parcial ou oxidação seletiva do poluente orgânico e também a sua mineralização completa (COSTA *et al.*, 2008b; MARTÍNEZ-HUITLE e BRILLAS, 2009; FERNANDES *et al.*, 2015).

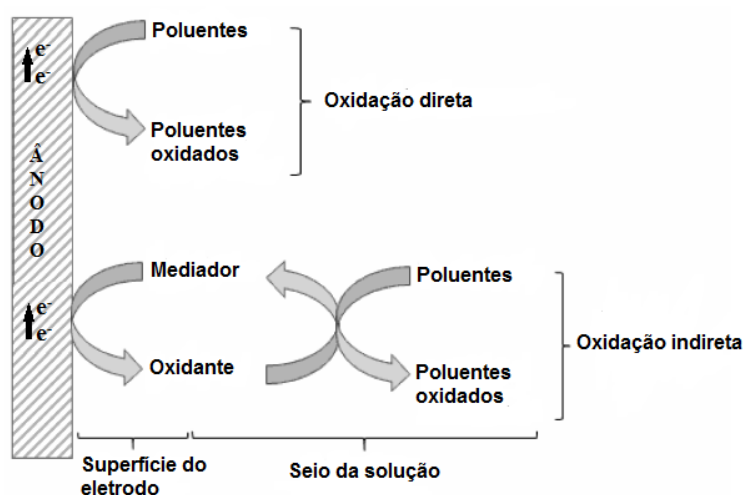


Figura 6- Representação esquemática dos mecanismos de oxidação (direta e indireta) atuantes nos processos de OE.
Fonte: Adaptado de DENG e ENGLEHARDT, 2007.

Além disso, o radical hidroxila pode estar adsorvido quimicamente ou fisicamente sob a superfície do ânodo, na adsorção química os radicais hidroxila reagem com os sítios ativos do óxido do eletrodo (MO_x), logo o mesmo é denominado de “ativo”, tais como os eletrodos Pt, IrO₂ e RuO₂ e possuem baixos sobrepotenciais para o desprendimento de O₂. Na adsorção física o composto orgânico acumulado na superfície do ânodo interage diretamente com o radical hidroxila, favorecendo assim sua mineralização e nesse caso o eletrodo é denominado de “não ativo”, que são o PbO₂, SnO₂ e DDB, apresentando altos sobrepotenciais para o desprendimento de O₂ (BRILLAS e MARTÍNEZ-HUITLE, 2015; SOPAJ *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2016).

A Figura 7 representa os diferentes comportamentos dos ânodos (ativo e não ativo) envolvidos na combustão eletroquímica dos compostos orgânicos, que se inicia com a oxidação

da molécula de água resultando na formação do $\cdot\text{OH}$ durante a reação (a). Logo depois, o radical hidroxila interage fortemente com a superfície dos ânodos ativos, formando o óxido superior (MO) (b). Esse MO atua tanto na oxidação de composto orgânicos (R) (c), quanto na reação de desprendimento de O_2 por meio da decomposição química das espécies de óxido mais elevadas (d). Em contrapartida, nos anodos não ativos o $\cdot\text{OH}$ interage fracamente com a superfície do ânodo, porém reage diretamente com os compostos orgânicos, ocasionando assim sua mineralização total (e). A mineralização também pode concorrer com as reações secundárias que ocorrem de forma direta através da oxidação do O_2 (f) e indireta com a dimerização do H_2O_2 (g) (BRILLAS e MARTÍNEZ-HUITLE, 2015).

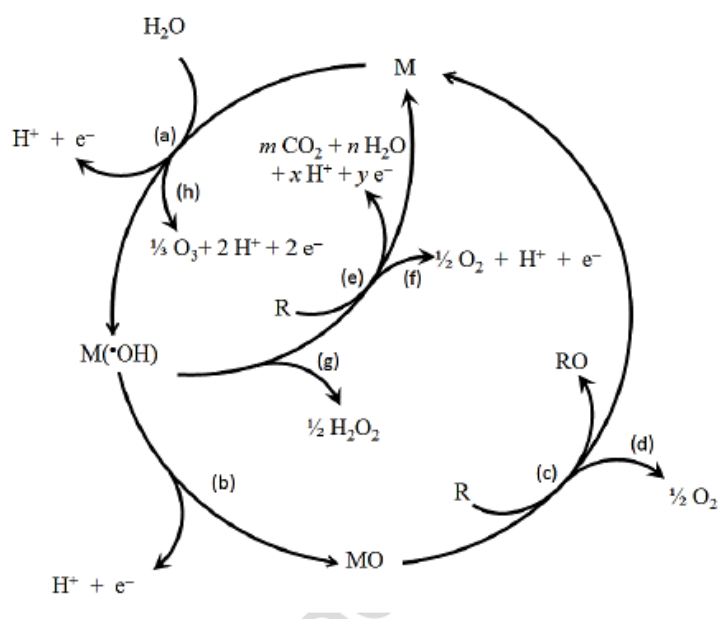


Figura 7- Ciclo de oxidação eletroquímica dos compostos orgânicos.

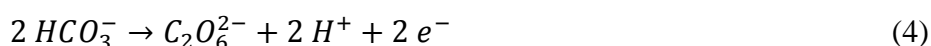
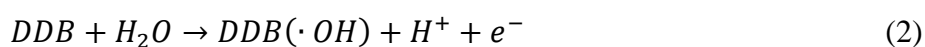
Fonte: Adaptado de BRILLAS e MARTÍNEZ-HUITLE, 2015.

3.5.1. Diamante dopado com boro (DDB)

O material do ânodo influencia na seletividade e na eficiência dos processos de OE, dentre dos diversos materiais de ânodos investigados na literatura, o diamante dopado com boro (DDB) é o mais promissor, devido às suas características químicas, físicas e eletroquímicas que são superiores quando comparado com os outros materiais de eletrodo convencional. Essas características são o alto potencial redox (2,7 V/SHE) que promove uma elevada taxa de oxidação dos produtos orgânicos, ampla janela de trabalho em soluções aquosas (até 3 V) que permite variar diferentes parâmetros eletro analíticos, vida útil longa, elevada estabilidade química em alto potencial eletroquímico, boa eficiência de atividade sem pré-tratamento convencional, resistência

mecânica a meios agressivos (corrosão), e baixa corrente de fundo, o qual proporciona uma detecção altamente sensível de várias espécies químicas (ZHUO *et al.*, 2011; BRILLAS e HUITLE, 2011).

Definidos como eletrodos não ativos, por não possibilitarem qualquer sítio cataliticamente ativo para a adsorção dos reagentes e/ou produtos em meios aquosos, a mineralização completa dos poluentes orgânicos é alcançada por meio dos radicais hidroxila fisiossorvido na superfície do DDB, a partir da oxidação da água (Equação 2) e de outras espécies fracamente oxidantes como o peroxidissulfato, peroxidicarbonato e peroxidifosfato formados pelo sulfato, bicarbonato e fosfato presentes no eletrólito, descritos nas Equações 3, 4 e 5 (BRILLAS *et al.*, 2009; SIRÉS *et al.*, 2014).



3.5.2. Ânodos dimensionalmente estáveis (ADEs)

Os ADEs também têm ganhado cada vez mais destaque nos processos eletroquímicos, uma vez que apresentam elevada atividade catalítica, maior tempo de vida útil, simples fabricação, caráter inócuo e baixo custo de aquisição, quando comparado com o DDB (TURRO *et al.*, 2011; AQUINO *et al.*, 2014). Além disso, possuem capacidade de gerar espécies de cloro oxidantes (Cl₂, HOCl e OCl⁻) quando a eletrólise ocorre em meio contendo cloreto em condições de pH específicas, o que favorece a degradação de diversos compostos orgânicos, mediante a oxidação indireta (SOUZA *et al.*, 2014).

Estes ânodos ativos consistem de um substrato subjacente metálico, geralmente inerte e barato como o titânio (Ti), que são comumente utilizado como eletrodo para decomposição da água, bem como no desenvolvimento de um eficiente sistema de oxidação na remoção de contaminantes orgânicos, já que apresenta alto sobrepotencial de oxigênio (TiO₂), o qual promove forte adesão ao suporte e subsequente proteção contra corrosão (RAO e VENKATARANGAIAH, 2014). Ademais, esse metal base é revestido com finas camadas condutoras de óxidos mistos de Pt, Ru, Pd, Ir, Sn, Ta e Sb, a fim de melhorar a estabilidade do eletrodo e as propriedades catalíticas (BRILLAS e MARTÍNEZ-HUITLE, 2015). A anodização é o método que permite a aplicação

dessas películas uniformes, resistentes e adesivas sobre o suporte metálico, durante a eletrólise (SHIN *et al.*, 2013).

A dopagem de ânodos com diferentes misturas de óxidos metálicos, surge como uma alternativa atrativa para melhorar as propriedades de divisão da água e capacidade de adsorção dos radicais hidroxila, assim como elevar a condutividade e estabilidade do eletrodo por integração de átomos e íons em sua rede estrutural (DONG *et al.*, 2014). Dentre os metais combinados, o ânodo de dióxido de estanho dopado com antimônio (Sb-SnO₂) têm ganhado destaque por favorecer o desempenho eletroquímico com altas sobrecargas de oxigênio e promover subprodutos com baixa toxicidade (SHAO *et al.*, 2016). No entanto, durante o processo eletrocatalítico ocorre a formação de uma camada resistente de TiO₂, devido à fraca interação iônica, o que impede a durabilidade do eletrodo (ZHAO *et al.*, 2009). Neste contexto, o estudo da influência dos óxidos (composição e natureza do revestimento) na dopagem de ADEs, associado a oxidação do radical hidroxila com concomitante reação de evolução de oxigênio na superfície do eletrodo (MO_x), é uma combinação favorável para melhoria da estrutura de eletrodos e redução da banda gap, além de aumentar a resistividade dos mesmos e promover maiores eficiências farádicas em múltiplos processos eletroquímicos (BERENGUER *et al.*, 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo estão relatados os materiais e procedimentos experimentais utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho. Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Tratamentos de Resíduos e Efluentes (LTRE), localizado no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) da Universidade Tiradentes (UNIT), situado no campus Farolândia/Aracaju- SE.

4.1. VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A vinhaça de cana-de-açúcar utilizada neste trabalho foi coletada em setembro de 2015 (safra 2014/2015), gentilmente cedida pela Usina Campo Lindo, localizada na cidade de Nossa Senhora das Dores, Sergipe, Brasil (10°29'30"S,37°11'36"O). Este resíduo foi recolhido em galões de 5 litros sendo mantido em câmara fria a 4°C para que não ocorresse ação de microrganismos até seu uso. Para realização dos testes, a vinhaça foi descongelada até atingir a temperatura ambiente e logo depois esterilizada em autoclave à 121°C por 15 min.

4.2. MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO

Utilizou-se a linhagem *P. sajor-caju* (Figura 8) presente no estoque do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do ITP/UNIT, sob o código CCB 020. A escolha desse fungo aconteceu em virtude da sua eficiência na degradação dos compostos recalcitrantes presentes na vinhaça, quando comparado a outros fungos ligninocelulolíticos (FERREIRA *et al.*, 2011). Este basidiomiceto foi mantido em culturas desenvolvidas em extrato de malte-ágar (MEA), e refrigeradas a 4°C.



Figura 8- Fase vegetativa (micelial) do fungo basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 crescido em placa de Petri.

4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO DA LINHAGEM

No decorrer dos experimentos, os fungos foram semanalmente repicados para manutenção e viabilidade da linhagem, e inoculados em meio sólido MEA (Malt Extract Agar; EMD Chemicals®), constituído de 30,0 g/L de extrato de malte, 3,0 g/L de peptona de farinha de soja e 15,0 g/L de ágar. Em seguida, foram adicionados 1000 mL de água destilada e posteriormente autoclavado a 1 atm e 121°C, por 15 min. A transferência do inóculo ocorreu por meio da utilização de pinças esterilizadas pelo bico de Bunsen, em câmara de fluxo laminar horizontal (Pachane, PA 100). Esta foi realizada selecionando-se placas de Petri, contendo 10 mL de meio MEA para a extração de um disco de micélio no centro de cada placa. Após a repicagem, o material foi mantido a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) em estufa de incubação (Tecnal, TE 381), durante 7 dias (Figura 9) (FERREIRA *et al.*, 2011).

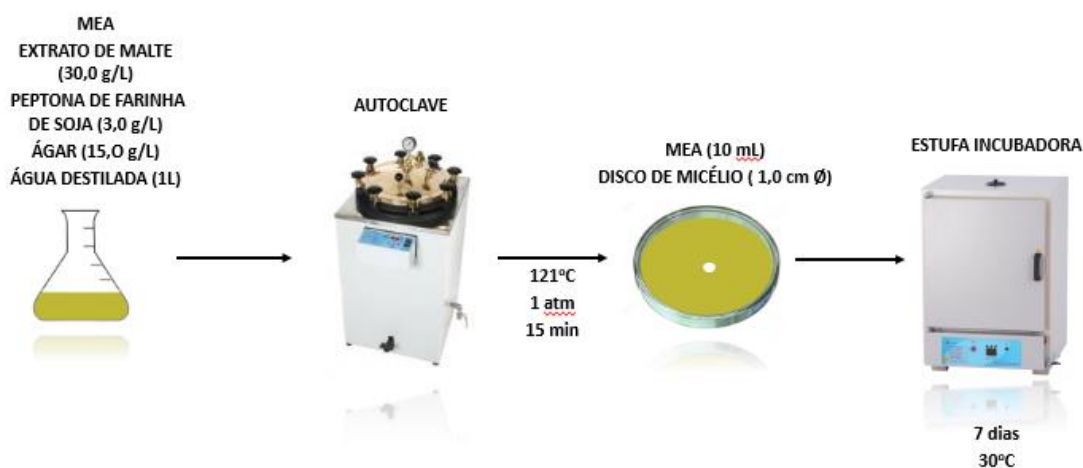


Figura 9- Metodologia das condições de cultivo do *Pleurotus sajor-caju*.

4.4. CULTIVO DE *P. SAJOR-CAJU* EM FRASCOS AGITADOS CONTENDO VINHAÇA

Os fungos foram inoculados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de vinhaça com o pH corrigido para 6, utilizando soluções de NaOH (2,5 M). Em seguida, estes materiais foram autoclavados por 15 min, a 121°C e 1 atm. Após atingirem temperatura ambiente, os frascos foram inoculados com três discos (1,0 cm \varnothing) de meio de cultura contendo os micélios dos fungos utilizados, acrescidos de 5 g de glicose. O controle consistiu no material sem a inoculação dos microrganismos. Os frascos foram incubados por até 15 dias em incubadora (Tecnal, TE 420) com agitação orbital de 180 rpm, a 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), sob condição de escuro, sendo as amostras retiradas a cada 3 dias (Figura 10) (FERREIRA *et al.*, 2011).



Figura 10- Metodologia da inoculação do *Pleurotus sajor-caju* em frascos agitados, contendo vinhaça.

4.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CRESCIMENTO FÚNGICO

As amostras foram analisadas a cada três dias durante o período de 15 dias. Três frascos Erlenmeyers foram retirados após 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação e filtrados a vácuo em papel de filtro Whatman nº 1 (85 mm \varnothing). O sobrenadante foi transferido para tubos Falcon de 50 mL, a biomassa acomodada em placas de Petri e congelada, para posteriormente ser quantificada em relação ao seu peso seco. As atividades das enzimas ligninolíticas (Lac e MnP) expressa em unidades internacionais por litro de caldo enzimático (UI/L), foram determinadas mediante ao sobrenadante, sendo os ensaios realizados em triplicata e as leituras de absorvância efetuadas com auxílio de espectrofotômetro FEMTO 432 (Figura 11) (FERREIRA *et al.*, 2011).



Figura 11- Acompanhamento analítico das amostras no decorrer do tratamento da vinhaça.

4.5.1. Determinação da atividade da Lacase (Lac)

A atividade de lacase foi determinada a 30°C usando mistura contendo 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M (pH 5,0), 0,1 mL de solução contendo siringaldazina, que é o iniciador da reação e 0,6 mL da solução enzimática bruta (sobrenadante). A oxidação da siringaldazina foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 525 nm após 10 minutos de reação (SZKLARZ *et al.*, 1989). Foram utilizados tubos de ensaio de 10 x 100 mm, tanto para amostra não fervida quanto para amostra fervida (controle negativo). Os resultados obtidos foram avaliados pelo cálculo da atividade enzimática (item 4.5.3).

4.5.2. Determinação da atividade da Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade de MnP na solução enzimática bruta, foi determinada avaliando-se a oxidação do vermelho de fenol, conforme a metodologia de Kuwahara *et al.* (1984). Para isso, a reação foi formada por 0,1 mL de tampão lactato de sódio (0,25 M), 0,05 mL de solução de MnSO₄ (2,0 mmol L⁻¹), 0,05 mL de H₂O₂ em tampão succinato de sódio a 0,2 M (pH 4,5), 0,2 mL de albumina bovina (0,5%), 0,6 mL da solução enzimática bruta (sobrenadante), a reação foi iniciada com a adição de 0,1 mL de vermelho de fenol (0,1%). Foi adicionado 0,04 mL de NaOH (2,0 N) como solução “stop” da reação após 10 minutos da primeira leitura, em seguida a absorbância foi medida a 610 nm, e os resultados determinados pelo cálculo da atividade enzimática (item 4.5.3).

4.5.3. Fórmula para cálculo das atividades enzimáticas

No cálculo da atividade cinética da produção da Lac e MnP, os valores médios das triplicatas de absorbância foram utilizados na Equação 6.

$$\text{Atividade Enzimática (UI/L)} = \frac{\Delta Abs}{\varepsilon \cdot V \cdot t} \cdot 10^6 \quad (6)$$

Onde:

UI/L = Unidade internacional, onde internacional significa $\mu\text{mol min}^{-1}$

ΔAbs = Absorbância [$Abs_{\text{final}}(T 10) - Abs_{\text{inicial}}(T 0)$]

ε = Coeficiente de absorção molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

V = Volume de solução da amostra (mL)

t = Tempo de reação (minutos)

O coeficiente de absorção molar ($\epsilon_{525 \text{ nm}}$) da Lac é $65000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, enquanto que para a MnP o coeficiente de absorção molar ($\epsilon_{610 \text{ nm}}$) = $4460 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.5.4. Determinação da descoloração da vinhaça

O sobrenadante acumulado após a remoção da biomassa fúngica foi filtrado, e teve sua absorbância medida ($\lambda = 475 \text{ nm}$) empregando-se um espectrofotômetro FEMTO 432, com intuito de avaliar a descoloração da vinhaça. De acordo com Equação 7 de Sirianuntapiboon *et al.* (1995), a descoloração foi calculada.

$$\text{Descoloração (\%)} = \left[\frac{(\text{absorbância inicial} - \text{absorbância final})}{\text{absorbância inicial}} \right] \times 100 \quad (7)$$

4.5.5. Quantificação da biomassa micelial

A biomassa fúngica foi quantificada por método de gravimetria (Figura 12) em balança analítica (Radwag AS 220/C/1), sendo seca a 45°C por 6 h até atingir peso constante, e depois foi feita a subtração do peso final pelo inicial, para obtenção do peso total expresso em g/L.



Figura 12- Metodologia da determinação da biomassa seca.

4.6. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA IN NATURA E TRATADA

Foram mensurados os parâmetros físicos como a condutividade elétrica e turbidez. Já os parâmetros químicos encontram-se pH, carbono orgânico total (COT), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), fenóis totais, fósforo total, nitrogênio total, potássio, sólidos totais, sulfatos e cálcio (APHA, 2012).

4.6.1. Determinação do pH, turbidez e condutividade elétrica

As medidas do pH foram efetuadas com auxílio de um pHmetro digital da Gehaka, modelo PG 1800 para verificar a quantidade de íons H⁺ presentes na amostra. A turbidez foi determinada com turbidímetro TB-1000p na finalidade de comparação da intensidade de luz dispersa pela amostra, em relação a presença de partículas suspensas, os valores das leituras foram expressos em NTU (unidade de turbidez nefelométrica). E por meio da condutividade elétrica, utilizando um Microprocessor Conductivity Meter HI2300 foi possível determinar a quantidade de sais presentes nas amostras da vinhaça definidos em µS (microsiemens). Essas análises foram realizadas depois da estabilização da temperatura em torno de ± 25°C.

4.6.2. Determinação de DBO

A DBO foi determinada empregando-se a metodologia descrita pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). As amostras são preparadas em garrafas específicas para DBO, com auxílio do oxímetro (medidor de oxigênio dissolvido), em 300 mL de amostra (homogênea), as mesmas foram incubadas durante 5 dias a 20 °C, na ausência da luz, sob agitação constante. Através da técnica eletroquímica no início e final do período de incubação é possível definir a concentração de oxigênio. Essa diferença é utilizada considerando o fator de diluição, conforme a Equação 8.

$$DBO (m g/L) = \frac{[(OD_{inicial} - OD_{final}) - Fc] \times Volume\ do\ frasco\ de\ DBO}{Volume\ da\ amostra} \quad (8)$$

Onde:

OD = oxigênio dissolvido

Fc = Fator de correção (OD inicial do branco – OD final do branco)

4.6.3. Determinação de DQO

Para a determinação de DQO, foi utilizado o método recomendado por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012), que deu início a análise com a adição de 1,5 mL da solução digestora ($K_2Cr_2O_7/H_2SO_4/Hg_2SO_4$) ao tubo de DQO, 2,5 mL da amostra pura e 3,5 mL de solução catalisadora (H_2SO_4/Ag_2SO_4) no mesmo tubo, posteriormente realizou-se o fechamento da tampa de todos os tubos, sendo homogeneizados e aquecidos a 150°C por 120 minutos. Ao término do resfriamento, foi possível realizar no espectrofotômetro de UV/VIS a leitura de absorção das amostras, num comprimento de onda de 600 nm, e a partir da curva de calibração ($C_8H_5KO_4$) obter o teor de matéria orgânica (Equação 9).

$$DQO (mg O_2/L) = Abs \times Fator \ de \ diluição \quad (9)$$

4.6.4. Determinação de fenóis totais

Foram acrescidos 100 mL de amostra em funil de separação de 250 mL, ajustando o pH para $3,5 \pm 11,5$ com ácido sulfúrico (0,5 N) ou hidróxido de sódio (0,5 N) quando preciso. Em seguida, foram adicionados 5 mL de tampão fosfato, bem como 1,2 mL de 4-aminoatipirina sendo homogeneizado até sua dissolução. Logo após, foram adicionados 1,2 mL de solução de Ferricianeto de potássio e agitado vigorosamente, deixando em repouso por 15 min, e por último 10 mL de clorofórmio foi adicionado e toda solução foi agitada 10 vezes rapidamente. Depois de um intervalo de 15 minutos, foi realizada a leitura da amostra no espectrofotômetro num comprimento de onda de 460 nm, numa cubeta de 10 mL e caminho ótico de 1cm, contra uma prova em branco feita com todos os reagentes e água (APHA, 2012). O teor de fenóis (como fenol) foi determinado baseado na curva padrão de calibração, conforme a Equação 10.

$$Fenóis (mg C_6H_5OH /L) = Fator \ angular \times Abs \times Fator \ de \ diluição \quad (10)$$

4.6.5. Determinação de fósforo total

No início da análise, as amostras foram homogeneizadas e mediante a uma membrana de 0,45 μm , filtradas. Em seguida, 100 mL de cada amostra foi adicionada em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 1,0 g de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) ou 0,8 g de persulfato de amônia ($(NH_4)_2S_2O_8$) e 4,0 mL de H_2SO_4 , com concentração de 5 N para neutralização. Logo após, essa mistura foi aquecida durante 30/40 min, evitando que o volume da mesma fique abaixo de 20 mL,

seguidamente ao ser resfriada ao atingir temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada uma gota de fenolftaleína ($\pm 0,05$ mL) e acrescida da solução de NaOH, afim da neutralização (solução rósea). O volume total da solução foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e seu volume completado com água destilada. Depois, houve transferência de 50 mL de amostra digerida para Erlenmeyer de 250 mL, adicionados uma gota de fenolftaleína e 8,0 mL do reagente combinado, ficando a solução em estado estacionário durante 15 minutos. Após esse período, uma alíquota da mistura foi medida numa absorvância a 880 nm, sendo a prova em branco a solução de referência (APHA, 2012). A partir da curva padrão de calibração, foi possível obter a concentração de fósforo total expresso em mg P- PO_4^{3-} /L, e o resultado foi corrigido pelo fator de diluição, de acordo com a Equação 11.

$$\text{Fóforo total (mg P - } PO_4^{3-} \text{/L)} = \text{mg P - } PO_4^{3-} \text{/L}_{\text{lido}} \times F_{\text{diluição}} \times 3,06615 \quad (11)$$

4.6.6. Determinação do nitrogênio total

As análises de nitrogênio total foram realizadas através do método descrito no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). O reagente persulfato foi adicionado ao tubo de digestão de solução NaOH (0,1 N), e 2 mL da amostra foram acrescidos à solução, sendo homogeneizada durante 30 segundos. Após o término deste período, o processo de digestão da amostra foi efetuado na estufa à 105°C por 30 minutos, em seguida foram resfriados a temperatura ambiente. No sistema tamponado, os reagentes TN- A (metabissulfato) e TN- B (ácido cromotrópico) foram adicionados, sendo separadamente mantidos sob agitação, ao longo de 15 segundos com duração de 2 minutos de repouso. Depois, foram acrescidos 2 mL da amostra digestora na solução, seguido da homogeneização prolongada, até formar um complexo amarelo com absorvância máxima em 410 nm. O teor de nitrogênio total foi estimado com base em uma curva de calibração linear.

4.6.7. Determinação do potássio

Foi utilizado o método de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), para a quantificação dos teores de potássio. O procedimento de preparo, foi iniciado com a introdução de 100 mL de amostra dentro de um copo de Griffin de 150 mL, acrescido 3 mL de HNO_3 concentrado. Em seguida, a mistura foi aquecida e ponderadamente evaporada até alcançar um volume de 5 mL, posterior ao resfriamento foram adicionados igualmente 3 mL de HNO_3

concentrado, sendo o processo reproduzido várias vezes até atingir um volume de 3 mL e logo adiante foram acrescentados uma razão de 10 mL/100 mL de solução de HCL e por último foi realizada a filtragem da amostra, para ser analisada (APHA, 2012).

4.7. CÉLULA ELETROQUÍMICA

Os experimentos eletroquímicos de degradação da vinhaça biotratada foram conduzidos em uma célula de vidro (Figura 13) com capacidade de 100 mL, fechada com uma tampa de Teflon e submetida à temperatura ambiente ($25,0 \pm 0,5$ °C). A mesma foi composta de contra eletrodo de platina, eletrodo de referência de Ag/AgCl saturado em 3,0 mol/L de KCl, e apresentou volume final de 70 mL. Variou-se os ânodos de trabalhos entre um DDB comercial de 1 cm^2 , com dopagem de 800 ppm, adquirido pelo grupo de pesquisa, e um $\text{Ti}/(\text{RuO}_2)_{0.7}(\text{IrO}_2)_{0.1}(\text{Sb}_2\text{O}_3)_{0.2}$ de 2 cm^2 , sintetizado com rampas de aquecimento de 10 °C/min, com temperatura final de calcinação de 500 °C (ARAÚJO *et al.*, 2017). O tratamento foi realizado por meio de eletrólise (3 h) aplicando-se variadas densidades de corrente ($12,5$, 25 e 50 mA cm^{-2}) e utilizando como eletrólito NaCl ($0,025$, $0,05$ e $0,1 \text{ M}$). As medições eletroquímicas foram realizadas com um potenciostato/ galvanostato da Autolab Methrom (modelo PGSTAT 302 N). Antes das medidas eletroquímicas o eletrodo DDB foi pré-tratado em solução de H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol/L}$) por meio de dois procedimentos eletroquímicos: uma polarização anódica (aplicação de um potencial de $+3,0 \text{ V}$ por 30 s) e uma polarização catódica (aplicação de $-3,0 \text{ V}$ por 120 s) (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2010).

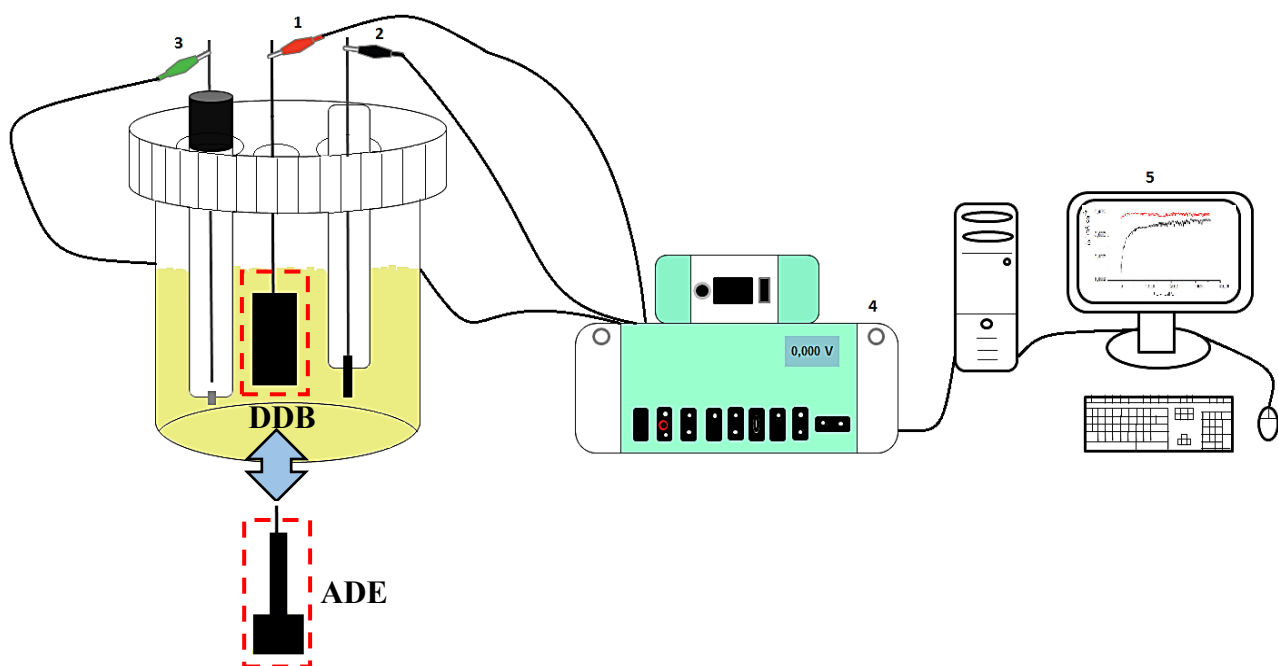


Figura 13- Sistema eletroquímico utilizado para degradação da vinhaça, composto por (1) eletrodos de trabalho (DDB e ADE), (2) eletrodo auxiliar, (3) eletrodo de referência, (4) potenciostato/galvanostato, e (5) computador.

4.8. PREPARO E MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS TESTES

4.8.1. *Raphidocelis subcapitata*

Os exemplares iniciais para o cultivo de *R. subcapitata* foram obtidos das culturas estoque mantidas no Laboratório de Ecotoxicologia do Instituto de Tecnologia e Pesquisa- ITP na Universidade Tiradentes. O meio de cultivo para manutenção de *R. subcapitata*, segue as recomendações de Blaise *et al.* (2000). O cultivo foi feito com macro e micronutrientes indispensáveis ao desenvolvimento desta microalga de água doce, na forma de cinco soluções estoque (Tabela 7).

Tabela 7- Composição do meio de cultivo para *R. subcapitata*.

Solução estoque	Composto	Quantidade em 500 mL
Micro nutriente 1	MgCl ₂ .6H ₂ O	6,08 g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,20 g
	(H ₃ BO ₃) ₃	92,8 mg
	MnCl ₂ .4H ₂ O	208,0 mg
	ZnCl ₂	1,64 mg
	FeCl ₃ .6H ₂ O	79,9 mg
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,714 mg
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3,63 mg
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,006 mg
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	150,0 mg
Macro nutriente 2	NaNO ₃	12,75 g
Macro nutriente 3	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,35 g
Macro nutriente 4	K ₂ HPO ₄	0,522 g
Macro nutriente 5	NaHCO ₃	7,50 g

Fonte: Blaise, *et al.* (2000).

O meio de cultivo continha 1 mL de cada solução estoque para cada 1 L de água destilada, pH de 7 ±0,01 e autoclavado a 121° C por 30 min. Uma porção da cultura sólida de *R. subcapitata* foi transferida para o meio de cultivo sob condições assépticas, em seguida, foi mantida a 25° C (±2° C), com agitação manual três vezes ao dia e luminosidade contínua (4.000 ± 10% lux), por um período de 5 a 7 dias, até atingir a fase exponencial de crescimento. Semanalmente as algas foram sub-culturadas, assegurando o suprimento das células (ABNT, 2005).

4.9. AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA

4.9.1. Bioensaio com *Lactuca sativa*

Os bioensaios com sementes de alface foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Dutka (1989), onde as sementes foram obtidas por meio comercial, previamente sem tratamentos com nenhum tipo de herbicida ou inibidor de crescimento, justamente para evitar interferências na análise. As amostras da vinhaça *in natura* e tratada sofreram 5 diluições em triplicata através da adição de água destilada, ficando as amostras para testes com as seguintes concentrações: 100%, 75%, 50%, 25% e 12,5% (Figura 14). Essa variedade de concentrações serve para indicar resultados com maior precisão, espera-se que, quanto menos concentrada a vinhaça estiver, mais a semente germine e cresça. O controle negativo foi feito com NaCl. Para a solução salina de NaCl pesou-se 2,922 g do sal, que foi dissolvido em um volume de 250 mL, resultando numa solução com concentração 0,2 M. Espera-se que no controle negativo o crescimento seja nulo. Como controle positivo utilizou-se água destilada.

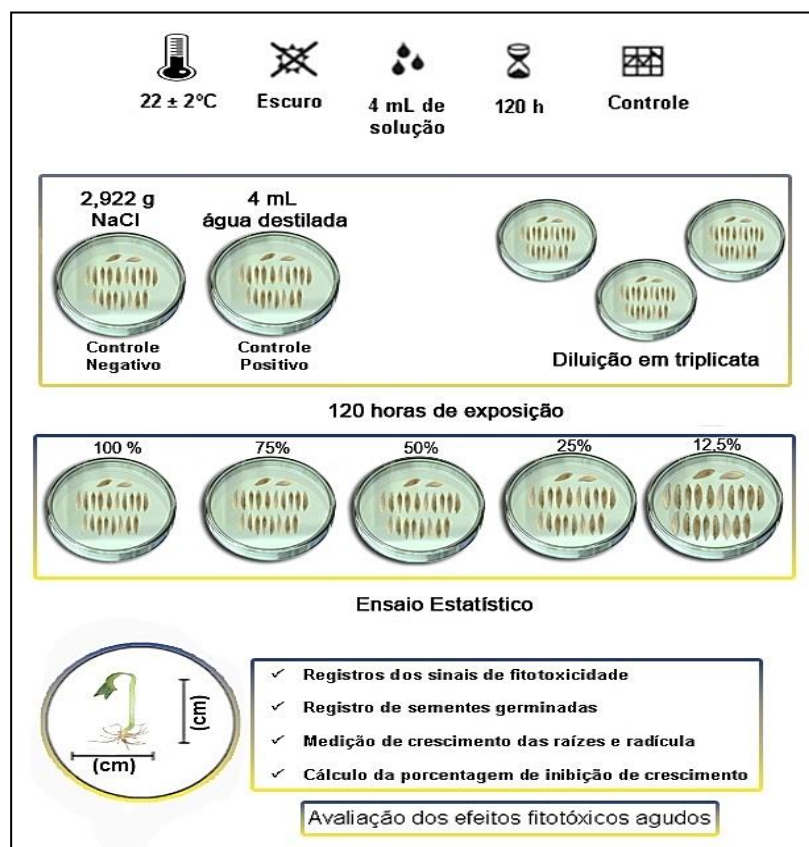


Figura 14- Metodologia do bioensaio com sementes de alface (*Lactuca Sativa*).

Fonte: Adaptado de SOBRERO e RONCO, 2004.

Um disco de papel filtro Whatman nº 1 (85 mm ø) foi colocado em cada placa de Petri, previamente etiquetado coma diluição correspondente. Para cada diluição foram feitas três repetições. O papel foi saturado com 4 ml da respectiva solução de diluição e com a ajuda de uma pinça, 20 sementes de alface foram colocadas sobre o papel, com espaço adequado entre elas para possibilitar o crescimento das raízes. As placas foram fechadas e acondicionadas com papel filme para evitar a perda de água e em seguida foram colocadas em condição de escuro durante 5 dias (120 h) a uma temperatura de 22°C. Após esse período de incubação, foi calculado a concentração efetiva media (CE₅₀) do resíduo por meio do método *trimmed Spearman Karber* (Hamilton *et al.*, 1977).

Além dos efeitos de letalidade, os resultados fitotóxicos também foram avaliados a partir da quantificação relativa e absoluta das sementes germinadas (GR) e (GA), do crescimento relativo das raízes (CRR) e do índice de germinação (IG), de acordo com as Equações 12, 13, 14 e 15, respectivamente.

$$GR (\%) = \frac{N^{\circ} \text{ de sementes germinadas na amostra}}{N^{\circ} \text{ de sementes germinadas no controle}} \times 100 \quad (12)$$

$$GA (\%) = \frac{N^{\circ} \text{ de sementes germinadas na amostra}}{N^{\circ} \text{ de sementes totais}} \times 100 \quad (13)$$

$$CRR (\%) = \frac{\text{Média do crescimento da raiz na amostra}}{\text{Média do crescimento da raiz no controle}} \times 100 \quad (14)$$

$$IG (\%) = \frac{GR (\%) \times CRR (\%)}{100} \quad (15)$$

4.9.2. Biensaio com *Raphidocelis subcapitata*

Para os testes com as amostras de vinhaça *in natura* e vinhaça tratada, populações de *R. subcapitata* do inóculo foram expostas à amostra sem diluição (100%), e conseqüentemente foi diluída em frascos contendo meio de cultivo nas concentrações 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75%, feitas em triplicatas. Os frascos permaneceram vedados com filme plástico transparente e incubados sob luz contínua (4000 ± 10% lux) com lâmpadas frias fluorescentes, por 72 h, realizando agitação manual três vezes ao dia (Figura 15). Após esse período, realizou-se a contagem do número de algas presentes nas amostras testadas, com o auxílio de uma câmara de Neubauer e um microscópico óptico (Carl Zeiss Jena modelo Jenamed 2), para verificar a inibição

do crescimento desses organismos. E o efeito de letalidade ou imobilidade foi calculado pela concentração de inibição (CI_{50}), através do método trimmed Spearman Karber (Hamilton *et al.*, 1977).

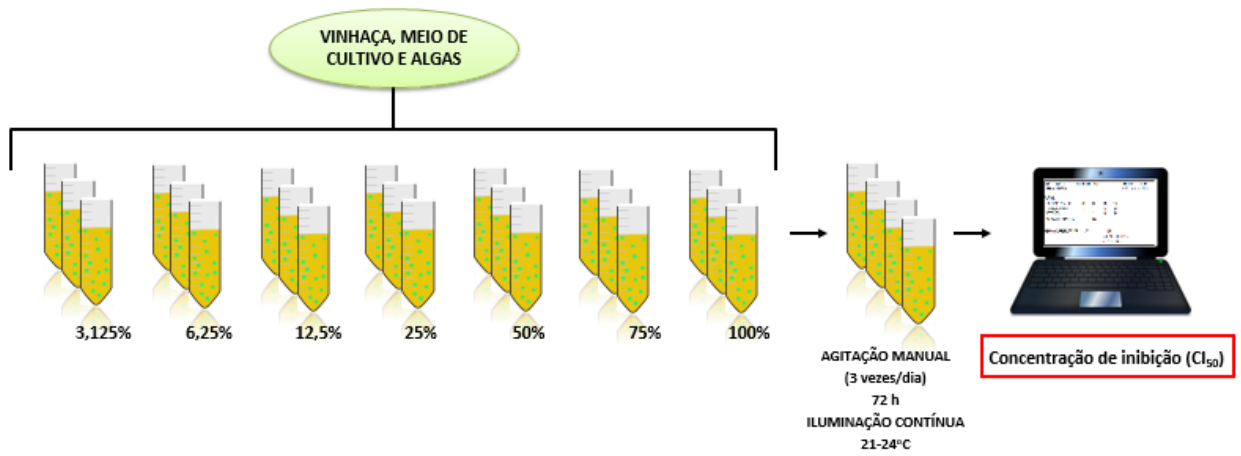


Figura 15- Metodologia do teste de toxicidade com *Raphidocelis subcapitata*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. TESTES PRELIMINARES NO CULTIVO DE *PLEUROTUS SAJOR-CAJU* COM VINHAÇA EM FRASCOS AGITADOS

Nesta seção serão discutidos os testes realizados com dois diferentes tratamentos na vinhaça do caldo de cana-de-açúcar para análises de descoloração, turbidez, atividade enzimática da Lac e MnP, bem como do crescimento microbiano sob o resíduo. Os tratamentos foram nomeados de acordo com sua composição: vinhaça *in natura* com pH corrigido para o valor igual a 6 (Tratamento Sem Glicose-TSG) e vinhaça *in natura* com pH corrigido para o valor igual a 6 + glicose (Tratamento Com Glicose-TCG).

5.1.1. Descoloração e turbidez da vinhaça

A Figura 16A-B mostra que ambos os tratamentos aplicados, visualmente apresentaram descolorações graduais semelhantes durante os 15 dias de fermentação, quando comparadas com a vinhaça *in natura* do caldo da cana-de-açúcar. A cor marrom-escura da vinhaça pode ser justificada pela presença de melanoidinas, que uma vez presentes em meio ácido podem precipitar e serem mais facilmente removidas (RAJASUNDARI e MURUGESAN, 2011). Estes biopolímeros orgânicos recalcitrantes são gerados a partir da reação de Maillard (reação não enzimática) que é caracterizada pela junção de aminoácidos (grupo amino) com carboidratos redutores (grupo carbonila) (NAIK *et al.*, 2010; ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011). Esse escurecimento pode ainda ser atribuído a formação de furfurais pela hidrólise ácida, e caramelos que ocorrem durante o superaquecimento de açúcares (WILKIE *et al.*, 2000; PANT e ADHOLEYA, 2007). Assim, pode-se concluir que o resíduo sofre descoloração à medida que ocorre quebra enzimática dessas moléculas e dos compostos fenólicos, já que estes últimos também são responsáveis pela pigmentação natural do resíduo, em razão da formação de flavonoides (FUESS e GARCIA, 2014).

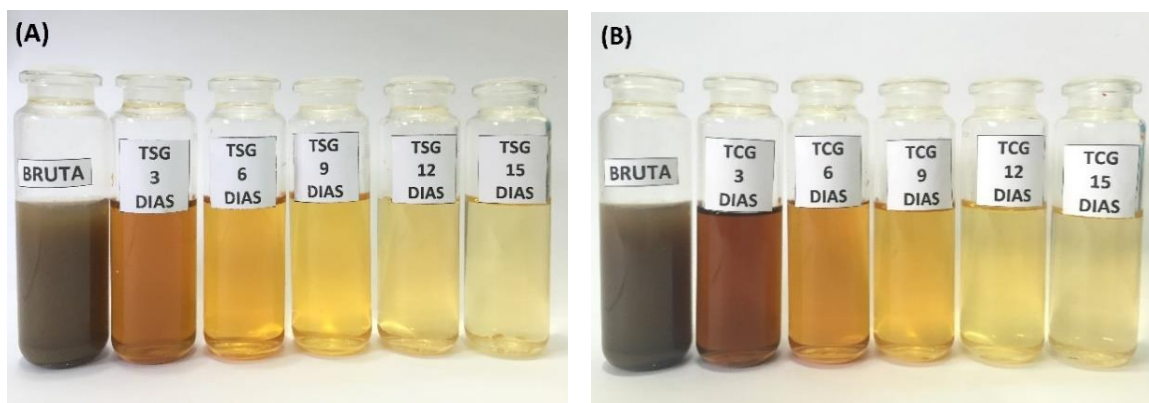


Figura 16- Descoloração da vinhaça *in natura* e após 15 dias de cultivo com TSG (A) e TCG (B) em condições de frascos agitados.

Os resultados expostos na Figura 17 mostram que a partir do 9º dia as taxas de descoloração e turbidez relativa no TSG e TCG permaneceram limítrofes, uma vez que não existem diferenças significativas entre os parâmetros analisados. Os níveis de descoloração máxima para o TSG e TCG coincidiram no 15º dia, variando de 97%-96%, respectivamente, ao mesmo tempo que o da turbidez relativa também obteve maior efeito positivo durante o 15º dia, de 99% (TSG) para 98% (TCG). O que indica que a presença de glicose como substrato (fonte de carbono) para o crescimento do fungo *P. sajor-caju* sobre o resíduo não é fator determinante no processo de descoloração e na redução de turbidez, mostrando ser desnecessário o requerimento nutricional por glicose para que ocorra a degradação da molécula de melanoidina. De forma geral, a presença de açúcares residuais em meio vinhaça, auxilia no crescimento inicial dos fungos (metabolismo primário). No entanto, apenas com a exaustão destes nutrientes é iniciado o processo de sintetização e excreção de enzimas a fim de obter a quebra dos compostos mais complexos presentes na vinhaça. Este processo é evidenciado na fase do metabolismo secundário do fungo, devido à produção de enzimas ligninolíticas (RETES-PRUNEDA *et al.*, 2014).

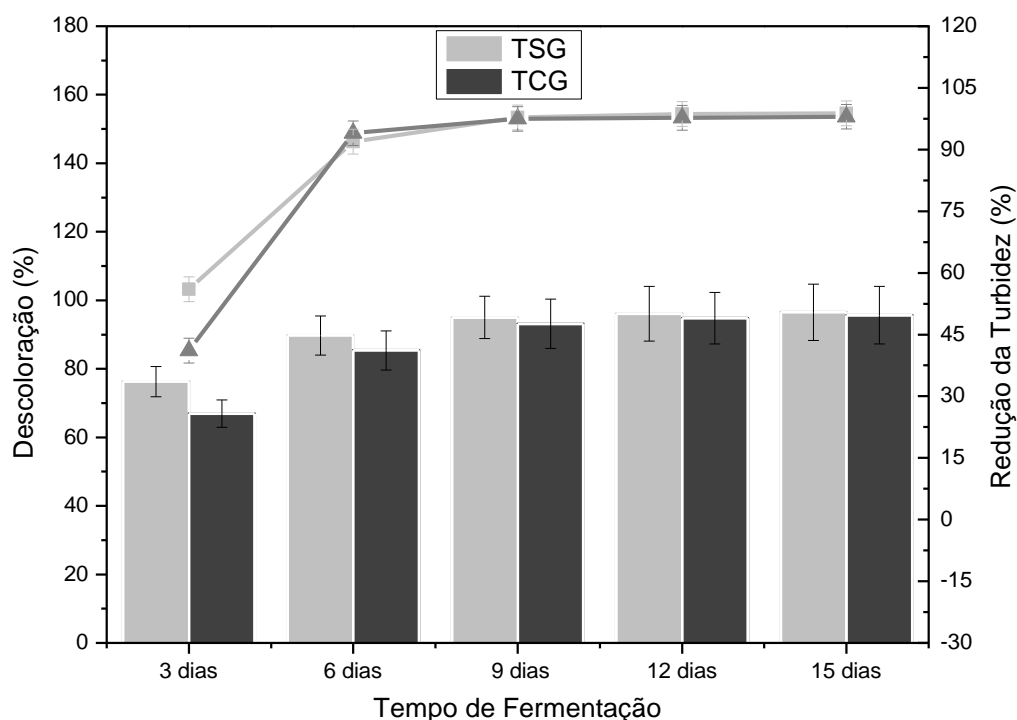


Figura 17- Descoloração e redução da turbidez da vinhaça com os tratamentos TSG (■) e TCG (▲) durante 15 dias de fermentação com *P. sajor-caju* em condições de frascos agitados.

A consistência destes resultados pode ser verificada no estudo de Ferreira *et al.* (2010) que, sob as mesmas condições de cultivo do *P. sajor-caju* em meio vinhaça de mosto misto, alcançaram elevados níveis de descoloração, próximos a 98% (TSG) e 90% (TGC) e de turbidez, entre 99% (TSG) e 95% (TCG). Em outro estudo mais recente, Da Silva *et al.* (2015) utilizaram o fungo *P. eryngii* na biorremediação da vinhaça, e os resultados mostraram uma descoloração de 93% no TSG. Isso só confirma a eficiência dos fungos basidiomicetos como promotores da descoloração da vinhaça e de sua capacidade na degradação de compostos recalcitrantes (STRONG, 2010). Dessa forma, os dados encontrados no presente estudo são promissores, já que foram obtidas elevadas taxas da descoloração, que proporcionaram a diminuição de turbidez e maior biodegradabilidade do resíduo.

5.1.2. Atividade enzimática e biomassa fúngica

A Figura 18 exibe o comportamento das atividades enzimáticas da Lac e MnP e a produção da biomassa no período de 15 dias na presença do *P. sajor-caju*. Pode-se observar que os resultados obtidos mostram que tanto a Lac quanto a MnP tiveram maiores produções no TSG quando comparado com TCG. Para o TSG, a Lac apresentou pico de atividade em cerca de 400 UI/L, enquanto que no TCG seu pico foi de aproximadamente 341 UI/L, respectivamente no 12º dia.

Este fato pode ser justificado, ao uso de substratos, como o monossacarídeo glicose, para a produção da Lac, não sendo o fator principal para promover maior síntese desta enzima, ao passo que a adição desse substrato provocou menor rendimento. Provavelmente, a disposição deste carboidrato foi o maior responsável pela diminuição da atividade da Lac.

Essa diminuição está de acordo com os estudos de Massadeh e Fraij (2010), que observaram uma atividade de Lac máxima de 130 UI/L, utilizando resíduo industrial da produção de azeite de oliva presente em águas residuais como substrato, após 12 dias de incubação com *Pleurotus sajor-caju*. Segundo os autores, a produção dessa enzima foi necessária para a disponibilização de nutrientes provenientes da quebra do resíduo e subsequente crescimento fúngico. Além de confirmar a inespecificidade do sistema enzimático ligninolítico do fungo, já que sua atuação independe da presença de glicose (JURADO *et al.*, 2011).

Em outro estudo, Fokina *et al.* (2016), utilizaram resíduos lignocelulíticos (palha e feno) e meio sintético (sulfato de cobre) a fim de induzir a atividade da lacase do *Pleurotus sajor-caju* para aplicação em células biocombustíveis. Os resultados desse estudo afirmam que os substratos naturais contendo lignocelulose alcançaram melhores atividades enzimáticas (2070-2350 UI/L), em comparação com o indutor sintético, que atingiu 70 UI/L de atividade da Lac. Este fato corrobora com os dados mostrados na Figura 18, onde pode ser observado que o meio não contendo suplementação sintética possui maior necessidade de induzir o microrganismo a ativar seu sistema enzimático, certamente devido ao “stress” nutricional, ocasionando subsequente quebra dos componentes orgânicos poliaromáticos e polifenóis (lignina, ácido húmico e tâmico). Estes devem ser removidos, pois seus efeitos agem de forma inibitório na atividade microbiana e apresentam propriedades antioxidantes, além de causar danos aos organismos (TUNAY *et al.*, 2010; ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011).

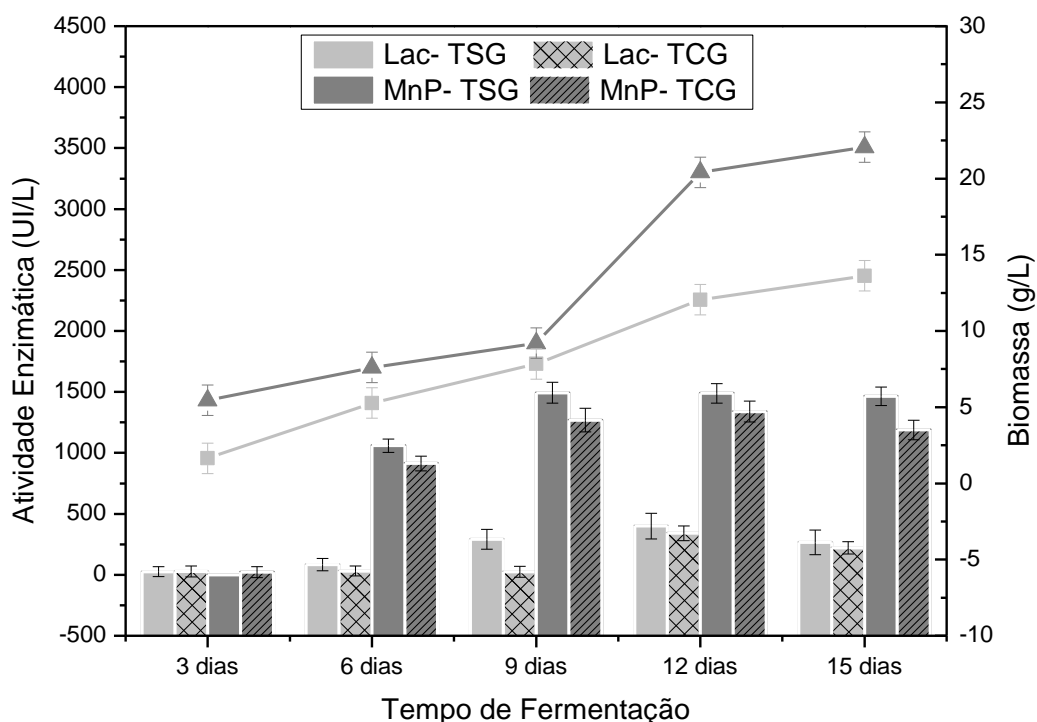


Figura 18- Atividade enzimática da Lac e MnP e a biomassa seca produzida por *P. sajor-caju* no TSG (■) e TCG (▲), durante 15 dias de incubação em condições de frascos agitados.

A respeito da influência da MnP (Figura 18), a mesma tornou-se mais expressiva que a Lac para o TSG, com seu pico estimado em 1494 UI/L no 9º dia, ao mesmo tempo que no TCG foi em torno de 1400 UI/L no 12º dia, mantendo-se estável até o 15º dia. Sugere-se que a atividade máxima da MnP designada como metabólito secundário, esteja relacionada a limitação de N e C (idiofase), que motivou a liberação da enzima em maior quantidade com base no desenvolvimento do fungo (PATRICK *et al.*, 2011; KNOP *et al.*, 2014). Possivelmente a disponibilidade de carbono foi o maior responsável pela diminuição da atividade da MnP no TCG. Assim, a presença ou a ausência de determinados nutrientes podem afetar a atividade biológica do fungo e consequentemente nas atividades enzimáticas (MORAES *et al.*, 2015). Os dados obtidos nesse estudo indicam um ótimo rendimento de atividade da MnP, sendo notadamente maiores que o estudo de Ferreira *et al.* (2010) que obteve 65 UI/L com *Pleurotus sajor-caju* em 15 dias de incubação, de Aguiar *et al.* (2010) que também utilizando o *P. sajor-caju* atingiu cerca de 17,93 UI/L, durante 30 dias de incubação, e no de Kumari e Naraian. (2016), que alcançou 64 UI/mL com *Pleurotus florida* no tempo de 20 dias de inoculação.

No que diz respeito a quantidade de biomassa seca, nota-se que os três primeiros dias de fermentação representa o período de fase lag, necessário para a adaptação fúngica com os componentes do meio. A partir do 9º dia, os valores foram mais significativos, atingindo melhores resultados no 15º dia, com os valores de 13,62 g/L para o TSG e 22,06 g/L para o TCG na presença do *P. sajor-caju*. A razão para isto, é devido ao incremento de glicose, que quando adicionada no meio contendo vinhaça, atua como fonte primária de energia para obtenção de concentrações mais elevadas de massa microbiana, certamente devido ao consumo da glicose, no entanto, isto compromete a viabilidade econômica do meio (CONFORTIN *et al.*, 2008). Pode-se observar que houve um aumento similar tanto para a atividade enzimática quanto para a biomassa no 12º dia, possivelmente devido à maior produção de enzimas (Lac e MnP) na fase logarítmica do fungo.

Os resultados obtidos neste estudo sem a presença de glicose são significativamente maiores (13,62 g/L) que aqueles encontrados por Ferreira *et al.* (2010), cerca de 10,60 g/L de biomassa, durante 15 dias de inoculação, e Sartori *et al.* (2015) com 12,73 g/L após 15 dias de inoculação, sob as mesmas condições de cultivo. Isso pode ser atribuído a composição química da vinhaça utilizada nesse trabalho, uma vez que oriunda do caldo de cana-de-açúcar apresenta alta proporção de C/N (41:1) e favorece maior crescimento do microrganismo, enquanto que os da literatura são provenientes do mosto misto e possui menor proporção C/N, ou seja, a proporção C/N contribui amplamente na produção microbiana a depender do tipo de mosto empregado para cada vinhaça (YANG *et al.*, 2013).

A alta produção de biomassa micelial pode servir como ingrediente de alimentação animal e humana, inóculo para produção de cogumelos comestíveis e produtos da química fina (fármacos e medicamentos), isso porque a biomassa apresenta potencial em termos de valor nutricional, por possuir consideráveis conteúdos de micro e macro nutrientes, como ferro e fósforo, teor de vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, ácido fólico e niacina), hidratos de carbono (33,25%), proteína (39,25%), fibra bruta (5,5%), lipídio (5,8%) e ainda seu meio nutritivo ter grande disponibilidade geográfica e ser um ótimo indutor de crescimento (VAN KUIJK *et al.*, 2015; MUKHOPADHYAY e GUHA, 2015).

Apesar dos resultados da composição dos ensaios utilizados terem mostrado influência relevante sob a biomassa e atividade enzimática, outro aspecto levado em consideração é a correção do pH do meio de cultura, pois esse fator permite aproximar-se da condição favorável exigida para o desenvolvimento otimizado do fungo, e assim ser capaz de induzir a produção de elevadas taxas de atividade enzimática e consequente descoloração. Neste seguimento, Ferreira *et*

al. (2010) relataram que a vinhaça com pH ácido (corrigido para 6) favorece o crescimento do *P. sajor caju*, corroborando com os resultados desse estudo, já que o pH também foi ajustado para 6. Seyis e Subasioglu (2009), concluíram que as espécies de *Trichoderma sp.*, quando inoculadas em meio ácido (4,5-4,8) de vinhaça durante 7 dias, apresentaram um melhor rendimento de descoloração (cerca de 53,5%). Desta forma, um aumento ou diminuição do pH, fora da condição ideal do crescimento microbiano poderia causar a inativação das enzimas ligninolíticas (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2015).

A partir da discussão dos dados a respeito da descoloração e atividade enzimática, escolheu-se o TSG (tratamento sem glicose) para realizar subsequente degradação eletroquímica, as caracterizações físico-químicas, e os testes de toxicidades com a *Lactuca sativa* e *Raphidocelis subcapitata*.

5.2. OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DA VINHAÇA

As amostras de vinhaça tratadas pelo *Pleurotus sajor-caju* foram submetidas a OE, por apresentarem carga final de contaminação ainda elevada. A influência dos ânodos (DDB vs. ADE), efeitos da densidade de corrente (50, 25 e 12,5 mA cm⁻²) e concentração do eletrólito NaCl (0,1, 0,05 e 0,025 M) foram estudados durante 3 horas. Em seguida, analisou-se em termos de DQO, Abs (absorbância) e COT. Além dos testes de toxicidade com a *L. sativa* e *R. subcapitata*, para a melhor condição selecionada no processo de otimização.

5.2.1. Comparações entre ânodos de trabalho

A Figura 19 exibe a influência de dois diferentes materiais de ânodo na remoção da DQO, Abs e COT da vinhaça tratada, aplicando uma densidade de corrente elevada (50 mA cm⁻²) com eletrólito de NaCl 0,1 M, em proporção 1:1 (efluente: eletrólito), durante 3 horas, em ambos ânodos. Pode-se observar que a remoção da DQO, alcançou cerca de 20%, não existindo diferença entre aplicar o DDB ou ADE. Já para a Abs nota-se uma melhora no comportamento apontado pelo ADE quando comparado com DDB, ambos chegando à aproximadamente 90% de remoção de cor. Em relação à remoção do COT, nota-se que tanto para o ADE quanto o DDB, aumenta em cerca de 10 %. De forma geral, estes resultados sugerem que a eficiência da oxidação do resíduo é similar em ambos os ânodos. Entretanto, é necessário ressaltar que o DDB possui um custo elevado comparado ao ADE. Sendo assim, ânodo de trabalho escolhido foi o ADE.

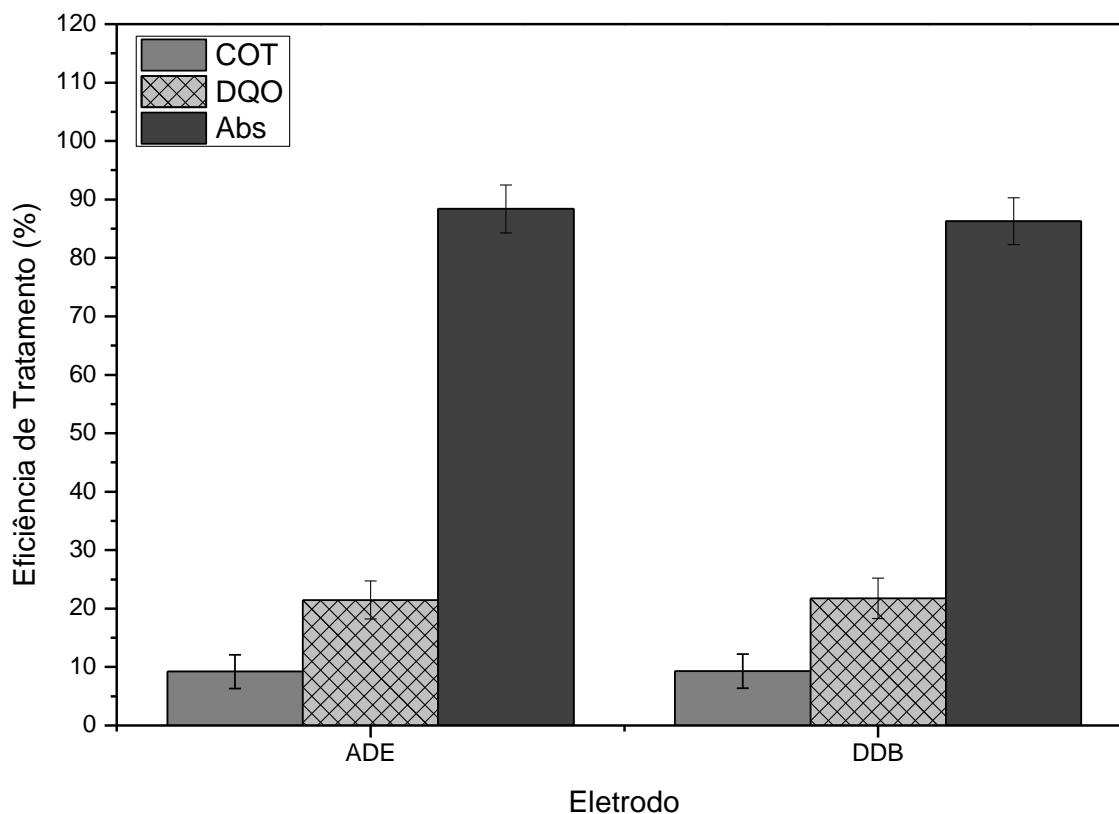


Figura 19- Influência dos ânodos (ADE e DDB) em função da eficiência de tratamento do COT, DQO e Abs, para eletrólises de 3 horas, aplicando uma densidade de corrente de 50 mA cm^{-2} , $0,1 \text{ M NaCl}$ em um volume de 70 mL .

5.2.2. Efeito da densidade de corrente

Uma vez determinado o anodo de trabalho utilizado, o outro maior custo associado a tratamentos eletroquímicos envolve o gasto energético com a corrente aplicada ao sistema. Neste ponto consideram-se as variações na concentração do eletrólito, perdas em distribuição de massa, resistividade particular do anodo de trabalho, além da densidade de corrente limite. Assim, levando em conta a cinética de degradação, é possível estimar a densidade de corrente limite, como demonstrado por Coledam *et al.* (2014). Desta forma, a densidade de corrente foi estudada por meio de reações de eletrólise utilizando o ADE como anodo de trabalho (Figura 20), aplicando-se densidades de corrente de 50 , 25 e $12,5 \text{ mA cm}^{-2}$ com intuito de determinar as melhores condições de degradação da vinhaça.

Os dados obtidos na Figura 20 mostram que a remoção do COT foi similar para todas as densidades de corrente estudadas, indicando a alta complexidade da matriz carbônica do efluente e uma limitação na densidade de corrente aplicada, que não pode ser justificada considerando-se apenas o COT. Para os dados de DQO, o comportamento de remoção foi proporcional, indicando

melhores taxas de remoção para a densidade de corrente de 50 mA cm^{-2} (22% de tratamento), seguida da densidade de corrente de 25 mA cm^{-2} (17% de tratamento) e por fim da menor densidade de corrente aplicada $12,5 \text{ mA cm}^{-2}$ (9,5% de tratamento). Entretanto, para absorção nota-se que o melhor tratamento foi encontrado para reações realizadas a 25 mA cm^{-2} , com 92% de tratamento.

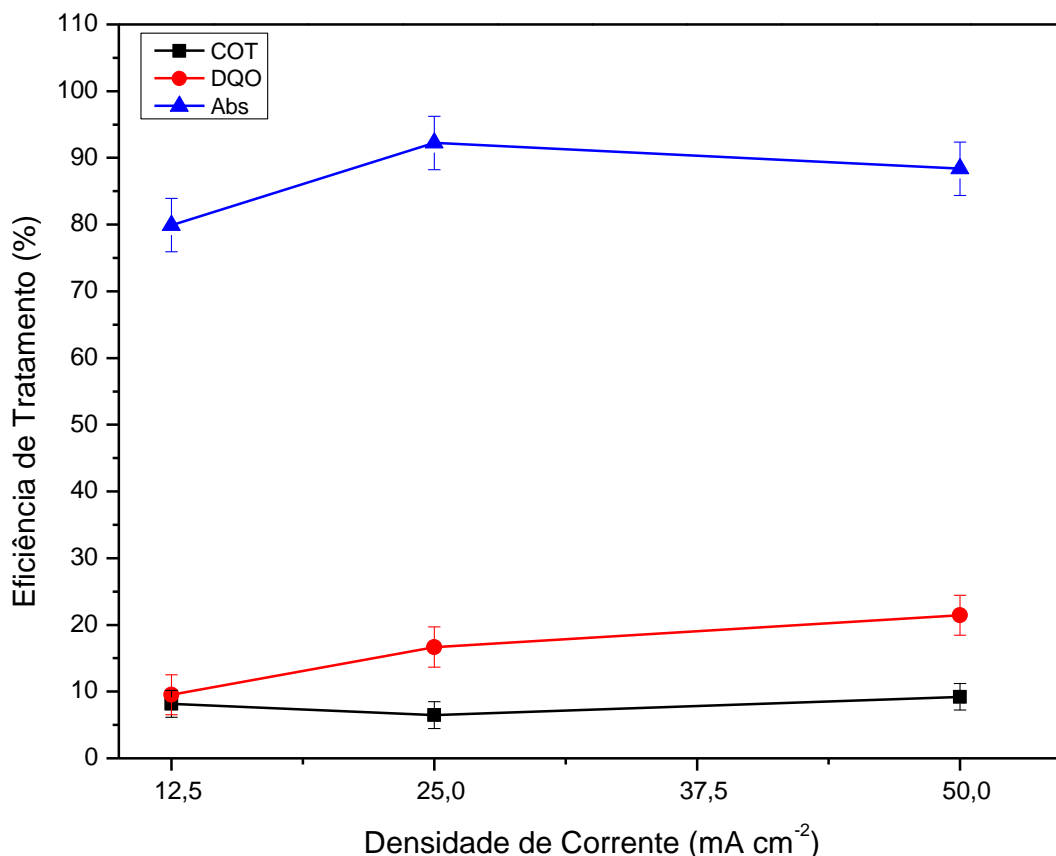


Figura 20-Influência da densidade de corrente (mA cm^{-2}) em função da eficiência de tratamento do COT (■), DQO (●) e Abs (▲), para eletrólises de 3 horas utilizando o ADE, aplicando uma densidade de corrente de 12,5, 25 e 50 mA cm^{-2} , 0,1 M NaCl em um volume de 70 ml.

Considerando-se que a absorção envolve a remoção da cor e da turbidez do efluente, entende-se que uma vez aplicada uma densidade de corrente mais alta, o NaCl em solução tende a complexar-se e depositar-se no fundo da célula eletroquímica em forma de grãos e flóculos. Um comportamento similar foi encontrado por Pupo *et al.* (2013), onde ao degradar o corante Azul Indanthrene, os autores observaram a formação de corpo de fundo na célula eletroquímica em altas densidades de corrente. Este depósito pode ocorrer devido à cristalização dos cloretos e/ou desgaste do ADE, por vezes completamente desintegrado em experimentos quando aplicada elevada densidade de corrente. Assim, dado à similaridade dos resultados para COT e DQO, a densidade de corrente aplicada considerada ideal foi a de 25 mA cm^{-2} .

5.2.3. Efeito da concentração do eletrólito

Ao analisar os mais variados eletrólitos, nota-se que comumente desenvolve-se estudos de degradação eletroquímica aplicando Na_2SO_4 , NaCl , NaCO_3 , NaNO_3 , visto que a natureza do eletrólito de suporte e do material do ânodo tem uma forte influência na eficiência da eliminação de poluentes orgânicos por oxidação anódica (GUZMÁN-DUQUE *et al.* 2014; SIFUNA *et al.* 2016). De forma geral, as reações empregando o eletrólito de NaCl são predominantemente mais eficazes, onde por meio da dissolução e formação dos radicais clorados, os compostos orgânicos são atacados de forma mais eficiente. A partir disso, as reações de degradação eletroquímica foram realizadas alterando as concentrações iniciais da solução de cloreto em 0,1, 0,05 e 0,025 M (Figura 21).

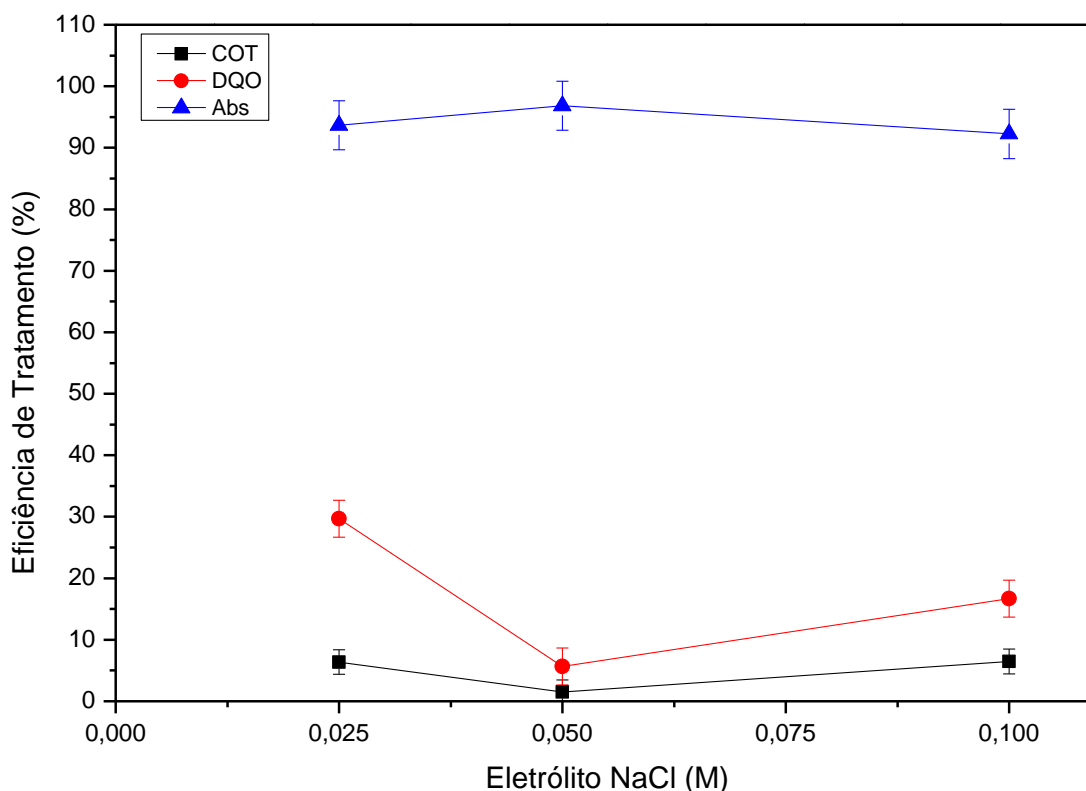


Figura 21- Influência da concentração do eletrólito NaCl (0,1, 0,05 e 0,025 M) em função da eficiência de tratamento do COT (■), DQO (●) e Abs (▲), para eletrólises de 3 horas utilizando o ADE, aplicando uma densidade de corrente de 25 mA cm^{-2} , em um volume de 70 mL.

Pode-se observar na Figura 21 que os valores de remoção de COT são similares para o caso de 0,1 M e 0,025 M (6,4%), diferindo em 5% do resultado obtido para 0,05 M. Considerando a proximidade dos resultados de COT, além da baixa eficiência de tratamento do mesmo, nota-se que o método eletroquímico não é capaz de satisfatoriamente reduzir o COT do efluente de

vinhaça. Ao analisar a DQO observa-se que a maior redução é vista para concentração de 0,025 M (30%), seguida de 17% de remoção para 0,1 M e 6% para 0,05 M. Possivelmente, a formação dos íons cloreto tenha sido o principal fator, onde nota-se uma tendência a maiores taxas de tratamento na menor concentração utilizada. Quanto a absorção, as três concentrações de NaCl utilizadas obtiveram resultados elevados, atingindo remoção superior à 90% de absorbância em todos os casos. Assim, o parâmetro não foi utilizado como referência para escolha do melhor sistema de tratamento.

5.2.4. Otimização do tratamento da vinhaça

Após realizar a otimização do sistema (escolha do ânodo, densidade de corrente e concentração do eletrólito) foi possível definir quais os melhores parâmetros: eletrodo ADE, densidade de corrente de 25 mA cm⁻² e a concentração de eletrólito 0,025 M NaCl. Desta forma, pode-se realizar uma comparação da eficiência de tratamento entre a vinhaça bruta, tratada biologicamente, e sequencial combinação com a oxidação eletroquímica (Figura 22).

Os dados obtidos na Figura 22 mostram que houve um aumento significativo de remoção do COT, DQO e Abs para os tratamentos biológico e combinado. Entretanto, notou-se que o tratamento biológico promoveu maior influência na remoção do COT (57,3%), DQO (50,6%) e Abs (97%) em relação a vinhaça bruta, confirmando a alta capacidade degradadora do *P. sajor-caju*. Quando seguido do processo combinado com oxidação eletroquímica, a remoção do COT passou para 61%, DQO para 66% e Abs para 100%, depois de 3 horas de reação com eletrodo ADE. Estes resultados indicam que provavelmente a degradação via eletroquímica ocorreu por oxidação indireta, através da forte ação do agente oxidante Cl₂ e OH^{*}, que são capazes de oxidarem os poluentes orgânicos na superfície do eletrodo durante a descarga da água, uma vez que utiliza o eletrodo ativo ADE. Rocha *et al.* (2014), aplicaram oxidação eletroquímica para degradação do corante Yellow C-RG à uma concentração inicial de 200, 400 e 600 mg L⁻¹, variando densidade de corrente ($j = 10, 30$ e 50 mA cm⁻²) e concentração de NaCl em solução (0,01, 0,02 e 0,04 mol L⁻¹), e estudaram a influência do uso de DDB e um ADE composto de Pt/Ti. Por meio destes, foi possível notar que o eletrodo de Pt/Ti (ânodo ativo) foi capaz de efetivamente reduzir a cor da solução de forma mais rápida que o anodo de DDB (ânodo inativo). Esse comportamento provavelmente está relacionado com a efetividade do radical hidroxila produzido na superfície do ânodo ADE.

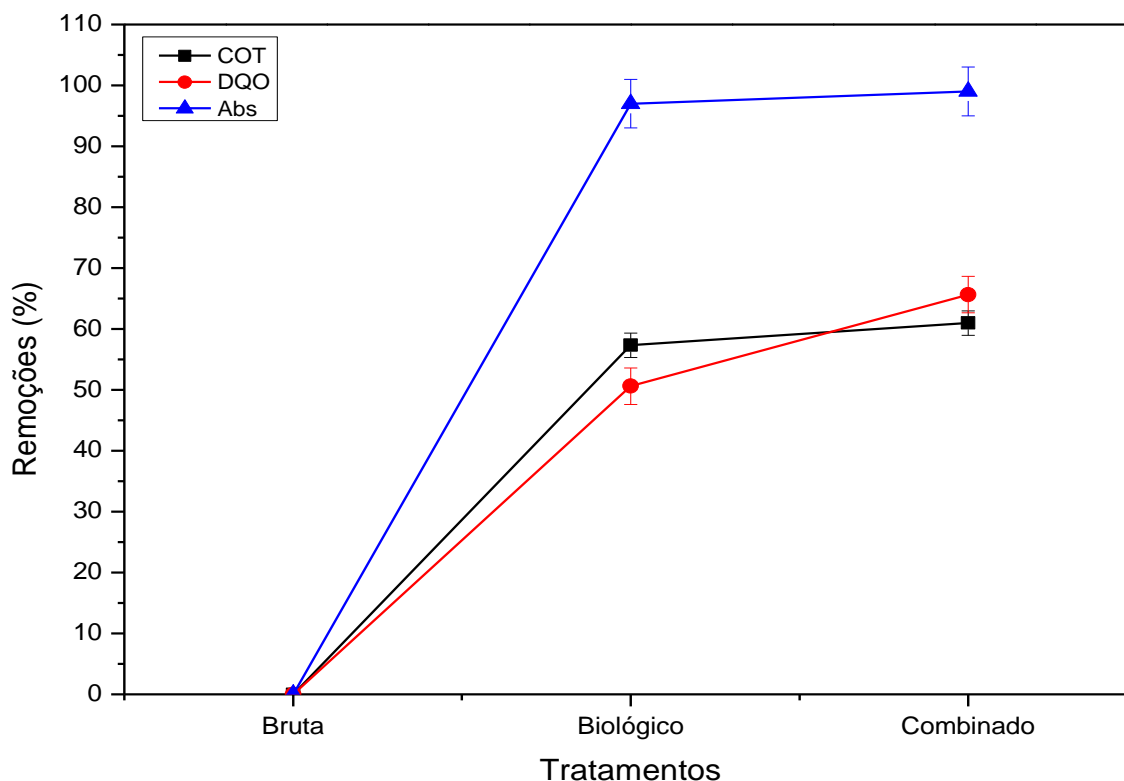


Figura 22- Eficiência do tratamento biológico e combinado em função da remoção do COT (■), DQO (●) e Abs (▲), para eletrólises de 3 horas utilizando o ADE, aplicando uma densidade de corrente de 25 mA cm^{-2} , eletrólito $0,025 \text{ M NaCl}$, em um volume de 70 mL .

Em particular, a adição do processo eletroquímico reduziu significativamente o teor de material orgânico e a cor da vinhaça biodegradada (Figura 22), sob as condições otimizadas. De modo geral, a utilização do processo biológico antes do eletroquímico, teve como finalidade reduzir a alta carga orgânica da vinhaça de cana-de-açúcar, além de diminuir a quantidade de reagentes necessários no processo seguinte e os custos de tratamento. Portanto, as eficiências obtidas com a combinação de processos favoreceram a degradabilidade da vinhaça, já que efetivamente reduziram as concentrações dos compostos orgânicos no resíduo.

5.3. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA

As principais características da vinhaça *in natura*, biodegradada pelo *P. sajor-caju*, e subsequente oxidação eletroquímica estão resumidas na Tabela 8. Verificou-se que o COT, DQO e DBO são os parâmetros mais predominantes na composição do resíduo. Os resultados expostos indicam que houve diminuição na maior parte dos parâmetros analisados, destacando-se o COT (57,3%), DQO (50,6%), DBO (86,8%), fenóis (96,2%), e nitrogênio total (77,3%), do tratamento

biológico, em relação as propriedades da vinhaça *in natura*. Portanto, ficou evidente o elevado potencial degradador do *P. sajor-caju*.

Tabela 8- Características físico-química da vinhaça *in natura* do caldo de cana-de-açúcar, após o tratamento biológico e combinado com a oxidação eletroquímica.

Parâmetros	Vinhaça de cana-de-açúcar		
	<i>In natura</i>	Tratamento biológico	Tratamento combinado
pH	3,70	5,89	7,76
Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	4349	4367	3810
Turbidez (NTU)	941	11,27	10,25
Absorbância (a.u.)	8,16	0,28	0,02
Carbono orgânico total (mg C/L)	4223	1802	801,80
DQO (mg O ₂ /L)	11076	5470	2130
DBO (mg O ₂ /L)	6800	896	344
Fenóis totais (mg/L)	8,41	0,32	<0,002
Fósforo total (mg P/L)	63,50	62,90	15,60
Nitrogênio total (mg N/L)	101,60	23,10	21,20
Potássio (mg K/L)	40,25	30,87	54,49
Sólidos totais (mg/L)	7338	7103	3530
Sulfatos (mg SO ₄ ²⁻ /L)	1945	1560	271
Cálcio (mg Ca/L)	191,60	91,82	3,10

De forma geral, o tratamento combinado reduziu o conteúdo orgânico (60,9%), DQO (65,6%), DBO (94,9%), fósforo (75,4%), sólidos totais (51,9%), sulfatos (86,1%), cálcio (98,4%), e quase 100% dos fenóis totais. Certamente, o índice de redução de fenóis, alcançou maior expressão analítica, o que é considerado fundamental na descoloração do resíduo, já que a depender das condições do substrato e ambiente, este composto aromático pode ser convertido para quinonas (substâncias orgânicas coloridas e recalcitrantes), mediante a abstração do cátion hidrogênio, pelo grupo OH⁻ ligado ao anel benzênico do fenol (STRONG, 2010). Na literatura, é possível observar a mesma tendência de diminuição de compostos fenólicos na vinhaça de cana-de-açúcar, após o tratamento combinado. Zayas *et al.* (2007), estudaram a purificação da vinhaça biologicamente tratada, com uso da oxidação eletroquímica. Os resultados indicaram que o eletrodo ADE-RuPb(40%), conseguiu remover 100% do teor de polifenóis, no entanto, essa

diminuição deve-se à etapa de coagulação e floculação, com a presença dos íons de cloreto do coagulante FeCl_3 , que promoveram melhores condições para a subsequente oxidação do material orgânico. Assim, demonstrou-se que o processo de OE nesse estudo degradou efetivamente os fenóis contidos na vinhaça.

5.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA VINHAÇA

Nesta seção serão discutidos os resultados a respeito do uso de bioensaios com *Lactuca sativa* e *Raphidocelis subcapitata*, para testar a toxicidade da vinhaça *in natura*, e pós TSG sequenciado com eletrodo ADE, por meio da germinação relativa (GR), germinação absoluta (GA), crescimento relativo das raízes (CRR), índice de germinação (IG), concentração de inibição (CI_{50}) e concentração efetiva média (CE_{50}).

5.4.1. *Lactuca sativa*

Foram utilizados como parâmetros os efeitos nas germinações e crescimento das raízes, através da contagem do número de sementes germinadas e do comprimento médio das raízes, após cinco dias de cultivo. No controle com água, só foram válidas as replicatas que obtiveram percentual de germinação superior ou igual a 90% (SOBRERO e RONCO, 2004).

Como pode ser observado na Figura 23, verificou-se que no controle negativo (com NaCl) houve total inibição de germinação das sementes, tanto para a amostra *in natura*, como para tratada biologicamente e por oxidação eletroquímica, provavelmente motivado pela salinidade do NaCl que dificultou a absorção da água nas sementes ao mesmo tempo que permitiu a entrada de íons em níveis tóxicos nas sementes embebidas (DODD e DONOVAN, 1999). Em contrapartida, no controle positivo (com água destilada) os efeitos da germinação relativa (GR) e absoluta (GA) foram eficazes, pois a água facilitou a dissociação de vários tipos de moléculas iônicas, como sais e açúcares, fazendo com que a interação química entre as diferentes substâncias fora e dentro da semente vegetal fossem facilitadas, disponibilizando energia e nutrientes necessários para o crescimento do eixo embrionário (BERTAGNOLLI *et al.*, 2003).

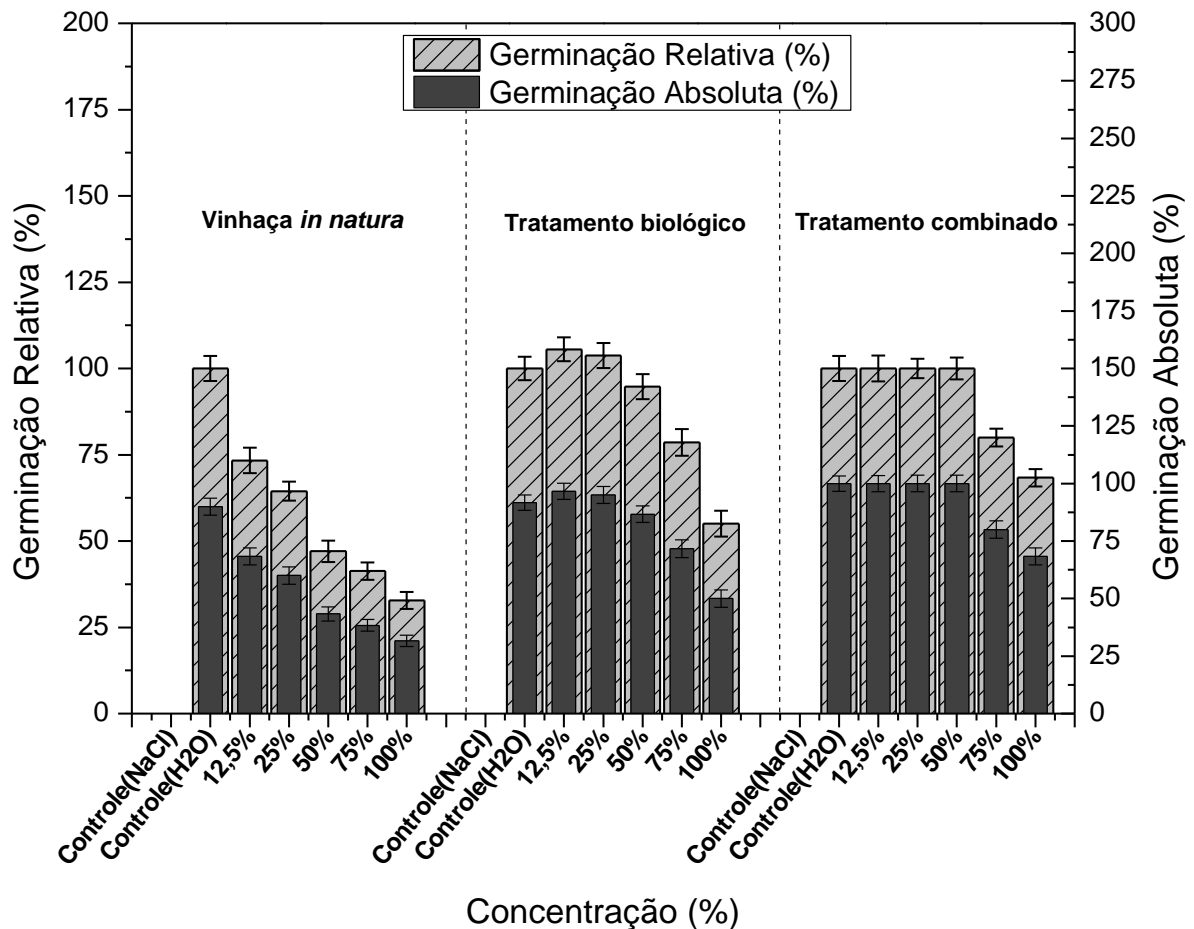


Figura 23- Germinação relativa (GR) e germinação absoluta (GA) das raízes de sementes *Lactuca sativa* em função de diferentes concentrações (%) da vinhaça *in natura* e após o TSG com fungo *P. sajor-caju* e subsequente oxidação eletroquímica.

5.4.2. Efeito da vinhaça na germinação das sementes

No que diz respeito às germinações (Figura 23), notou-se que os percentuais de GR e GA das sementes tendem a aumentar com a diminuição dos valores de diluição da vinhaça, e para as amostras tratadas pelo *P. sajor-caju* e oxidação eletroquímica, os efeitos foram maiores quando comparados com as amostras *in natura*. Isto sugere que o TSG da vinhaça vinculado a oxidação eletroquímica, diminuiu a concentração de substâncias tóxicas presentes no resíduo que poderiam afetar o desenvolvimento normal das sementes. Palácio *et al.* (2012), estudaram a toxicidade de efluente têxtil tratado por processo foto-Fenton artificial, utilizando a *Lactuca sativa* nas mesmas condições de manutenção deste trabalho. Os resultados indicaram que em baixas concentrações do efluente bruto (1% e 3%), obteve-se elevadas taxas de GR (95% e 93%), respectivamente. Em outro estudo, Choi e Choi (2016), avaliaram o efeito de toxicidade do Tween 20, utilizado com agente tensoativo em extratos de algas verdes de águas residuais, por meio da semente *Lactuca*

sativa, e estes autores também alcançaram elevadas taxas de GA (85% e 82, 5%), para concentrações de (1,5% e 2,0 %) do Tween 20. Estes resultados corroboram com os encontrados nesse estudo, onde as maiores taxas de germinações foram encontradas nas menores concentrações (12,5% e 25%) de vinhaça tratada.

Nas amostras com 100% da vinhaça *in natura* (Figura 23), observa-se que os percentuais de GR e GA foram menores quando comparadas com TSG e oxidação eletroquímica, cerca de 34% respectivamente, para ambas as taxas, o que representa elevados efeitos de letalidade as sementes analisadas, devido à presença de toxicidade da vinhaça *in natura*. Os efeitos tóxicos da vinhaça bruta também já foram relatados por Kannan e Upreti (2008), na germinação de sementes de feijão mungo (*Vigna radiata*), que a baixa concentração do resíduo (5% v/v), atingiu cerca de 20% de GA. Os testes de toxicidades de sementes, permitem detectar a presença de poluentes tóxicos pelas alterações causadas num organismo através de bioensaios, justamente por serem mais sensível ao stress ambiental (CHARLES *et al.*, 2011).

5.4.3. Efeito da vinhaça no crescimento relativo da raiz e índice de germinação das sementes

Os parâmetros analisados foram o percentual do crescimento relativo da raiz (CRR) e o índice de germinação (IG) da *L. sativa* na presença da vinhaça (Figura 24). Percebe-se que os valores do CRR para as concentrações de 12,5% e 25% da vinhaça tratada biologicamente são maiores em relação ao controle com água destilada, isso pode ser justificado pela presença da vinhaça em baixa concentração, que promoveu o estímulo e conseqüente crescimento das raízes, por ser rica em água e nutrientes.

No entanto, quando ocorre o subsequente tratamento eletroquímico por ADE, o CRR tende a diminuir com o aumento da concentração da amostra. Certamente, a concentração do eletrólito NaCl (0,025 M) com a influência direta de íons clorados, pode ser considerado o agente inibidor do crescimento das raízes, já que o mesmo também é utilizado como controle negativo, porém com resultados de crescimento maiores do que a vinhaça bruta. Para vinhaça *in natura*, essas concentrações confirmam, que mesmo em pequena quantidade, a mesma contém propriedades tóxicas e inibidoras, o que impossibilita o crescimento das raízes. Em relação ao IG das sementes, nota-se que o tratamento fúngico e sequente oxidação eletroquímica da vinhaça, favoreceram melhores condições para germinação das sementes, devido à remoção de compostos tóxicos presente no resíduo.

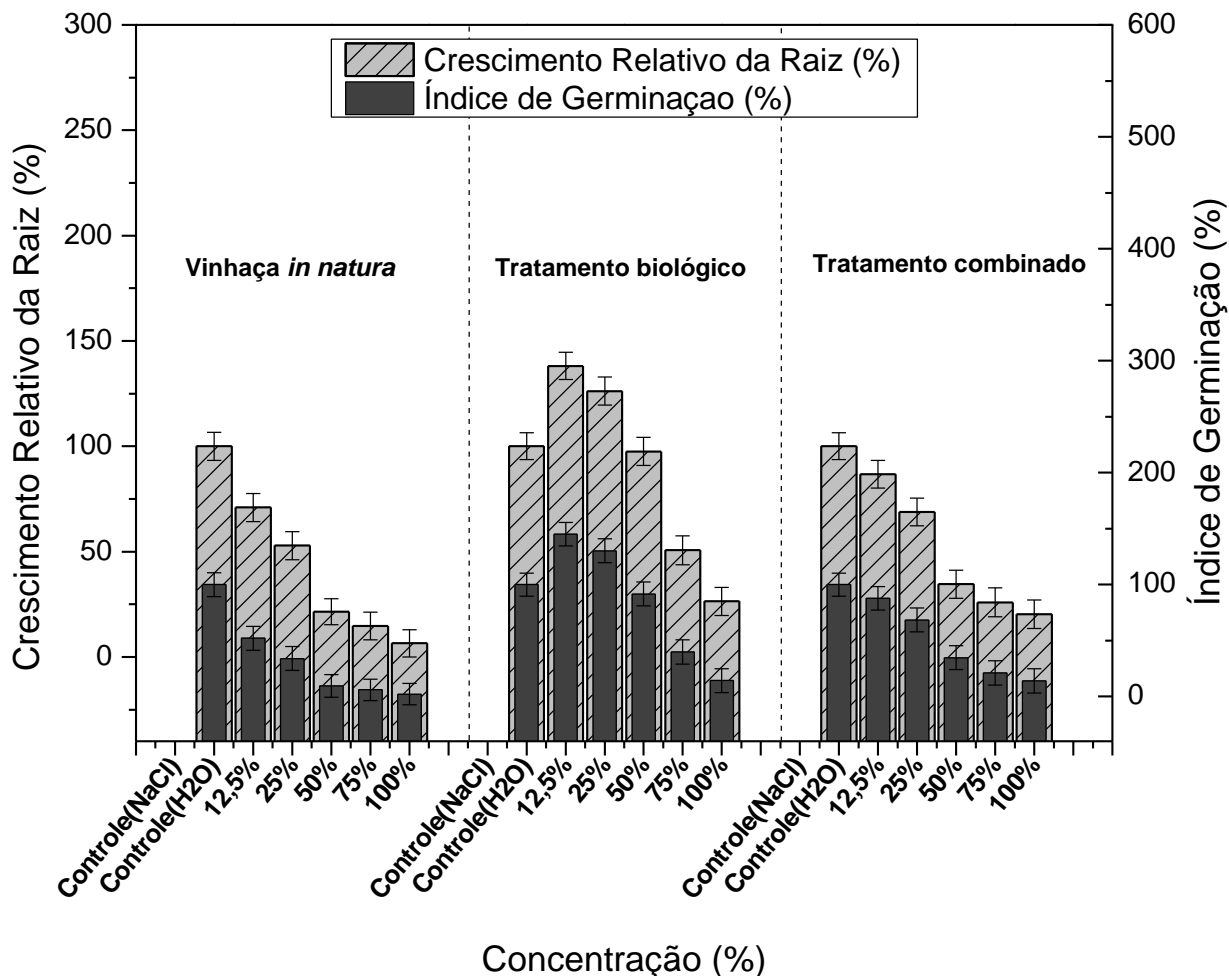


Figura 24- Comprimento relativo das raízes (CRR) e índice de germinação (IG) das sementes de *Lactuca sativa* em função de diferentes concentrações (%) da vinhaça *in natura* e após o TSG com fungo *P. sajor-caju* e subsequente oxidação eletroquímica.

De acordo com os estudos de Young *et al.* (2012) e Cesaro *et al.* (2015), que avaliaram a fitotoxicidade de efluentes industriais e resíduos sólidos orgânicos, respectivamente, usando a semente *Lactuca sativa*, todo resultado de IG abaixo de 40% indica sensibilidade de inibição das sementes, entre 40% e 80% leve inibição, ao passo que valores entre 80% e 120% não são considerados significativo e valores acima de 120% são considerados estímulo de crescimento. Logo, os resultados desse estudo indicam que as concentrações de 25%, 50%, 75% e 100% da vinhaça *in natura* causaram elevados efeitos de toxicidade as sementes, concomitantemente que a vinhaça tratada biologicamente nas concentrações de 12,5%, 25% e 50% promoveram o desenvolvimento das sementes, assim como para o subsequente tratamento eletroquímico nas concentrações de 12,5% e 25%. Neste contexto, compreende-se que o uso da *Lactuca sativa* como organismo-teste é fundamental para indicar os níveis biológicos e tóxicos das substâncias químicas, presentes em diferentes tipos de efluentes e resíduos, já que é referida como uma espécie

padrão para testes de toxicidade, e por esses bioensaios apresentarem custo reduzido (TAMADA *et al.*, 2012; SILVA e MATOS, 2016).

5.4.4. Toxicidade aguda da vinhaça

Como mostrado na Tabela 9, a vinhaça *in natura* é tóxica para os organismos, com base na toxicidade aguda, corroborando os dados mostrados nas Figuras 23 e 24. Pode-se observar que de acordo com a CI_{50} , a *Raphidocelis subcapitata* é mais sensível que a *Lactuca sativa*. Os resultados indicaram que antes do tratamento da vinhaça a CE_{50} (120 h) foi de 41,25% para *Lactuca sativa*, e após o tratamento fúngico, houve uma diminuição significativa da toxicidade, chegando a não apresentar letalidade às sementes (a nível de 50% dos organismos), bem como para o tratamento combinado. No caso da *Raphidocelis subcapitata*, os valores de CI_{50} (72 h) confirmam ainda mais a toxicidade da vinhaça, uma vez que apresenta inibição de 3,13% dos organismos, antes do tratamento. Quando o resíduo foi tratado pelo *Pleurotus sajor-caju*, a toxicidade diminuiu em 24 vezes (foi para 75,22%) e não foi observada inibição de crescimento do organismo para o tratamento combinado. Assim, demonstrou-se que os organismos avaliados apresentam mecanismos de resistência diferentes, conforme evidenciado pela sensibilidade as concentrações de toxicidade da vinhaça. No que diz respeito à eficiência dos tratamentos, notou-se que ambos os tratamentos influenciaram positivamente no processo de remoção de substâncias tóxicas da vinhaça, especificamente, o tratamento combinado. Sendo este, responsável pelo complemento de purificação do resíduo, já que a concentração-resposta aos organismos não foram notadas.

Na literatura, são raros os estudos de toxicidade com a vinhaça. Botelho *et al.* (2012) investigaram a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar em organismos aquáticos, antes e após o ajuste do pH. Os resultados indicaram que houve diminuição da toxicidade da vinhaça após o ajuste do pH, com o aumento da CL_{50-48h} (de 0,67% e 0,80% para 2,99% e 5,62%), para *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*, respectivamente. Enquanto que, para o *Danio rerio*, a CL_{50-96h} foi de 2,62% para 8,34%. Em outro estudo, Ferreira *et al.* (2011) estudaram a degradação da vinhaça de cana-de-açúcar a partir do tratamento com *P. sajor-caju*, e avaliaram a toxicidade do resíduo antes e após o tratamento, com *Pseudokirchneriella subcapitata* (recente *Raphidocelis subcapitata*), *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Hydra attenuata*. Todos os valores de CI_{50} da vinhaça para a *Pseudokirchneriella subcapitata*, de CL_{50} para *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Hydra attenuata*, apresentaram redução de toxicidade após o tratamento com *P. sajor-caju*, que foram de 1,6%, 3,6%, 2,2% e 2,3% para 15%, 66%, 21% e 17,7%, respectivamente. Estes

resultados são consistentes com os encontrados na Tabela 9, a respeito do tratamento com *P. sajor-caju*, onde pode ser observado que também ocorreu diminuição de toxicidade.

Tabela 9- Valores de CE₅₀ (%) e CI₅₀ (%) de vinhaça para cada organismo-teste, antes e após o tratamento com *Pleurotus sajor-caju* e respectiva oxidação eletroquímica, por ADE.

Tratamentos	Organismos-teste	
	<i>Lactuca sativa</i> (CE ₅₀)	<i>Raphidocelis subcapitata</i> (CI ₅₀)
Vinhaça <i>in natura</i>	41,25	3,13
Biológico	NT	75,22
Combinado	NT	NT

NT= Não tóxico.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que devido à alta carga orgânica e a presença de compostos recalcitrantes e tóxicos na vinhaça de cana-de-açúcar, é necessário um tratamento prévio com processo biológico para posterior oxidação eletroquímica. Assim, este estudo demonstrou a aplicabilidade do tratamento biológico isolada e combinada com a oxidação eletroquímica, no tratamento de vinhaça de caldo de cana-de-açúcar. O *P. sajor-caju* mostrou grande potencial para reduzir cor (97%), turbidez (99%), DQO (50,6%) e COT (57,3%), bem como na produção de enzimas (lacase e manganês peroxidase), além de diminuir a toxicidade da vinhaça em 75,22% para a *Lactuca sativa*, e 0,0% de letalidade para a *Raphidocelis subcapitata*. Quanto a produção de biomassa micelial, a mesma pode ser usada para alimentação ou para síntese de produtos químicos de alto valor agregado. A combinação com a oxidação eletroquímica, usando o ânodo $\text{Ti}/(\text{RuO}_2)_{0.7}(\text{IrO}_2)_{0.1}(\text{Sb}_2\text{O}_3)_{0.2}$ em condições otimizadas, permitiu obter eficiências moderadas na redução de compostos orgânicos (DQO 66% e COT 61%) e completa remoção da cor (100%) da vinhaça biodegrada, produzindo um efluente não tóxico (0% de inibição para *Lactuca sativa* e *Raphidocelis subcapitata*).

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a aplicação do processo de coagulação/floculação após a biodegradação da vinhaça do caldo de cana-de-açúcar, a fim de melhorar a degradabilidade do resíduo;
- Identificar as melhores condições para o biotratamento da vinhaça, através do planejamento experimental;
- Otimizar a produção da lacase e manganês peroxidase do *Pleurotus sajor-caju* com a vinhaça, avaliando a adição de carbono e nitrogênio;
- Analisar o uso de biorreatores na produção de enzimas lignolíticas sob condições otimizadas, utilizando a vinhaça como substrato e outros indutores como farelo de soja, e aveia branca;
- Estudar a cinética e degradação da vinhaça biodegrada, e sequencial oxidação eletroquímica em larga escala;
- Caracterizar o resíduo degradado pelo processo combinado, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a toxicidade da vinhaça antes e após o tratamento, utilizando a *Daphnia magna* e *Daucus carota*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAMID, A. M.; SOLBIATI, J. O.; CANN, I. K. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 82, p. 1-28; 2013.
- AGHAIE-KHOUSANI, M.; FOROOTANFAR, H.; MOSHFEGH, M.; KHOSHAYAND, M. R.; FARAMARZI, M. A. Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochemical Engineering Journal*, 60, p. 9-15, 2012.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. *Química Nova*, 34, p. 1729- 1738, 2011.
- AGUIAR, M. M.; FERREIRA, L. F. R.; MONTEIRO, R. T. R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, n. 5, p. 1245-1254, 2010.
- ALCALDE, M. Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In: Polaina J, MacCabe AP, editors. *Industrial enzymes. Structure, function and applications*. Dordrecht: *Springer*; 2. p. 461-76, 2007.
- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes: a review. *Water Air Soil Pollution*, 213, p. 251–273, 2010.
- ALMEIDA, B. A. D. L.; BARRETO, G. F. B.; GONÇALVES, C. M. N. Resíduos da agroindústria canaveira no Estado de Minas Gerais: usos e conservação ambiental. *Informe Agropecuário*, 28, n. 28, p. 96-100, 2007.
- AMMAR, H. B.; BRAHIM, M. B.; ABDELHÉDI, R.; SAMET, Y. Green electrochemical process for metronidazole degradation at BDD anode in aqueous solutions via direct and indirect oxidation. *Separation and Purification Technology*, 157, p. 9-16, 2016.
- ANDRADE, L.F.; DAVIDE, L.F.; GEDRAITE, L.S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, p. 626-631, 2010.
- APHA, AWWA, WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22 ed. Washington: American Public Health Association, 2012.
- AQUINO, J. M.; ROCHA-FILHO, R. C.; RUOTOLO, L. A.; BOCCHI, N.; BIAGGIO, S. R. Electrochemical degradation of a real textile wastewater using β -PbO₂ and DSA[®] anodes. *Chemical Engineering Journal*, 251, p. 138-145, 2014.
- ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. São Carlos: Ed. *Rima*, 5, p. 120-124, 2006.

- ARAÚJO, D. T.; GOMES, M. D. A.; SILVA, R. S.; DE ALMEIDA, C. C.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; EGUILUZ, K. I.; SALAZAR-BANDA, G. R. Ternary dimensionally stable anodes composed of RuO₂ and IrO₂ with CeO₂, SnO₂ or Sb₂O₃ for efficient naphthalene and benzene electrochemical removal. *Journal of Applied Electrochemistry*, p. 1-15, 2017.
- ARUOJA, V.; DUBOURGUIERA, H. C.; KASEMETS, K.; KAHRUA, A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407, p. 1461-1468, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12468: Ecotoxicologia aquática - toxicidade crônica - método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*). Rio de Janeiro, p. 24, 2005.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, p. 858-875, 2011.
- BALDIGO, B. P.; DUFFY, B. T.; SMITH, A. J.; GEORGE, S. D. Toxicity of waters from the Rochester Embayment Area of Concern to the plankton species *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Ceriodaphnia dubia*. *Journal of Great Lakes Research*, 42, p. 464-471, 2016.
- BAMGBOSE, I.; ANDERSON, T. A. Phytotoxicity of three plant-based biodiesels, unmodified castor oil, and Diesel fuel to alfalfa (*Medicago sativa L.*), lettuce (*Lactuca sativa L.*), radish (*Raphanus sativus*), and wheatgrass (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, p. 268-274, 2015.
- BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*, 28, p. 78-87, 1994.
- BAZANELLA, G. C.; DE SOUZA, D. F.; CASTOLDI, R.; OLIVEIRA, R. F.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures and application in dye decolorization. *Folia microbiologica*, 58, n. 6, p. 641-647, 2013.
- BERENQUER, R., SIEBEN, J. M., QUIJADA, C., & MORALLÓN, E. Pt-and Ru-Doped SnO₂-Sb Anodes with High Stability in Alkaline Medium. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, n. 24, p. 22778-22789, 2014.
- BERTAGNOLLI, C. M.; MENEZES, N. D.; STORK, L.; SANTOS, O. D.; PASQUALLI, L. L. Desempenho de sementes nuas e peletizadas de alface (*Lactuca sativa L.*) submetidas a estresses hídrico e térmico. *Revista Brasileira de Sementes*, 25, n. 1, p. 7-13, 2003.
- BETTIN, F.; ROSA, L.O.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T.A.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M.; DILLON, A.J.P. Growth, kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. *Process Biochemistry*, 46, p. 758-764, 2011.
- BIANCHI, M. D. O.; CORREIA, M.; DE RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. Importância de estudos ecotoxicológicos com invertebrados do solo. *Embrapa Agrobiologia. Documentos*, p. 32, 2010.

- BLAISE, C.; FORGET, G.; TROTTIER, S. Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. *Journal of Environmental Toxicology*, 15, p. 352-359, 2000.
- BOTELHO, R. G.; TORNISIELO, V. L.; DE OLINDA, R. A.; MARANHO, L. A.; MACHADO-NETO, L. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94, n.10, 2035-2045, 2012.
- BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal lacases: Production function, and applications in food processing. *Enzyme Research*, 2010, p. 1-10, 2010.
- BRILLAS, E.; GARCIA-SEGURA, S.; SKOUMAL, M.; ARIAS, C. Electrochemical incineration of diclofenac in neutral aqueous medium by anodic oxidation using Pt and boron-doped diamond anodes. *Chemosphere*, 79, n. 6, p. 605-612, 2010.
- BRILLAS, E.; HUITLE, C. A. M. (Eds). Synthetic Diamond filmes: preparation, electrochemistry, characterization and applications. *John Wiley e Sons*, vol. 8, 2011.
- BRILLAS, E.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods. An updated review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 166, p. 603-643, 2015.
- BRILLAS, E.; SIRÈS, I.; OTURAN, M. A. Electro-Fenton Process and Related Electrochemical Technologies Based on Fenton's Reaction Chemistry. *Chemical Reviews*, 109, p. 6570-6631, 2009.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova*, 32, p. 2191-2195, 2009.
- CESARO, A.; BELGIORNO, V.; GUIDA, M. Compost from organic solid waste: Quality assessment and European regulations for its sustainable use. *Resources, Conservation and Recycling*, 94, 72-79, 2015.
- CHAPLA, T.E.; CAMPOS, J.B. Allelopathic Evidence in Exotic Guava (*Psidium guajava* L.). *Brazilian archives of Biology and Technology*, 53, n. 6, p. 1359-1362, 2010.
- CHARLES, J.; SANCEY, B.; MORIN-CRINI, N.; BADOT, P.; DEGIORGI, F.; TRUNFIO, G.; CRINI, G. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, p. 2057-2064, 2011.
- CHOI, J. S.; CHOI, I. S. Inhibitory effect of marine green algal extracts on germination of *Lactuca sativa* seeds. *Journal of Environmental Biology*, 37, p. 207, 2016.
- CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; CORREIA, J.E.; MARINHO, F.U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33, p. 2752-2761, 2013.
- COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, n. 5, p. 582-594, 2002.

- COLEDAM, D. A. C.; AQUINO, J. M.; ROCHA-FILHO, R. C.; BOCCHI, N.; BIAGGIO, S. R. Influence of chloride-mediated oxidation on the electrochemical degradation of the Direct Black 22 dye using boron-doped diamond and β -PbO₂ anodes. *Química Nova*, 37, n. 8, p. 1312–1317, 2014.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL-CETESB. Norma técnica P 4.231: Vinhaça: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, p. 12, 2006.
- CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira da cana-de-açúcar: Primeiro levantamento da safra 2016/2017. Brasília, v.3, 2016. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/>>. Consultado em 18/04/2016.
- CONFORTIN, F. G.; MARCHETTO, R.; BETTIN, F.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; DILLON, A. J. P. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35, n.10, p. 1149-1155, 2008.
- CORTEZ, L. A. B.; ROSELL, C. E. V.; JORDAN, R. A.; LEAL, M. R. L. V.; LORA, E. E. S. R&D needs in the industrial production of vinasse. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed). *Surgarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability*. São Paulo: *Blucher*, p. 619-636, 2014.
- CORTEZ, L.; MAGALHÃE, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. *Revista Brasileira de Energia*, 2, n 2, p. 1-17, 1992.
- COSTA, C. R. C.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.R.; ESPINDOLA, E. L. G. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. *Química Nova*, 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008a.
- COSTA, C. R.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G.; OLIVI, P.; Electrochemical treatment of tannery wastewater using DSA[®] electrodes. *Journal of Hazardous Materials*, 153, p. 616–627, 2008b.
- DA SILVA, L. M.; DA SILVA, A. E.; DE OLIVEIRA, M. T.; DOS REIS, M. F. Avaliação inicial do potencial de *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. na biorremediação de vinhaça. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 10, n. 2, p. 14-20, 2015.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; SYED, T.A.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Journal Biochemistry and Molecular Biology*, 1, n. 1, p. 36-50; 2010.
- DBIRA, S.; BENSALAH, N.; CAÑIZARES, P.; RODRIGO, M. A.; BEDOUI, A. The electrolytic treatment of synthetic urine using DSA electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 744, p. 62–68, 2015.
- DE CASTRO, C. V.; DE SOUZA, L. L. Responsabilidade socioambiental das usinas sucroalcooleiras. *Jurisbarretos*, 1, n. 1, 2012.
- DEBENEST, T.; TURCOTTE, P.; GAGNE, F.; GAGNON, C.; BLAISE, C. Ecotoxicological impacts of effluents generated by oil sands bitumen extraction and oil sands lixiviation on *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology*, 112, p. 83–91, 2012.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Toxicidade de resíduos têxteis tratados por microrganismos. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 1, p. 63-66, 2006.

- DEMARCHE, P.; JUNGHANNS, C.; NAIR, R. R.; AGATHOS, S. N. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. *Biotechnology Advances*, 30, p. 933-953, 2012.
- DENG, Y.; ENGLEHARDT, J. D. Electrochemical oxidation for landfill leachate treatment. *Waste Management*, 27, n. 3, p. 380-388, 2007.
- DESAI, S.; NITYANAND, C. Microbial laccases and their applications: a review. *Asian Journal Biotechnology*, 3, p. 98-124, 2011.
- DODD, G.; DONOVAN, L. Water Potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. *American Journal of Botany*, 86, p. 1146–1153, 1999.
- DONG, W.; XIE, X.; JIA, J.; DU, H.; ZHONG, L.; LIANG, Z.; HAN, P. Theoretical calculation and experimental study on the conductivity and stability of Bi-doped SnO₂ electrode. *Electrochimica Acta*, 132, p. 307-314, 2014.
- DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. Colonização do substrato capim elefante suplementado com farelos por *Pleurotus ostreatus*. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 6, n. 2, p. 185-193, 2006.
- DOOLETTE, C. L.; MCLAUGHLIN, M.J.; KIRBYB, J. K.; NAVARRO, D.A. Bioavailability of silver and silver sulfide nanoparticles to lettuce (*Lactuca sativa*): Effect of agricultural amendments on plant uptake. *Journal of Hazardous Materials*, 300, p. 788-795, 2015.
- DUTKA, B. Short-term root elongation toxicity bioassay. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. Ottawa: *National Water Research Institute*, Environment Canada, 1989.
- DWIVEDI, U. N., SINGH, P.; PANDEY, V. P.; KUMAR, A. Structurefunction relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68, p. 117-128, 2011.
- EL-BATAL, A. I.; ELKENAWY, N. M.; YASSIN, A. S.; AMIN, M. A. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Biotechnology Reports*, 5, p. 31-39, 2015.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. *Waste Management & Research*, p. 1235-1250, 2011.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.; VICENT, T.; FONT, X.; MIJANGOS-CORTÉS, J.; CANTO-CANCHÉ, B.; ALZATE, L. Phenol and color removal in hydrous ethanol vinasse in an air-pulsed bioreactor using *Trametes versicolor*. *Journal of Biochemical Technology*, 6, n. 3, p. 982-986, 2015.
- ESPOSITO E. E AZEVEDO J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. *Educs. Caxias do Sul – RS*, Brasil, p. 380-448, 2004.
- FERNANDES, A.; PACHECO, M. J.; CIRÍACO, L.; LOPES, A. Review on the electrochemical processes for the treatment of sanitary landfill leachates: present and future. *Applied Catalysis B: Environmental*, 176, p. 183-200, 2015.

- FERREIRA, L. F. R.; AGUIAR, M. M.; MESSIAS, T. G.; POMPEU, G. B.; LOPEZ, A.M.Q.; SILVA, D. P.; MONTEIRO, R. T.; Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organism as toxicological indicators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, p. 132-137, 2011.
- FERREIRA, L. F.; AGUIAR, M.; POMPEU, G.; MESSIAS, T. G.; MONTEIRO, R. R. Selection of vinasse degrading microorganisms. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 26, p. 1613–1621, 2010.
- FOKINA, O.; EIPPER, J.; KERZENMACHER, S.; FISCHER, R. Selective natural induction of laccases in *Pleurotus sajor-caju*, suitable for application at a biofuel cell cathode at neutral pH. *Bioresource Technology*, 218, 455-462, 2016.
- FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. Vinhaça de cana de açúcar. *Livraria e Editora Agropecuária*, Guaíba, p. 203, 2000.
- FREITAS, M.; AZEVEDO, J.; PINTO, E; NEVES, J.; CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V. Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and a microcystin LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.116, p.59-67, 2015.
- FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*, 145, p. 210-229, 2014.
- GALVANO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2 ed. cap 4, p. 125, 2010.
- GAO, C.; SCHAMPHELAERE, K. A. C.; SMOLDERS, E. Zinc toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* decreases under phosphate limiting growth conditions. *Aquatic Toxicology*, 173, p. 74-82, 2016.
- GAO, D.; DU, L.; YANG, J.; WU, WEI-MIN, LIANG, H. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, n. 1, p.70–77, 2010.
- GIARDINA P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S., SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, p. 369–385, 2010.
- GIARDINA, P., SANNIA, G. Laccases: old enzymes with a promising future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, p. 1-2, 2015.
- GLOMSTAD, B.; ALTIN, D.; SORENSEN, L.; LIU, J.; JENSSEN, B.; BOOTH, A. M. Carbon nanotube properties influence adsorption of phenanthrene and subsequent bioavailability and toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Science & Technology*, 50, p. 2660-2668, 2016.
- GOLAN-ROZEN, N., SEIWERT, B., RIEMENSCHNEIDER, C., REEMTSMA, T., CHEFETZ, B., & HADAR, Y. Transformation Pathways of the Recalcitrant Pharmaceutical Compound Carbamazepine by the White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*: Effects of Growth Conditions. *Environmental Science & Technology*, 49, n. 20, p. 12351-12362, 2015.

- GUERREIRO, L. F.; RODRIGUES, C. S.; DUDA, R. M.; DE OLIVEIRA, R. A.; BOAVENTURA, R. A.; MADEIRA, L. M. Treatment of sugarcane vinasse by combination of coagulation/flocculation and Fenton's oxidation. *Journal of environmental management*, 181, p. 237-248, 2016.
- GUGLIOTTA, A.M.; CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. In: BONONI, V.L.R. (Org.). *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*, Instituto de Botânica, São Paulo, p. 184, 1998.
- GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; LOZANO, M.; D'ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M.A.; VILLARES, A.; MARTÍNEZ, J.A. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81, 715–723p, 2010.
- GUZMÁN-DUQUE, F. L.; PALMA-GOYES, R. E.; GONZÁLEZ, I.; PEÑUELA, G.; TORRES-PALMA, R. A. Relationship between anode material, supporting electrolyte and current density during electrochemical degradation of organic compounds in water. *Journal of Hazardous Materials*, 278, p. 221–226, 2014.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11, n. 7, p. 714-719, 1977.
- HATAKKA, A.; HAKALA, T.K.; LUNDELL, T.; GALKIN, S.; MAIJALA, P.; KALKKINEN, N. Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective White-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, p. 461-468, 2005.
- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30, p. 454-466, 2002.
- INÁCIO, F. D.; FERREIRA, R. O.; ARAUJO, C. A. V.; PERALTA R. M.; DE SOUZA, C. G. M. Production of Enzymes and Biotransformation of Orange Waste by Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. *Advances in Microbiology*, 5, p. 1-8, 2015.
- JURADO, M.; MARTINÈZ, A.T.; MARTINEZ, M.J.; SAPARRAT, M.C.N. Application of white-rot fungi in transformation, detoxification, or revalorization of agriculture wastes: role of laccase in the processes. *Comprehensive Biotechnology*, 6, p. 95-603, 2011.
- KACZALA, F., SALOMON, P.S., MARQUES, M., GRANÉLI, E., HOGLAND, W. Effects from log-yard stormwater runoff on the microalgae *Scenedesmus subspicatus*: intra- storm magnitude and variability. *Journal of Hazard Materials*, 185, p. 732–739, 2011.
- KANNAN, A.; UPRETI, R.K. Influence of distillery effluent on germination and growth of mung bean (*Vigna radiata*) seeds. *Journal of Hazardous Materials*, 153, n. 1-2, p. 609-615, 2008.
- KNOP, D.; YARDEN, O.; HADAR, Y. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, n. 3, 1025-1038, 2015.
- KOCYIGIT, A.; PAZARBASI, M. B.; YASA, Y.; OZDEMIR, G.; KARABOZ, I. Production of laccase from *Trametes trogii* TEM H2: A newly isolated white-rot fungus by air sampling. *Journal of Basic Microbiology*, 52, p. 1-9, 2012.

- KUDANGA, T.; LE ROES-HILL, M. Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, n. 15, p. 6525-6542, 2014.
- KULIKOVA, N. A.; KLEIN, O. I.; STEPANOVA, E. V.; KOROLEVA, O. V. Use of Basidiomycetes in Industrial Waste Processing and Utilization Technologies: Fundamental and Applied Aspects (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47, p. 619-634, 2011.
- KUMAR, V.; WATIL.; NIGAM, P.; BANAT, I. M.; YADAV, B. S.; SINGH, D.; MARCHANT, R.. Decolorization and biodegradation and anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. *Process Biochemistry*, 33, p. 83-88, 1998.
- KUMARI, S.; NARAIAN, R. Decolorization of synthetic brilliant green carpet industry dye through fungal co-culture technology. *Journal of environmental management*, 180, 172-179, 2016.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 169, p. 247-250, 1984.
- LAIME, E.M.; FERNANDES, P.D.O.; SOUZA, D.C.D. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. *Revista Trópica- Ciências Agrárias e Biológicas*, 5, p. 16-29, 2011.
- LEE, M. Y.; LEE, C.; JUNG, H. S.; JEON, M.; KIM, K. S.; YUN, S. H.; HAHN, S. K. Biodegradable photonic melanoidin for theranostic applications. *ACS nano*, 10, n. 1, p. 822-831, 2015.
- LIU, G.; QIN, Y.; LI, Z.; QU, Y. Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. *Biotechnology Advances*, 31, p. 962-975, 2013.
- LIU, Y.; VIJVER, M. G.; PEIJNENBURG, W. J .G. M. Comparing three approaches in extending biotic ligand models to predict the toxicity of binary metal mixtures (Cu–Ni, Cu–Zn and Cu–Ag) to lettuce (*Lactuca sativa L.*). *Chemosphere*, 112, p. 282-288, 2014.
- MACIEL, M .J. M, CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13, p. 1-12, 2010.
- MADHAVI, V.; LELE S. S. Laccase properties and applications, *Bioresources*, 4, p. 1694-1717, 2009.
- MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12, n. 3, p. 355-381, 2008.
- MAJEAU, J. A.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101, n. 7, p. 2331-2350, 2010.
- MANN, J.; MARKHAM, J. L.; PEIRIS, P.; SPOONER-HART, R. N.; HOLFORD, P.; NAIR, N.

- G. Use of olive mill wastewater as a suitable substrate for the production of laccase by *Cerrena* consors. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, p. 138-145, 2015.
- MARQUES, M. O. Aspectos técnicos e legais da produção, transporte e aplicação de vinhaça. In: SEGATO, S. V. et al. (Org.). Atualização em produção de cana-de-açúcar. p. 369-375, 2006.
- MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; BRILLAS, E. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: a general review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 87, n. 3, p. 105-145, 2009.
- MASSADEH, M. I.; FRAIJ, A.; FANDI, K. Effect of Carbon Sources on The Extracellular Lignocellulolytic Enzymetic System of *Pleurotus Sajor-Caju*. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 3, n. 2, 51-554, 2010.
- MAYER A. M.; STAPLES R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, p. 551-565, 2002.
- MEKMOUCHE, Y.; ZHOU, S.; CUSANO, A. M.; RECORD, E.; LOMASCOLO, A.; ROBERT, V.; TRON, T. Gram-scale production of a basidiomycetous laccase in *Aspergillus niger*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117, n. 1, p. 25-27, 2014.
- MENALE, C.; NICOLUCCI, C.; CATAPANE, M.; ROSSI, S.; BENCIVENGA, U.; MITA, D. G.; DIANO, N. Optimization of operational conditions for biodegradation of chlorophenols by laccase-polyacrylonitrile beads system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 78, p. 38-44, 2012.
- MOGHARABI, M.; FARAMARZI, M. A. Laccase and laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 356, p. 897-927, 2014.
- MONTEIRO, M. S.; LOPES, T.; MANN, R. M.; PAIVA, C., SOARES, A. M. V. M.; SANTOS, C. Microsatellite instability in *Lactuca sativa* chronically exposed to cadmium. *Mutation Research*, 672, p. 90-94, 2009.
- MOORE, D.; ROBSON, G.; TRINCI, A.P.J. Fungi in ecosystems. 21st century guidebook to fungi. New York: *Cambridge University Press*, p. 238-245, 2011.
- MORAES, B. S.; TRIOLO, J. M.; LECONA, V. P.; ZAIAT, M.; SOMMER, S. G. Biogas production within the bioethanol production chain: Use of co-substrates for anaerobic digestion of sugar beet vinasse. *Bioresource Technology*, 190, p. 227-234, 2015.
- MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; GORBACHEVA, M. A.; SHLEEV, S. V.; YAROLOV, A. I. "Blue" laccases. *Biochemistry*, 72, p. 1136-50, 2007a.
- MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; SHLEEV, S.V.; YAROLOV, Y. I. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43, p. 523-535, 2007b.
- MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. São Carlos: *Ed. Rima*, p. 29, 2009.

- MUKHOPADHYAY, R., GUHA, A. K. A comprehensive analysis of the nutritional quality of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in deproteinized whey medium. *LWT-Food Science and Technology*, 61, n. 2, p. 339-345, 2015.
- NAIK, N. M.; JAGADEESH, K.S.; ALAGAWADI, A.R. Microbial decolorization of spentwash: a review. *Indian Journal of Microbiology*, 48, p. 41-48, 2008.
- NAIK, N., JAGADEESH, K. S.; NOOLVI, M. N. Enhanced degradation of melanoidin and caramel in biomethanated distillery spentwash by microorganisms isolated from mangroves. *Iranica Journal of Energy and Environment*, 1, 347-351, 2010.
- NASCIMENTO, W. M. Germinação de sementes de alface. *Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças*, Brasília, 29, p. 01-10, 2002.
- NGAI, P.H.K.; NG, T.B. A ribonuclease with antimicrobial, antimutagenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Peptides*, 5, p.11-17, 2004.
- NIE, X.; FAN, C.; WANG, Z.; SU, T.; LIU, X.; AN, T. Toxic assessment of the leachates of paddy soils and river sediments from e-waste dismantling sites to microalga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, p. 168–176, 2015.
- NIE, X.P.; LIU, B.Y.; YU, H.J.; LIU, W.Q.; YANG, Y.F. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Pollution*, 172, p. 23–32, 2013.
- OLIVEIRA, P. L.; DUARTE, M. C. T.; PONEZI, A. N.; DURRANT, L. R. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pulilus* and *Paenibacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, p. 818-826, 2009.
- OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRIGUEZ-COUTO, S. Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Research*, 10, 2010.
- PALÁCIO, S. M.; NOGUEIRA, D. A.; MANENTI, D. R.; MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; BORBA, F. H. Estudo da toxicidade de efluente têxtil tratado por fotofenton artificial utilizando as espécies *Lactuca sativa* e *Artemia salina*. *ENGEVISTA*, 14, p. 53-60, 2012.
- PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. *Bioresource Technology*, 98, n. 12, 2321-2334, 2007.
- PASSARINI, M.R.Z.; RODRIGUES, M.V.N.; DA SILVA, M.; SETTE, L.D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 62, p. 364-370, 2011.
- PATRICK, F.; MTUI, G.; MSHANDETE, AM.; KIVAISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. *African Journal of Biotechnology*, 10, n. 50, p. 10166–10177, 2011.
- PEZZAROSSA, B.; PETRUZZELLI, G.; PETACCO, F.; MALORGIO, F.; FERRI, T. Absorption of selenium by *Lactuca sativa* as affected by carboxymethylcellulose. *Chemosphere*, 67, p. 322-329, 2007.

- PHILIPPOUSSIS, A.; ZERVAKIS, G.; DIAMANTOPOULOU, P. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Valvariella valvavea* and *Pleurotus spp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, p. 191-200, 2001.
- PIRES, J.C.M.; GONÇALVES, A. L.; MARTINS, F. G.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; SIMÕES, M. Effect of light supply on CO₂ capture from atmosphere by *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 19, p. 1109-1117, 2014.
- PISCITELLI, A.; GIARDINA, P.; LETTERA, V.; PEZZELLA, C.; SANNIA, G.; FARACOV. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics*, 12, p. 104-112, 2011.
- POLLEGIONI L, TONIN F, ROSINI E. Lignin-degrading enzymes: a review. *FEBS Journal*, 282, p. 1190 - 453 213, 2015.
- PUPO, M. M. S.; COSTA, L. S.; FIGUEIREDO, A. C.; SILVA, R. S.; CUNHA, F. G. C.; EGUILUZ, K. I. B.; SALAZAR-BANDA, G. R. Photoelectrocatalytic Degradation of Indanthrene Blue Dye using Ti/Ru-Based Electrodes Prepared by a Modified Pechini Method. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 24, n. 3, 459-472, 2013.
- PURNOMO, A. S.; MORI, T.; PUTRA, S. R.; KONDO, R. Biotransformation of heptachlor and heptachlor epoxide by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82, p. 40-44, 2013.
- RAJASUNDARI. K.; MURUGESAN, R. Decolourization of Distillery Waste Water - Role of Microbes and their Potential Oxidative Enzymes (Review). *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 1, p. 54-68, 2011.
- RAO, A. N. S.; VENKATARANGAIAH, V. T. Metal oxide-coated anodes in wastewater treatment. *Environmental Science Pollution Research*, 21, 3197-3217, 2014.
- RAO, M. A.; SCELZA, R.; ACEVEDO, F.; DIEZ, M. C.; GIANFREDA, L. Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*, 107, 145-162, 2014.
- RETES-PRUNEDA, J. L., DAVILA-VAZQUEZ, G., MEDINA-RAMÍREZ, I., CHAVEZ-VELA, N. A., LOZANO-ALVAREZ, J. A., ALATRISTE-MONDRAGON, F., & JAUREGUI-RINCON, J. High removal of chemical and biochemical oxygen demand from tequila vinasses by using physicochemical and biological methods. *Environmental Technology*, 35, n. 14, p. 1773-1784, 2014.
- RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*, 24, n.5, p. 219-226, 2006.
- ROBLES-GONZALEZ, V.; MAYER, J.G.; SEIJAS, N.R.; VARALDO, H.M.P.; Treatment of mescal vinasses: A review. *Journal of Biotechnology*, 157, n. 4, p. 524-546, 2012.
- ROCHA, J. H. B.; GOMES, M. M. S.; DOS SANTOS, E. V.; DE MOURA, E. C. M.; DA SILVA, D. R.; QUIROZ, M. A.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. Electrochemical degradation of Novacron Yellow C-RG using boron-doped diamond and platinum anodes: Direct and Indirect oxidation. *Electrochimica Acta*, 140, 419-426, 2014.

- RODRÍGUEZ-DELGADO, MELISSA M.; ALEMÁN-NAVA, G. S.; RODRÍGUEZ-DELGADO, J. M.; DIECK-ASSAD, G.; MARTÍNEZ-CHAPA, S.O.; BARCELÓ, DAMIÀ.; PARRA, ROBERTO. Trends in Analytical Chemistry Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 74, p. 21–45, 2015.
- RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Em Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones; Morales, G. C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, cap. 1-3, 2004.
- SACRISTÁN, D.; RECATALÁA, L.; VISCARRA ROSSEL, R.A. Toxicity and bioaccumulation of Cu in an accumulator crop (*Lactuca sativa L.*) in different Australian agricultural soils. *Scientia Horticulturae*, 193, p.346-352, 2015.
- SADEGHI, S. H.; HAZBAVI, Z.; HARCHEGANI, M. K. Controllability of runoff and soil loss from small plots treated by vinasse-produced biochar. *Science of The Total Environment*, 541, p. 483-490, 2016.
- SALAZAR-BANDA, G. R.; CARVALHO, A. E. de; ANDRADE, L. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the activation and physical degradation of boron-doped Diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. *Journal of Applied Electrochemistry*, 40, p. 1817-1827, 2010.
- SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, p.185–94, 2009.
- SARTORI, S. B., FERREIRA, L. F. R., MESSIAS, T. G., SOUZA, G., POMPEU, G. B., & MONTEIRO, R. T. R. *Pleurotus* biomass production on vinasse and its potential use for aquaculture feed. *Mycology*, 6, n.1, p. 28-34, 2015.
- SEIXAS, F.L.; GIMENES, M.L.; FERNANDES-MACHADO, N.R.C. Tratamento da vinhaça por adsorção em carvão de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, 39, n. 2, p. 172-179, 2016.
- SEYIS, I.; SUBASIOGLU, T. Screening of different fungi for decolorization of molasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, n. 1, p. 61-65, 2009.
- SHAO, C.; CHEN, A.; YAN, B.; SHAO, Q.; ZHU, K. Improvement of electrochemical performance of tin dioxide electrodes through manganese and antimony co-doping. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 778, p. 7-11, 2016.
- SHIN, S.; CHOI, Y. W.; CHOI, J. Water splitting by dimensionally stable anode prepared through micro-arc oxidation. *Materials Letters*, 105, p. 117-119, 2013.
- SIFUNA, F. W.; ORATA, F.; OKELLO, V.; JEMUTAI-KIMOSOP, S. Comparative studies in electrochemical degradation of sulfamethoxazole and diclofenac in water by using various electrodes and phosphate and sulfate supporting electrolytes. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 51, n.11, p. 954-961, 2016.
- SILVA, E.A.; MENDONÇA, V.; TOSTA, M.S.; OLIVEIRA, A.C.; REIS, L.L.; BARDIVIESSO, D.M. Germinação da semente e produção de mudas de cultivares de alface em diferentes substratos. *Semina: Ciências Agrárias*, 29, n.2, p.245-254, 2008.

- SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. O.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 11, n. 1, p. 108-114, 2007.
- SILVA, P.; MATOS, M. Assessment of the impact of Aluminum on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131, 151-156, 2016.
- SIRÉS, I.; BRILLAS, E.; OTURAN, M. A.; RODRIGO, M. A.; PANIZZA, M. Electrochemical advanced oxidation processes: today and tomorrow. A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, n. 14, p. 8336-8367, 2014.
- SIRIANUNTAPIBOON, S.; SIHANONTH, P.; SOMCHAI, P.; ATTHASAMPUNNA, P.; HAYASHIDA, S. An adsorption mechanism for melanoidin decolorization by *Rhizoctonia* sp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, n. 7, p. 1185–1189, 1995.
- SMEETS, E.M.W.; FAAIJ, A.P.C.; LEWANDOWSKI, I.M.; TURKENBURG, W.C. A Bottom-Up Assessment and Review of Global Bio-Energy Potentials to 2050. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33, p. 56-106, 2007.
- SOBRERO, M. C.; RONCO, A. “Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga”. IN: Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas Ed., Chile. cap 4, 2004.
- SOLANO, A. M. S.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; GARCIA-SEGURA, S.; EL-GHENYMY, A.; BRILLAS, E. Application of electrochemical advanced oxidation processes with a boron-doped diamond anode to degrade acidic solutions of Reactive Blue 15 (Turquoise Blue) dye. *Electrochimica Acta*, 197, p. 210-220, 2016.
- SOPAJ, F.; RODRIGO, M.A.; OTURAN, N.; PODVORICA, F.I.; PINSON, J.; OTURAN, M.A. Influence of the anode materials on the electrochemical oxidation efficiency. Application to oxidative degradation of the pharmaceutical amoxicillin. *Chemical Engineering Journal*, 262, p. 286–294, 2015.
- SOUZA, F. L.; AQUINO, J. M.; MIWA, D. W.; RODRIGO, M. A.; MOTHEO, A. J. Photo-assisted electrochemical degradation of the dimethyl phthalate ester on DSA[®] electrode. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2, n. 2, p. 811-818, 2014.
- SOUZA, J. K. C.; MESQUITA, F.O.; NETO, J. D.; SOUZA, M. M. A.; FARIAS, C. H. A.; MENDES, H. C.; NUNES, R. M. A. Fertirrigação com vinhaça na produção de cana-de-açúcar. *Revista Agropecuária Científica no Semiárido*, 11, n. 2, p. 7-12, 2015.
- STRONG P.J.; CLAUS H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41, p. 373-434, 2011.
- STRONG, P. J. Fungal remediation of Amarulla distillery wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, p. 133–144, 2010.
- SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, 81, p. 234-240, 1989.

- SZYMANSKI, M. S. E.; BALBINOT, R.; SCHIRMER, W. N.; Biodigestão anaeróbia da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono—estudo de caso. *Semina: Ciências agrárias*, 31, n. 4, p. 901-912, 2010.
- TAKASE, T.; NARISE, A.; SAKURAI, K. Deodorant composition. *Int. Pat. Appl. Wo Patent* 2,011,105,042, 2011.
- TAMADA, I. S.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R.; BIDOIA, E. D. Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, n. 4, 1576-1581, 2012.
- TANG, J.; WANG, M.; WANG, F.; SUN, Q.; ZHOU, Q. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, 23, p. 845-851, 2011.
- TANG, X.; PANGA, Y.; JIA, P.; GAOA, P.; NGUYENA, T.H.; TONGA, YAN'NA. Cadmium uptake in above ground parts of lettuce (*Lactuca sativa L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125, p.102-106, 2016.
- TARAZONA, J.V., RAMOS-PERALONSO, M.J. Ecotoxicology, Wildlife. *Biomedical Sciences*, 3, p. 306-309, 2014.
- TASMIN, R.; SHIMASAKI, Y.; TSUYAMA, M.; QIU, X.; KHALIL, F.; OKINO, N.; YAMADA, N.; FUKUDA, S.; KANG, I.J.; OSHIMA, Y. Elevated water temperature reduces the acute toxicity of the widely used herbicide diuron to a green alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, p. 1064-1070, 2014.
- THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, p. 19–26, 1994.
- TSAO, C.C.; CAMPBELL, J.E.; MENA-CARRASCO, M.; SPAK, S.N.; CARMICHAEL, G.R. AND CHEN, Y. Increased Estimates of Air-Pollution Emissions from Brazilian Sugar-Cane Ethanol. *Nature Climate Change*, 2, p. 53-57, 2012.
- TUNAY, O.; KABDASLI, I., ARSLAN-ALATON, I., OLMEZ-HANCI.T. Chemical oxidation applications for industrial wastewaters. *IWA Publishing*, London, 2010.
- TURRO, E.; GIANNIS, A.; COSSU, R.; GIDARAKOS, E.; MANTZAVINOS, D.; KATSAOUNIS, A. Electrochemical oxidation of stabilized landfill leachate on DSA electrodes. *Journal of Hazardous Materials*, 190, p. 460-465, 2011.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR – UNICA. Estado da Arte da Vinhaça. São Paulo, 2015. Disponível em: < <http://www.portalunica.com.br>>. Acesso em: 11 de agos. 2016.
- VALERIO, M. E.; GARCIA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa L.*). *Science Total Environment*, 378, p. 63-66, 2007.
- VAN KUIJK, S. J. A.; SONNENBERG, A. S. M.; BAARS, J. J. P.; HENDRIKS, W. H.; CONE, J. W. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. *Biotechnology Advances*, 33, n. 1, p. 191-202, 2015.

- VANNINI, C.; DOMINGO, G.; MARSONI, M.; DE MATTIA, F.; LABRA, M.; CASTIGLIONI, S.; BRACALE, M. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology*, 101, p. 459-465, 2011.
- VISWANATH, B.; RAJESH, B.; JANARDHAN, A.; KUMAR, A. P.; NARASIMHA, G. Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. *Enzyme Research*, 14, p. 324-333, 2014.
- WIDSTEN, P.; KANDELBAUER, A. Laccase applications in the forest products industry: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, p. 293–307, 2008.
- WILKIE, A. C., RIEDESEL, K. J., & OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 19, p. 63–102, 2000.
- WU, LI-NA.; DA-WEI, LIANG.; YING-YING, XU.; TING, LIU.; YONGZHEN, PENG.; JIE, ZHANG. A robust and cost-effective integrated process for nitrogen and bio-refractory organics removal from landfill leachate via short-cut nitrification, anaerobic ammonium oxidation in tandem with electrochemical oxidation. *Bioresource Technology*, 211, p. 23-62, 2016.
- YANG, S. D.; LIU, J. X.; WU, J.; TAN, H. W.; LI, Y. R. Effects of vinasse and press mud application on the biological properties of soils and productivity of sugarcane. *Sugar Tech*, 15, n. 2, p. 152-158, 2013.
- YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P. A.; CRESPO, D. C.; RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, p. 182-186, 2012.
- ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. 2ª ed. São Paulo: RIMA, p. 464, 2006.
- ZALTAUSKAITE, J.; SUJETOVIENE, G.; CYPALITE, A. Municipal effluents toxicity evaluation using higher terrestrial, aquatic plants, and invertebrates. *Environmental Engineering*, 2, p. 713-718, 2011.
- ZAYAS, T.; RÓMERO, V.; SALGADO, L.; MERAZ, M.; MORALES, U. Applicability of coagulation/flocculation and electrochemical processes to the purification of biologically treated vinasse effluent. *Separation and Purification Technology*, 57, n. 2, p. 270-276, 2007.
- ZHAO, G.; CUI, X.; LIU, M.; LI, P.; ZHANG, Y.; CAO, T.; LI, HONGXU.; LEI, YANZHU.; LIU, LEI.; LI, D. Electrochemical degradation of refractory pollutant using a novel microstructured TiO₂ nanotubes/Sb-doped SnO₂ electrode. *Environmental Science & Technology*, 43, n. 5, p. 1480-1486, 2009.
- ZHENG, M.; CHI, Y.; YI, H.; SHAO, S. Decolorization of Alizarin Red and other synthetic dyes by a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 36, p. 39-45, 2014.
- ZHUO, Q., DENG, S., YANG, B., HUANG, J., YU, G. Efficient electrochemical oxidation of perfluorooctanoate using a Ti/SnO₂-Sb-Bi anode. *Environmental Science & Technology*, 45, p. 2973-2979, 2011.

ZOPPAS, F. M.; MENEGUZZI, A.; TRAMONTINA, F. Alternatives for Cellulase Production in Submerged Fermentation with Agroindustrial Wastes. *International Journal of Modern Engineering Research*, 3, n. 4, p. 2374–2381, 2013.

ZOUARI, H.; LABAT, M.; SAYADI, S. Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures. *Bioresource Technology*, 84, p. 145-150, 2002.

PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

- **Artigo aceito em periódico internacional:**

VILAR, D. S.; CARVALHO, G. O.; PUPO, M. S.; TORRES, N. H.; AMÉRICO, J. H. P.; CAVALCANTI, E. B.; EGUILUZ, K. I. B.; SALAZAR-BANDA, G. R.; LEITE, M. S.; FERREIRA, L. F. R. Vinasse degradation using *Pleurotus sajor-caju* in a combined biological – electrochemical oxidation treatment. *Separation and Purification Technology*.

- **Artigos submetidos:**

WADT, L. C.; FERREIRA, L. F. R.; AGUIAR, M. M.; TORRES, N. H.; AMÉRICO, J. H. P.; VILAR, D. S.; GUIMARÃES, T. C.; DE HOLLANDA, L. M.; MONTEIRO, R. T. R. *Pleurotus* biomass rich in proteins and exopolysaccharides by cultivation in vinasse. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

CARVALHO, R. S.; FERREIRA, L. F. R.; GOMES, L. H.; AGUIAR, M. M.; DE HOLLANDA, L. M.; TORRES, N. H.; AMÉRICO, J. H. P.; VILAR, D. S.; TAVARES, F. C. Production of fructose and ethanol from sugarcane juice and molasses using *Saccharomyces cerevisiae* hexokinase-less. *Journal of Biotechnology*.

- **Capítulo de livro em publicação:**

AGUIAR, M.M.; LOPEZ, A.M.Q.; AMÉRICO, J. H. P.; VILAR, D. S.; SILVA, A. L. S.; FERREIRA, L. F. R. Precipitação de proteínas. In: Álvaro Silva Lima; César Costapinto Santana. (Org). Extração e Purificação de Biomoléculas. 1 ed, Grupo Tiradentes, p. 7-11, 2017.

- **Trabalho completo apresentado (pôster):**

VILAR, D. S.; CARVALHO, G. O.; AMERICICO, J. H. P.; TORRES, N. H.; SOUZA, R. L.; FERREIRA, L. F. R. Produção de enzimas ligninolíticas a partir da biodegradação do bagaço de cana-de-açúcar por *Phanerochaete Chrysosporium*. COBEQ 2016-XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Fortaleza- CE, Brasil, 2016.

- **Trabalho apresentado (oral):**

VILAR, D. S.; CARVALHO, G. O.; TORRES, N. H.; SOUZA, R. L.; LEITE, M. S.; FERREIRA, L. F. R. Degradação da vinhaça por tratamento combinado com *Pleurotus sajor-caju* e oxidação eletroquímica. 7º Simpósio de Engenharia e Tecnologia-UNIT, Aracaju- SE, Brasil, 2016.

- **Resumos apresentados em evento local:**

FERNANDES, C. D.; VILAR, D. S.; FERREIRA, L. F. R. Seleção de microrganismos degradadores de vinhaça. 18º Semana de Pesquisa-UNIT, Aracaju- SE, Brasil, 2016.

VIEIRA, Y. A.; VILAR, D. S.; FERREIRA, L. F. R. Produção de lacase de *Pleurotus sajor-caju* usando vinhaça proveniente da indústria sucroenergética. 18º Semana de Pesquisa-UNIT, Aracaju- SE, Brasil, 2016.

CARVALHO, G. O.; VILAR, D. S.; FERREIRA, L. F. R. Produção de lacase e biomassa microbiana usando subproduto da indústria sucroenergética. 18º Semana de Pesquisa-UNIT, Aracaju- SE, Brasil, 2016.

CAVALCANTE, N. M.; VILAR, D. S.; FERREIRA, L. F. R. Biodegradação de vinhaça por fungos basidiomicetos e avaliação da toxicidade usando *Daphnia magna* como bioindicador. 18º Semana de Pesquisa-UNIT, Aracaju- SE, Brasil, 2016.