VIVIANE SARDILLI RODRIGUES

DEGRADAÇÃO BACTERIANA DE COMPOSTOS FENÓLICOS VISANDO A DESCONTAMINAÇÃO DA AREIA DE FUNDIÇÃO

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catalogação-na-publicação

Rodrigues, Viviane
Degradação bacteriana de compostos fenólicos visando a degradação da areia de fundição / V. Rodrigues -- versão corr. -- São Paulo, 2019.
78 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Bioquímica 2.Fenol 3.Degradação bacteriana I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

VIVIANE SARDILLI RODRIGUES

DEGRADAÇÃO BACTERIANA DE COMPOSTOS FENÓLICOS VISANDO A DESCONTAMINAÇÃO DA AREIA DE FUNDIÇÃO

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Soares Tenório

São Paulo

2019

Dedico este trabalho, aos meus queridos pais, João Carlos e Ana Maria, ao meu irmão João Renato e ao meu amor, Edemicio Francisco.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Alberto Soares Tenório, pela oportunidade de fazer parte deste grupo, pela orientação e pelas experiências vividas que contribuíram com o meu crescimento profissional, muito obrigada.

Prof. Dra. Denise Crocce Romano Espinosa, pelo apoio e pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, João Carlos e Ana Maria, pela educação, pelos valores ensinados e pelos sacrifícios que fizeram por mim para que eu me tornasse a pessoa que sou.

Ao meu irmão João Renato e à minha cunhada Karina, pelo companheirismo e por ter me proporcionado momentos descontraídos nesta minha jornada como mestranda.

Ao meu namorado, e futuro marido, Edemicio Francisco, pelo amor, pela paciência e pela companhia nesta e nas outras etapas da minha vida.

Bruno Karolski, pela dedicação, profissionalismo e pela enorme paciência nos ensinamentos que contribuíram, não só para o desenvolvimento deste trabalho, como também para meu crescimento profissional.

Lidiane Maria, pelos conselhos, pela paciência e pelo ensinamento que levarei ao resto de minha vida profissional.

Aos colegas do LAREX e do CEPEMA que se tornaram os meus amigos e com os quais sempre vou ser grata, em especial a Amzy, Daniel, Vivi Tavares, Kayo, Vanessa, Caio, Thamires, Beatriz, Carlos, Solange, Jorge Coleti, Ana Carolina, Marcela, Elena, Nilson e Rafaela.

Aos colegas de outro laboratório, Meriellen e Maria Anita do DEMPSTER.

Universidade de São Paulo e ao Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica.

A todos que direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o meu melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

RESUMO

A areia de fundição aglomerada com a resina fenólica se transforma num resíduo perigoso após o seu uso na indústria metalúrgica. O fenol, o meta-cresol e orto-cresol foram os principais compostos encontrados na areia de fundição. O presente trabalho tem por objetivo estudar a capacidade de degradação bacteriana do fenol, do meta-cresol e do orto-cresol. Para tanto foi isolada uma cepa proveniente de um resíduo de extração de petróleo tendo sido identificada pelo MALDI-Biotyper como sendo do gênero *Burkholderia*. Foi realizado o processo de ativação e crescimento bacteriano em pH 6,5, 180 rpm, 28°C e meio de cultura com mínimo de nutrientes, tendo como fonte de carbono areia de fundição contaminada com a resina fenólica. Durante os ensaios foram estudados o crescimento da bactéria bem como a degradação dos compostos fenólicos citados neste texto. A quantificação do fenol, meta-cresol e orto-cresol livres foram determinadas pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*). A taxa de degradação para as três substâncias foi de 100%.

Palavras-chave: Fenólicos. Biodegradação. *Burkholderia diffusa*. Fundição

ABSTRACT

The foundry sand agglomerated with the phenolic resin becomes a hazardous waste after its use in the metallurgical industry. Phenol, ortho cresol and meta cresol were the main compounds in sand. The present work aims to study the bacterial degradability of the phenolic compounds present in the foundry sand. A strain from na oil extraction residue was isolated and identified by MALDI-Biotyper as *Burkholderia*. It was carried out the process of bacterial activation and growth at pH 6.5, 180 rpm (rotation per minute), 28°C and culture médium with minimum nutrients, using phenolic sand as the only source of carbon. During the tests the growth of the bacterium as well as the degradation of the phenolic compounds were studied. Quantification of free phenol, meta-cresol and ortho-cresol was determined by the high performance liquid chromatography (HPLC) method. The degradation rate for the three substances was 100%.

Keywords: Phenolic. Biodegradation. *Burkholderia diffusa*. Foundry

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO…….. 13

2. REVISÃO DA LITERATURA…….. 15

2.1. Resíduos sólidos……..15

2.1.1. Classificação dos resíduos sólidos……..15

2.1.2. Gerenciamento dos resíduos sólidos……... 17

2.2. Fundição……....20

2.2.1. O processo de fundição…….. 20

2.2.2. Principal método de moldagem (SHELL MOLDING-MOLDAGEM EM CASCA)..... 22

2.2.2.1 Revestimento a morno (warm coating)..... 24

2.2.2.2 Revestimento a quente (hot coating)..... 24

2.2.2.3 Revestimento a frio……. 25

2.2.3 Formação de resíduos na fundição-Areia de moldagem……... 25

2.3. Resinas Fenólicas……... 28

2.3.1. Formaldeído……30

2.3.2. Fenol……31

2.4. Biodegradação de compostos fenólicos……... 32

3. OBJETIVO…….. 36

4. MATERIALE MÉTODOS……37

4.1. Caracterização da areia de fundição com resina fenólica……38

4.1.1. Análise do pH do substrato……... 38

4.1.2. Análise de granulometria da areia de fundição…….. 38

4.1.3. Extração do fenol, orto-cresol e meta-cresol total na areia de fundição. 39

4.2. Degradação biológica dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição……41

4.2.1. Visualização da morfologia da bactéria trabalhada…….. 41

4.2.2. Identificação da bactéria através da técnica de MALDI-Biotyper……... 42

4.2.3. Tratamento de degradação biológica do fenol, meta-cresol e orto-cresol……....44

4.2.3.1. Ensaio de degradação direto na areia de fundição…….. 44

4.2.3.2. Ensaio de degradação das soluções aquosas contendo os compostos fenólicos……....46

4.3.3.3. Análise da densidade óptica (OD600)..... 49

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO…… 50

5.1. Caracterização da areia de fundição com resina fenólica……50

5.1.1. Análise do pH do substrato……... 50

5.1.1. Análise de granulometria da areia de cromita……... 51

5.1.2 Extração do fenol, meta-cresol e orto-cresol total na areia de fundição.. 51

5.2. Degradação biológica dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição……54

5.2.1. Visualização da morfologia da bactéria trabalhada…….. 55

5.2.3. Identificação da bactéria através da técnica de MALDI-Biotyper……... 55

5.2.3. Tratamento de degradação biológica do fenol, meta-cresol e orto-cresol……....5
7

5.2.3.1. Ensaio de degradação direto na areia de fundição……..
57

5.2.3.2. Ensaio de degradação das soluções aquosas contendo os compostos fenólicos……....62

6. CONCLUSÃO……....70

REFERÊNCIAS…… 71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Caracterização e classificação de resíduos……....16

Figura 2: Tipos de tratamentos utilizados pelas indústrias……....20

Figura 3: Esquema da linha de fundição……..22

Figura 4: Ilustração da caixa de moldagem……23

Figura 5: Comparação das estruturas das resinas fenólicas……....30

Figura 6: Forma estrutural de uma molécula de formaldeído……...31

Figura 7: Forma estrutural de uma molécula de formol……31

Figura 8: Etapas realizadas para o estudo do tratamento de areia de fundição…...38

Figura 9: Jogo de peneiras empilhadas acoplada no agitador de peneiras……...39

Figura 10: Etapas realizadas no tratamento de degradação dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição……...45

Figura 11: Etapas realizadas no tratamento de degradação do fenol……47

Figura 12: Etapas realizadas no tratamento de degradação do meta-cresol e do orto-cresol……...48

Figura 13: Distribuição granulométrica da areia de cromita……..51

Figura 14: Cromatograma dos poluentes presentes na areia de fundição……52

Figura 15: Concentração ao decorrer dos 7 dias de extração do fenol……...53

Figura 16: Concentração ao decorrer dos 7 dias de extração do meta-cresol……..53

Figura 17: Concentração ao decorrer dos 7 dias de extração do orto-cresol……55

Figura 18: Imagem do tamanho da bactéria……56

Figura 19: Cepa colorida para definição do Gram……..56

Figura 20: Cultivo em meio de cultura mínima com a cepa isolada……57

Figura 21: Cultivo em meio de cultura LB com a cepa isolada……57

Figura 22: Espectro de proteínas da bactéria estudada obtido através do MALDI-Biotyper……..58

Figura 23: Degradação dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição...60

Figura 24-A: Cromatograma inicial da degradação dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição……...60

Figura 24-B: Cromatograma final da degradação dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição……..**60**

Figura 25: Controle negativo da solução de areia de fundição com o meio de cultura……..**61**

Figura 26-A: Cromatograma inicial do controle negativo……...**61**

Figura 26-B: Cromatograma final do controle negativo……**61**

Figura 27: Variação dos parâmetros em relação da variação da concentração dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição……..**64**

Figura 28: Degradação do fenol……**64**

Figura 29-A: Cromatograma inicial da degradação do fenol……**65**

Figura 29-B: Cromatograma final da degradação do fenol……**65**

Figura 30-A: Cromatograma inicial do controle do fenol……...**65**

Figura 30-B: Cromatograma final do controle do fenol……..**65**

Figura 31-A: Cromatograma inicial da degradação do meta-cresol……**67**

Figura 31-B: Cromatograma final da degradação do meta-cresol……...**67**

Figura 31-C: Degradação do meta-cresol……....**68**

Figura 32-A: Cromatograma inicial do controle do meta-cresol……...**68**

Figura 32-B: Cromatograma final do controle do meta-cresol……..**68**

Figura 33-A: Cromatograma inicial da degradação do orto-cresol……..**69**

Figura 33-B: Cromatograma final da degradação do orto-cresol……**69**

Figura 34-A: Cromatograma inicial do controle do orto-cresol……**69**

Figura 34-B: Cromatograma final do controle do orto-cresol……**69**

Figura 35: Consumo do fenol pela bactéria x Crescimento bacteriano no percorrer da degradação……**70**

Figura 36: Consumo do fenol pela bactéria x Crescimento bacteriano no percorrer da degradação……...**71**

Figura 37: Consumo do fenol pela bactéria x Crescimento bacteriano no percorrer da degradação……**72**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Produção de peças fundidas por mil toneladas no Brasil**…….28**

Tabela 2: Produção mundial de fundidos para a base de 2013**……28**

Tabela 3: Características da areia de fundição**……....38**

Tabela 4: Ensaios para verificar o efeito da agitação e da temperatura no desempenho da biodegradação**……..47**

Tabela 5: Ensaios para verificar o efeito da agitação e da temperatura no desempenho da biodegradação**……..51**

Tabela 6: Valores dos pHs da areia de fundição em meio aquoso e com o meio de cultura**……..52**

Tabela 7: Concentração dos compostos em ppm e a porcentagem de cada poluente em relação com a areia de fundição**……..56**

Tabela 8: Resultados da identificação da bactéria pela técnica MALDI-Biotyper**…..60**

1. INTRODUÇÃO

Areia contaminada com resina fenólica é o principal resíduo na indústria de fundição tanto no Brasil como no mundo. Esse resíduo, devido às concentrações de fenol e compostos aromáticos presentes são classificados, na maioria das vezes, como Resíduos Industriais Perigosos[2]. Além disso, podem ser encontrados outros contaminantes como metais solúveis.

As areias de fundição e moldagem correspondem a 70% de volume de resíduos gerados na indústria de fundição[1].

A areia de moldagem é utilizada para confecção dos moldes e machos, as suas principais características são: ser um material refratário e inerte. Isso significa que a areia de fundição não se dilata em temperaturas suportada pelo metal e que não reage com o metal líquido.

As areias de fundição são a base de sílica ou de quartzo. A areia de cromita é um exemplo de areia não silicosa, de fórmula química $FeO.Cr_2O_3$; ou seja, não tem a sílica (SiO_2) em seu mineral base. Entretanto, a sílica é encontrada na forma de impureza.

Esse tipo de areia é mais utilizado em processos de fundições de peças de aço, isso porque ela apresenta algumas vantagens, como por exemplo, não dilata em temperaturas inferiores a 3.000°C e ainda é compatível com qualquer sistema de aglomeração, sendo a resina sintética, em especial a resina fenólica, a mais empregada para aglomerar os grãos de areia. As resinas fenólicas são polímeros termofixas.

Em algumas circunstâncias o descarte correto da areia de fundição não ocorre, uma vez que é oneroso para as empresas arcarem com o custo de transporte e locação do aterro. Logo, frequentemente há utilização de aterros clandestinos[3,4].

Guney et al. (2004), reportaram à reciclagem da areia de fundição essencial na composição de concretos para construção civil e composição para asfalto[7–10]. Entretanto, a biorremediação bacteriana da resina fenólica na areia de fundição ainda não foi reportada.

A presente pesquisa teve como objetivo a biorremediação do fenol, o-cresol e

m-cresol, principais contaminantes presentes na areia de fundição residual, por *Burkholderia*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Resíduos sólidos

Com a Revolução Industrial o avanço tecnológico resultou na geração de compostos sintéticos, com propriedades tóxicas[11,12]. Os principais focos poluidores são oriundos da área industrial que podem ser extraídos de recursos naturais ou até pelos rejeitos gerados nos processos produtivos[13,14].

Os resíduos sólidos originados nas indústrias, apresentam uma diferença quando comparados aos rejeitos urbanos, já que em muitos casos os rejeitos sólidos industriais são apontados como perigosos e podem representar danos para os seres humanos e para o ecossistema[12].

Conforme a revista REUNIR (2013)[15], todas as empresas que foram entrevistadas geram resíduos sólidos, sendo que dessa totalidade 71% geram efluentes líquidos e apenas 19% geram resíduos gasosos[15].

A NBR 10.004 é fundamentada no sistema americano, pertencente ao *Code of Federal Registry-Title 40 (CFR 40) – Protection of Environment*, porém há classificação peculiar à conduta brasileira, pois no Brasil analisa a solubilização dos resíduos em corpos d'água e em solos, classificando-os em inertes e não-inertes[2,16].

2.1.1. Classificação dos resíduos sólidos

Os resíduos são classificados quanto ao potencial risco ao meio ambiente e à saúde pública, partindo do processo ou da atividade que são originados. São divididos em dois grupos, os perigosos e não perigosos, sendo o último grupo subdividido em não-inerte e inerte[2].

A Figura 1 ilustra o funcionamento da seleção para caracterizar o rejeito independente de que processo originou o resíduo.

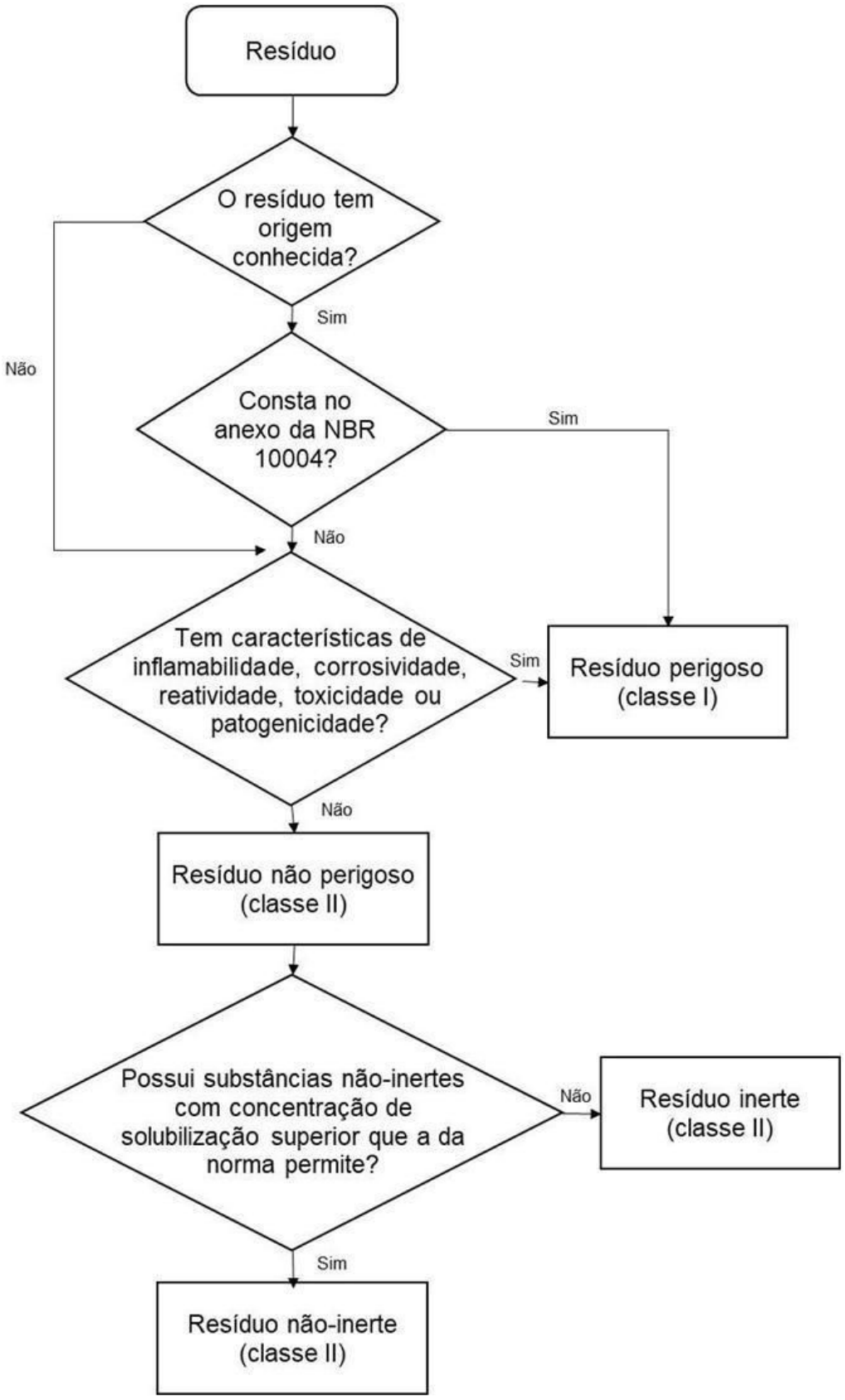


Figura 1: Caracterização e classificação de resíduos[2] (Adaptado de ABNT 10.004 Resíduos Sólidos Classificação)

Para classificar os resíduos sólidos são levadas em consideração características, como: inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade e patogenicidade do material descartado[11,2].

Há outras normas embasadas na ABNT que visam atribuir e diferenciar os resíduos sólidos que são a NBR 10005:2004-Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos, a NBR 10006:2004-Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos e a NBR 10007:2004-Amostragem de resíduos sólidos, sendo o último específico para armazenamento de resíduos que será descrito na próxima subseção.

A norma NBR 10005:2004 visa distinguir os resíduos sólidos classificados pela NBR 10004:2004 como classe I-perigosos e classe II-não perigosos, através de extrato lixiviado deles[17]. A outra norma consolidada na ABNT para classificação de resíduos sólidos é a NBR 10006:2004 que objetiva diferenciar os resíduos não perigosos em não inertes e inertes, partindo de análises físico-químicos e químicos[18].

2.1.2. Gerenciamento dos resíduos sólidos

O gerenciamento de resíduos é constituído por recolhimento, transporte, processamento, reciclagem ou o descarte em aterros sanitários, sendo esse monitorado por lei. E o seu objetivo é oferecer condições salubres à sociedade em relação à vida sanitária e a motivação de reutilizar o material que seria rejeitado[11,19].

O resíduo gerado, que não pode ser tratado ou descartado no local, deve ser enviado para descarte em sítios externos da planta de fabricação, esses locais devem ser regulamentados por organizações que podem ser regionais, estaduais e federais[11,12]. Conforme descrito na subseção anterior, os materiais podem assumir uma variedade de rótulos, desde perigosos e não-perigosos até inerte e não-inerte, mas todos constituem uma despesa e responsabilidade para a gestão ambiental, ou seja, independente da característica do resíduo deve-se passar pela regulamentação antes do descarte[11].

Leis ambientais foram criadas para evitar e remediar os problemas causados pelos setores industriais, por isso elas tornam-se criteriosas em exigir aterros

legalizados, incineradores, instalações de compostagem ou qualquer outra tecnologia alternativa de descarte de resíduos sólidos[11,20,19].

Quando se lidam com materiais sólidos, o método de descarte mais utilizado é o aterro, sendo os sanitários (resíduos comuns) e os industriais (resíduos especiais).

Há aterros desde os mais modernos até os mais simples, sendo que os aterros modernos contêm coleta e tratamento de lixiviados (chorumes) enquanto os aterros simples possibilitam somente o descarte dos resíduos[11,21].

Conforme Woodard & Curran (2006)[11], os órgãos regulamentadores exigem constantemente monitoramentos das águas subterrâneas nos locais onde se encontram os resíduos aterrados, com o propósito de minimizar o impacto ambiental e assegurar a conservação das propriedades e composição dos resíduos[11,12].

O descarte de resíduos nos aterros tem suas vantagens, como: adequação de resíduos variados; às vezes é a única alternativa de descarte de resíduos; geração de energia através dos gases coletados; e o solo pode ser restaurado fornecendo valor e espaço, como construções de parques ou planejamento de áreas verdes que servem como habitat para animais selvagens. Por outro lado, há suas desvantagens também, por exemplo, a falta de regulamento das áreas resultando um impacto negativo ao meio ambiente; escassez de locais específicos para realização da implantação de novos aterros; contaminação do solo; poluição sonora; odores desagradáveis; e emissões de poluentes atmosféricos[21].

Atualmente, várias empresas vêm desenvolvendo e planejando o gerenciamento de seus resíduos, com o intuito de reduzir a quantidade de resíduos descartados em aterros. A minimização está diretamente relacionada à reciclagem e a reutilização do resíduo gerado, proporcionando melhorias nos fatores econômicos externos e internos[11].

Em contrapartida, há empresas que descartam seus resíduos sem responsabilidade ou atenção, e isso pode decorrer por alguns fatores, por exemplo, a falta de conhecimento pela empresa, pouco recurso para aplicações de alternativas de descarte e insuficiência de pessoal especializado, tornando um descaso por carência de uma boa fiscalização[14,16].

Os resíduos industriais necessitam ser rotulados com algumas especiações,

por exemplo: origem do resíduo, nome da substância que está sendo descartada e propriedade química (inflamável, tóxico, corrosivo e reativo). Com a rotulação facilita o local de armazenamento antes do descarte e a escolha do método de descarte[11].

Os resíduos sólidos perigosos são tratados e descartados em locais inspecionados por lei antes de serem destinados aos aterros industriais, e dependendo de suas características precisam ser armazenados em áreas diferentes dos outros descartes[12,19].

Já os resíduos sólidos não perigosos podem ser barrados por algumas legislações que devem ser destinados a aterros especiais, e eles também passam pelo mesmo processo de tratamento dos resíduos perigosos. Porém, os órgãos regulamentadores não são rigorosos com esses resíduos, por conseguinte, podendo armazenar temporariamente na empresa até conseguirem descartá-los[15].

A norma NBR 10007:2004, que visa obter um plano de amostragem que se inicia por uma coleta de resíduo em quantidade expressiva objetiva as classificar e consequentemente tratar, armazenar e transportar o resíduo ao seu destino final[22].

De acordo com Vasconcelos (2013)[15], 71% das empresas entrevistadas reciclam seus resíduos e 60% das indústrias realizam a coleta seletiva, entretanto a coleta seletiva não é considerada como um meio alternativo, mas uma etapa de transição entre a geração e gerência dos resíduos. Dessas companhias 35% reutilizam seus resíduos como matéria prima na linha produção, sendo que 26% executam a compostagem, ou seja, é a técnica decomposição dos materiais descartados com a utilização de microrganismos.

Além disso, há 16% que reaproveitam os seus resíduos para fabricação de subprodutos, principalmente em coprodutos na própria linha de produção, resultando um rendimento financeiro para a empresa. Por fim, 42% das organizações fazem uso de outros métodos, como incineração, destinação a aterros, doações a outras instituições, venda de sucatas, devolução ao fornecedor, descontaminação, fertirrigação, tratamento de efluente e coprocessamento em fornos de cimento[15].

A Figura 2 representa de forma ilustrativa os valores citados anteriormente.

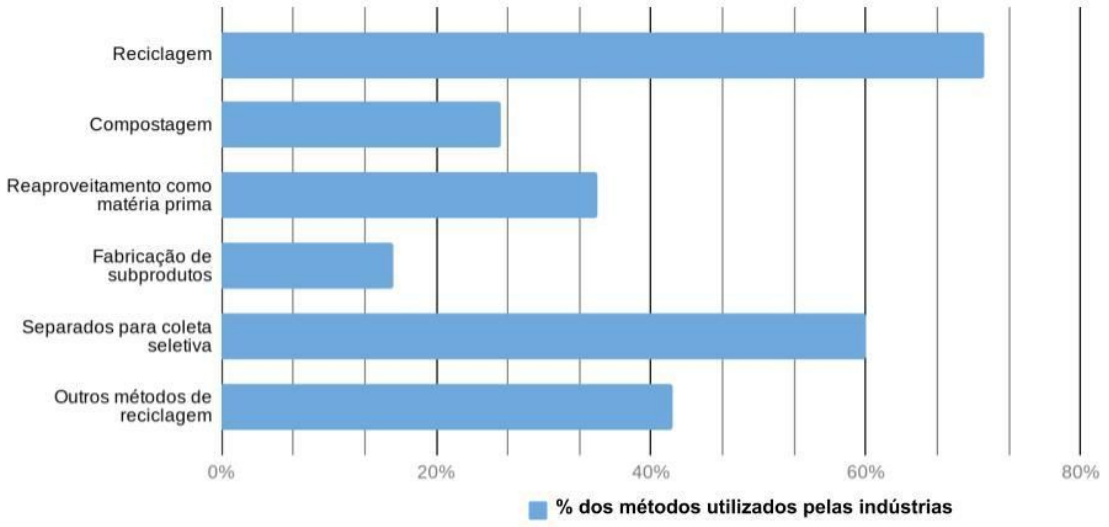


Figura 2: Tipos de tratamentos utilizados pelas indústrias[15] (Adaptado de Vasconcelos, Revista REUNIR, 2013

Países desenvolvidos possuem sistemas de gerenciamento moderno, tornando-os assim referência no segmento de reciclagem e separação de resíduos. Muitos países emergentes almejam chegar a esse nível, e alguns já estão providenciando mudanças tecnológicas[19,20].

A resolução CONAMA número 313 (2002) viabiliza o inventário nacional de resíduos sólidos gerados pelas indústrias nacionais, utilizando praticamente os mesmos procedimentos de coleta de amostras, priorizando a parte mais burocrática, de documentos e coletas de dados das companhias[23].

As leis abrangem todos os setores industriais, inclusive a área de fundição a qual gera também resíduos sólidos[24].

2.2. Fundição

2.2.1. O processo de fundição

O princípio fundamental da fundição é fabricar peças metálicas com perfeito

formato[5,25]. A área de fundição é reconhecida por consumir sucatas metálicas como matéria prima e em contrapartida é o setor que gera grande volume de resíduos sólidos, sendo os principais a areia de fundição e poeiras variadas[24].

O processo de fundição é constituído em duas operações, a primeira é a produção de moldes e de machos; já a segunda é a fundição do metal. Em ambas operações é empregada a areia de fundição aglomerada como ligante químico[5,26].

Para a confecção da peça metálica é preciso um modelo que dará a forma do molde. O molde pode ser feccionado em madeira, metal, cera ou poliestireno; essa etapa de moldagem recebe o nome de modelação. Paralelamente é produzido também o macho que dará espaços ocos ou vazios ao produto quando necessário, esse procedimento é nomeado pela indústria de macharia[5,26].

Com a confecção do molde e do macho, quando necessário, o metal fundido é vazado no molde, e após esse procedimento a peça é resfriada para que solidifique, a qual será posteriormente desmoldada, ou seja, será retirada a peça solidificada para a realização de rebarbação e limpeza. A Figura 3 ilustra cada etapa realizada no processo de fundição, partindo da macharia e da preparação da areia de fundição que será útil para confortar o molde na caixa de moldagem[5,26].

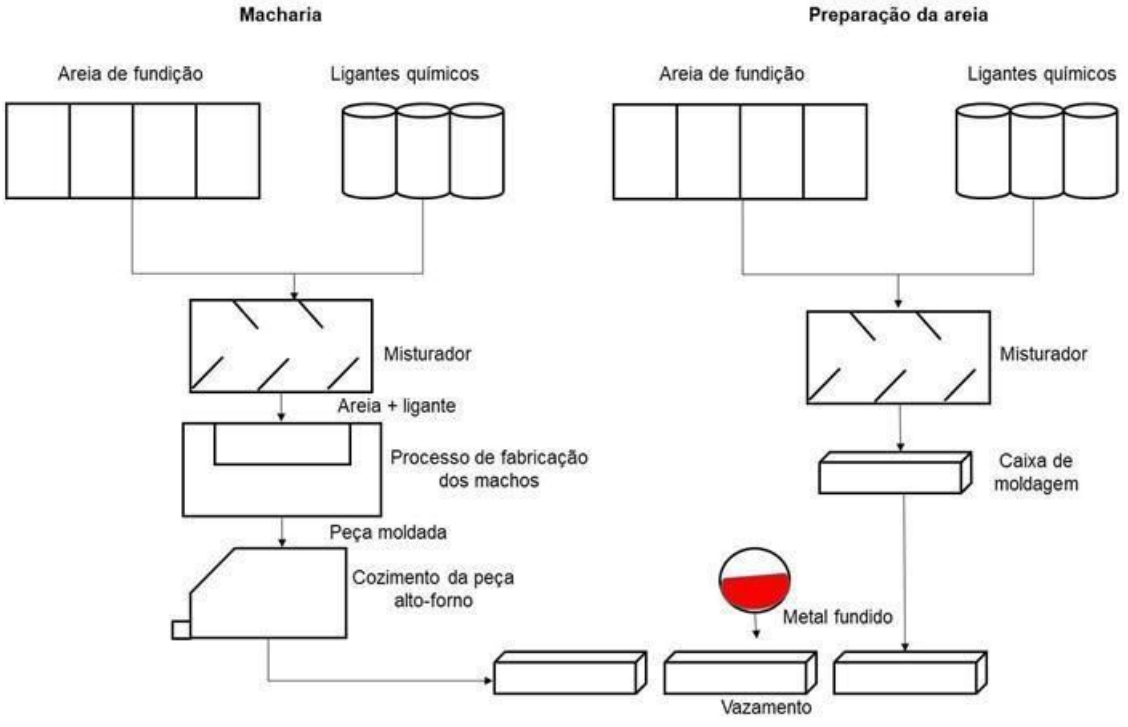


Figura 3: Esquema da linha de fundição (produção própria)

O ponto primordial na fundição é a qualidade final da peça, atingindo todas as dimensões desejáveis pelo fabricante, principalmente o acabamento superficial. Há variações nos métodos de modelação das peças metálicas, sendo eles: processo de cura a frio (*No-Bake/Cold-Set*); processo de caixa quente (*HotBox*); e *Shell Molding*, o mais utilizado nas indústrias metalúrgicas[25,5].

2.2.2. Principal método de moldagem (SHELL MOLDING-MOLDAGEM EM CASCA*)*

O processo *Shell Molding* (moldagem em casca) ou processo Croningo como é mais utilizado atualmente, inovou os métodos tradicionais que utilizavam como matéria prima a areia argilosa e terras de massa úmida, já que é um processo que utiliza uma areia sintetizada sobre um modelo de metal que é feito por uma camada fina de areia de fundição aglomerada com uma resina termofixa[25,5].

A resina utilizada é a fenólica do tipo novolaca que é composta por uma relação molar de fenol e formol, estando o fenol em excesso. Ela é uma resina termofixa, ou seja, que necessita absorver calor para que se cure completamente, geralmente é adicionado hexamina (hexametilenotetramina) como conversor para a cura final da resina fenólica do tipo novolaca (na seção 2.3-Resinas fenólicas, está descrito o modo de preparação e a descrição das propriedades físicas e químicas das resinas fenólicas)[25,5].

Para a técnica de moldagem em casca se usa caixas de moldagem constituídas com moldes de parede finas e leves, em que contorna a cavidade da caixa. É um material de simples uso e econômico em relação ao volume de matéria prima consumida[25,27] (ver Figura 4).

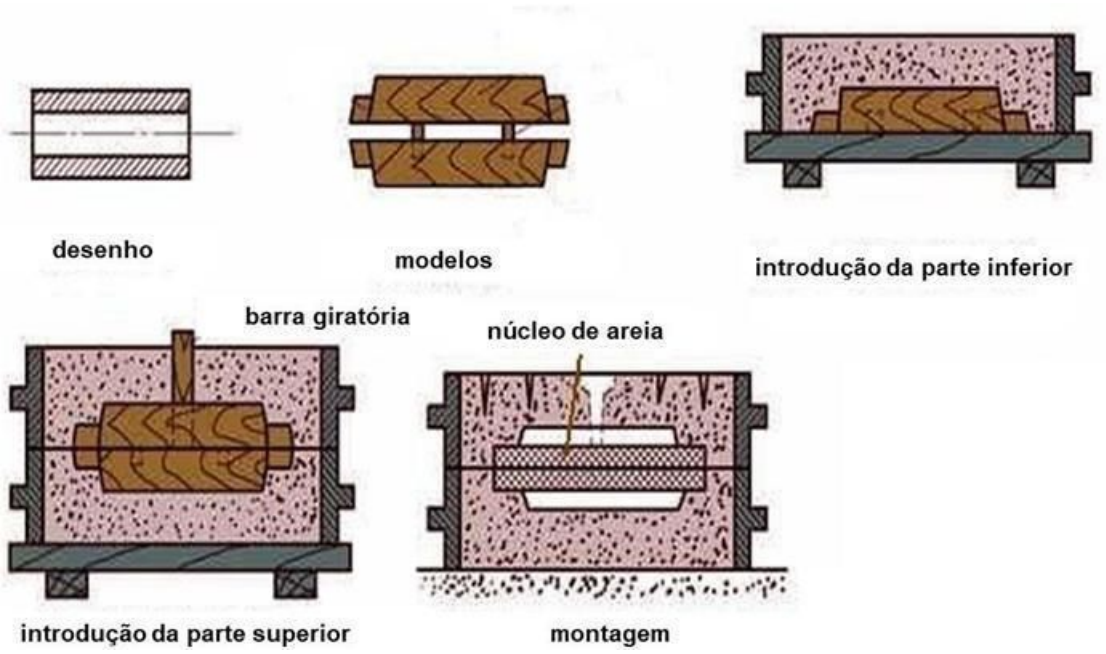


Figura 4: Ilustração da caixa de moldagem

As principais vantagens do processo *Shell Molding* são: o acabamento superficial de qualidade, estabilidade dimensional, tolerância mais restrita, diminuição da rebarbação e da usinagem, possibilidade de armazenamento de moldes e machos (pois não absorvem umidade), facilidade no manuseio e sem que ocorra a sinterização da areia[5].

Por outro lado, a desvantagem principal que é a calcinação da resina sintética em queimadores especiais, que acarreta a eliminação da areia, não podendo recuperá-la, além de ocorrer emissões de gases no material metálico que não foram totalmente calcinado[5].

A areia de fundição com a resina fenólica é misturada e depois descarregada em um recipiente basculante que é tampado pela placa modelo, tendo a possibilidade de ser aproveitada na hora ou armazenada por tempo indeterminado[5].

Outro método de moldagem em casca é da areia revestida com resina ou areia coberta, o benefício desse processo comparado com o método dos componentes a seco, é que a resina seca (em pó) pode ser removida da areia quando for soprada[5].

O molde é dividido em duas partes, uma das partes recebe o metal vazado enquanto a outra metade forma uma concha ao ser prensada, a peça utilizada na

prensa tem que ser vedada para evitar o desperdício de metais e para que não formem bolhas de ar[5].

Para a preparação da areia coberta é necessário utilizar a resina fenólica líquida, a fim de proporcionar melhor homogeneização da mistura, que é encontrada em três métodos de revestimentos: a morno, a quente e a frio[5,3].

2.2.2.1 Revestimento a morno (warm coating)

É um processo indicado para média ou larga escala, normalmente são empregadas resinas fenólicas líquidas dissolvidas em soluções para a formação de uma película de resina semi-sólida ao redor do grão de areia. O solvente que pode ser isopropanol, etanol ou metanol, deve ser obrigatoriamente removido no seu total volume, para evitar o amolecimento da resina e posterior aglomeração quando a areia for estocada. É adicionado também um conversor, geralmente hexamina, que catalisará a cura da resina. Ao fazer a mistura desses compostos é necessário ser injetado ar quente ou ligeiramente aquecido entre de 90 e 150 °C, até que a resina obtenha uma resistência à tração e à flexão[3,5].

A peça quente é resfriada para atingir a temperatura ambiente na areia coberta, àquela será usada instantaneamente ou armazenada em sacos ou em silos[3,5].

Este método pode impactar de uma forma negativa o meio ambiente, pois há eliminação do solvente utilizado, e isso pode ocasionar explosões no local de trabalho, além de contaminar o solo[3].

2.2.2.2 Revestimento a quente (hot coating)

Método destinado à produção de larga escala, utilizando areia quente entre 160 e 180 °C que é a faixa de temperatura em que as resina fenólicas em escamas podem fundir sem curar. Neste processo é acrescentado também a hexamina como conversor para que ocorra a reação com a resina[3,5].

Pode-se empregar a resina fenólica líquida neste procedimento, porém algumas etapas mudam como a adição do conversor deve ser aplicado antes da

água, até que atinja o ponto de gelificação, e então a água é introduzida para interromper o processo. A areia quente é homogeneizada e depois envolvida com uma resina fenólica sólida, que se funde superficialmente com os grãos[3,5].

2.2.2.3 Revestimento a frio

A areia coberta a frio foi o método pioneiro utilizado na produção de peças fundidas através do processo de *Shell Molding*, sendo considerado um procedimento simples que constitui em uma mistura de resina fenólica novolaca, areia e solvente alcoólico, porém é imprescindível o uso de um misturador rápido. Esse tipo de tecnologia foi desenvolvido na Alemanha e nos Estados Unidos[3].

Essa técnica não é muito utilizada nas indústrias, porque apresentam desvantagens, por exemplo, teor de álcool residual, ocasionando grumos nos grãos e heterogeneidade na areia, o qual retém a umidade do ar[3].

2.2.3 Formação de resíduos na fundição-Areia de moldagem

A indústria de fundição por sua vez também é uma geradora de resíduos sólidos, e especialistas vêm tentando desenvolver para diminuir os problemas ambientais causados pelo setor metalúrgico. Esses impactos ambientais são divididos em: manuseio de materiais perigosos, emissões de gases poluentes, descarte de areia de fundição e pós de mineração, contaminação direta ao solo quando as areias de fundição são descartadas clandestinamente fora de aterros especiais[4,28,29,30,31].

A areia de fundição é a matéria mais aplicada nos processos de fundição, 70% comparando com outros materiais empregados, pois é resistente à danos por calor, fácil disponibilidade e apresenta afinidades com ligantes de material orgânico. Por ser o material mais abundante na linha de produção, a sua proporção de descarte é equivalente ao seu volume utilizado na fabricação de peças[9].

Os motivos de descarte da areia são a perda de sua resistência ao fogo e a contaminação por metais e por resinas empregadas na compactação, consequentemente se tornando disfuncional ao processo de moldagem, portanto, ela

é considerada um bem não renovável[9].

O anexo H da NBR 10.004[2] classifica a areia de fundição como não perigosa, mas isso não é o suficiente em considerá-la como um descarte não nocivo ao meio ambiente, pois é necessário empregar as características da resina empregada como ligante e dos metais que foram fundidos. Portanto, é importante identificar a composição química presente na areia antes de tomar qualquer decisão de descarte[2].

O Brasil gera quase 2 milhões de toneladas anuais de resíduos, correspondendo mais de três quartos do total de resíduos gerados pela indústria de fundição. A areia de fundição é classificada, com base na NBR 10.004, como um resíduo perigoso (CLASSE I) ou como não inerte (CLASSE II), dependendo do processo de moldagem/macharia[32,33].

Conforme Casotti, Filho & Castro (BNDES,2011)[31], a massa usada de areia de fundição varia de 0,8 a 1,0 tonelada para cada 1 tonelada de molde ou macho produzido. Após o processo de desmoldagem 90% da areia pode ser reaproveitada e 10% do volume é descartado em aterros industriais ou destinados a fabricantes de cimento[31].

O Brasil produz mais de 2 milhões de toneladas de peças metálicas (Tabela 1)[33], estando assim entre os dez principais produtores do mundo (Tabela 2)[24,25,34,35].

Tabela 1-Produção de peças fundidas por mil toneladas no Brasil (Referência: ABIFA[33])

Produção de fundidos (em mil toneladas por ano)										
2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
2.083	2.969	3.087	3.250	3.355	2.297	3.241	3.344	2.860	3.071	2.737

Tabela 2-Produção mundial de fundidos para a base de 2013 (Referência: ABIFA[33])

1º	China	44.500 toneladas
2º	EUA	12.250 toneladas
3º	Índia	9.810 toneladas
4º	Japão	5.538 toneladas
5º	Alemanha	5.187 toneladas
6º	Rússia	4.100 toneladas
7º	Brasil	3.071 toneladas
8º	Coréia	2.562 toneladas
9º	Itália	2.562 toneladas
10º	França	1.748 toneladas

De acordo com Singh & Siddique (2009)[9], nos Estados Unidos, a indústria de fundição produz aproximadamente 100 milhões de toneladas de areia por ano, dos quais 6 a 10 milhões de toneladas são descartadas e podem ser reutilizadas para outros produtos e até em outros setores. Tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos, o principal gerador de areia de fundição é a indústria automotiva[1,5,9].

As areias de moldagem são grãos com granulometria variando de 0,05 a 2,00mm e são constituídas essencialmente de sílica (SiO_2) podendo estar ligada com algum composto mineral, como ailmenita, a magnesita, ao livina e a cromita. As vezes poderão ser encontradas em depósitos naturais, contaminadas com a argila.

A areia deve ser um material inerte e refratário, ao ponto de se adequar ao calor transmitido pelo metal que será fundido[5,9].

Em processos que requerem condições térmicas em particular, acima de 3.000°C utilizam-se areias com pontos de fusão e de sinterização mais elevados do que o quartzo. Entre essas matérias primas estão o silicato de zircônio, a areia de cromita e a areia de olivina (essa é raramente usada quando se aplica resinas sintéticas)[3].

A areia de cromita é considerada uma areia não silicosa, por não conter a sílica em sua fórmula química[5]. É sintetizada através de britagem das rochas de cromita e ferro ($FeO.Cr_2O_3$), podendo variar a concentração com a própria sílica[5]. É um material preto, brilhante e seus grãos são angulares. Tem boa resistência a penetração de metais, boa condutividade térmica e densidade específica,

promovendo um resfriamento uniforme e acentuado[5,36].

O teor de FeO e SiO_2 pode afetar a qualidade do refratário, portanto o ideal é manter o nível dessas duas impurezas em um nível baixo em relação a quantidade de óxido de cromo[3,36].

Outra vantagem na utilização da areia de cromita é que não ocorre defeitos de expansão nas peças fundidas, devido a sua incapacidade de expansão térmica, ou seja baixa dilatação, e além de ser compatível com todo sistema de aglomeração. A desvantagem é que a quantidade de catalisador é maior quando comparado com outros tipos de areia, pois a cromita tem uma boa capacidade de absorção[3,36].

As areias de fundição são geralmente aglomeradas com o uso de resinas sintéticas, usualmente são as termofixas que têm características de possuir estabilidade térmica, permanecendo no mesmo estado físico em temperaturas acima de 3.000°C, bem como aglutinam os grãos de areia, possuem uma estabilidade mecânica, e são bons isolantes, portanto protegem a matéria e possibilitam a otimização à vida útil da areia[3,36,6].

As resinas têm a capacidade de alterar o pH das areias, e essa variação deve estar relacionada aos diferentes compostos químicos aplicados nas areias virgens como ligantes. Segundo Soares (2010)[37], o pH não está diretamente relacionado com o teor de toxicidade, mas interfere no meio ambiente quando descartadas, por isso é necessário que a faixa de pH esteja entre 6,0 a 8,5. Nesse sentido, as areias quimicamente ligadas, principalmente as resinas fenólicas, furânicas e alquídica apresentam um teor relevante de toxicidade[37].

2.3. Resinas Fenólicas

Segundo Bitencourt & Pandolfelli (2013)[38], as resinas fenólicas começaram a ser comercializadas para substituir o piche, isso porque são consideradas salubres para o ambiente de trabalho, por reter os aromáticos policíclicos no componente refratário. São compostos classificados como termofixos, e possuem a capacidade de polimerização ou de cura em temperaturas de 130 °C, em outras palavras, as moléculas se fundem formando polímeros de alta densidade de ligações cruzadas.

O tipo de ligação química favorece a ductilidade da resina, formando uma

matéria sólida e quimicamente inerte. A iniciação da polimerização geralmente é induzida por catalisadores como ácidos e ésteres, ou por indução física, como o calor ou radiação[5,38].

Com a solidificação formam-se materiais insolúveis, infusíveis, estáveis e de alta rigidez, e isso acontece por reações químicas complexas, como reticulação das moléculas, polimerização e até condesação. E para tudo ocorrer espontaneamente é necessário adequar os fatores de pH e temperatura[5,39].

Os estados físicos das resinas quando em temperatura ambiente (±25°C) são geralmente líquidas com viscosidade densa ou sólidas. Se tratando de resinas fenólicas do tipo novolaca, elas são encontradas em estado sólido ou dissolvidas em alguns solventes, e do tipo resol normalmente são disponíveis líquidas. Os solventes mais utilizados são o metanol, o etanol, o etileno glicol, a acetona, a metil-etil-cetona e o furfural[38].

O processo de mistura da areia com a resina depende da viscosidade da mesma, pois o líquido viscoso dificulta a aglomeração dos grãos, refletindo no tempo de agitação e na potência de compactação e no escoamento final da areia[38].

Resinas fenólicas são misturas entre formaldeído e fenol. Quando em sua sintetização há um excesso de formaldeído ou formaldeído e fenol que são equimolares, a resina é caracterizada como resol (formaldeído/formol≥1), resultando em um pH mais básico, sendo que os catalisadores alcalinos utilizados são geralmente o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e hidróxido de bário. Já quando o excesso é a quantidade de fenol, o nome dado para esse tipo de resina é novolaca (formaldeído/fenol<1), caracterizando assim um meio ácido, e geralmente os aditivos que catalisam essa classe de resina são os ácidos orgânicos ou inorgânicos. Nota-se que além do pH, há outras características que as distinguem que são os grupos (Figura 5), os tipos de catalisadores e o método de cura[5,38].

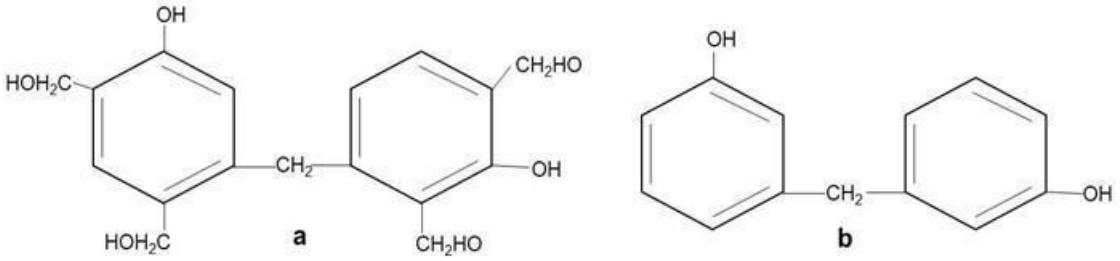


Figura 5: Comparação das estruturas químicas entre as resinas resol e novolaca. Obs.: (a) pré-polímero fenólico do tipo resol; (b) pré-polímero do tipo novolaca[6]

As estruturas presentes nas resinas precisam ser compreendidas, tendo em vista que se trata de uma química complexa, e que, poucos estudos são encontrados sobre as alterações na composição após a pirólise e o comportamento da resina perante ao material refratário[38].

As resinas fenólicas são as mais aplicadas e estudadas atualmente, por apresentarem vantagens como, a capacidade de fixar carbono, que auxilia no acabamento final da peça fundida[38].

2.3.1. Formaldeído

Formaldeído ou somente formol, como é mais conhecido é um composto de cadeia alifática simples e classificado pela química orgânica como um aldeído (Figura 6). Acima de -19 °C já se encontra no estado gasoso, com aparência incolor e com um odor adocicado e irritante[5,6].

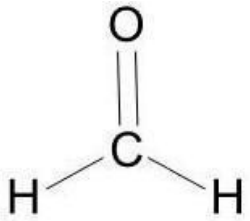


Figura 6:Forma estrutural de uma molécula de formaldeído[6]

O formol é muito reativo principalmente estando em soluções aquosas com concentrações variáveis de metanol. Bastante utilizado na sintetização de resinas

sintéticas, por exemplo, da resina fenólica, que é a reação com o fenol. É aplicado também em fabricações de vários produtos químicos e desinfetantes. Por sua ampla empregabilidade o seu papel é importante para a indústria química[5,6].

Apesar das vantagens de custo e benefício do formaldeído, ele é considerado um produto insalubre, pois provoca irritações nos olhos, na pele, nariz e garganta[6].

2.3.2. Fenol

O fenol é uma substância tóxica e com uma estrutura molecular simples, é composto por um anel benzênico ligado diretamente ao grupo hidroxila (Figura 7). Ele é encontrado geralmente no estado sólido, cristalino e incolor. É solúvel em água, álcool e éter, seu ponto de ebulição é aproximadamente 181°C, quando em contato com ferro e cobre (impurezas) se torna um material com coloração rosa[5,6].

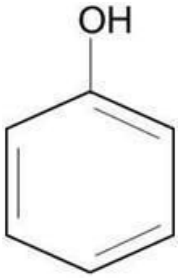


Figura 7: Forma estrutural de uma molécula de fenol[6]

Mesmo contendo o mesmo grupo funcional dos álcoois, ele se comporta como um ácido fraco e é solúvel em hidróxido de sódio em meio aquoso, porém não se dissolve em carbonato de sódio aquoso[6].

O fenol deve ser manipulado de forma restritiva, utilizando EPI's para que não ocorra contaminação em áreas mucosas em seres humanos e menos ainda em contato com o meio ambiente, por ser uma substância corrosiva e venenosa[5,6].

A empregabilidade do fenol é ampla, utiliza em sintetização de resinas de fundição, resinas para pontos abrasivos e materiais de fricção, aglomeração de fibras, laminados para construção civil, confecção de borracha, ciclohexanona, anilina, xilenol e alquifenóis[5,6].

2.4. Biodegradação de compostos fenólicos

Um composto biodegradável é mais fácil de se decompor naturalmente, diminuindo a toxicidade do que um material químico persistente em se degradar, portanto, a biodegradação de substâncias químicas que não são biodegradáveis é um dos fatores mais essenciais para solucionar problemas de impactos ambientais. Portanto, estudos estão sendo realizados em biologia molecular e ecologia oferecendo processos que estão sendo padronizados internacionalmente para novas descobertas de dados de biodegrabilidade para tomada de decisões no tratamento de resíduos industriais, por exemplo, tratamentos dos resíduos por estações biológicas de águas residuais ou em áreas terrestres, tendo consciência que a maior parte das espécies químicas degradadas são orgânicas[40,41,42].

O método de biodegradação é conhecido também como biorremediação, ou seja, é a utilização de bactérias, fungos ou algas ou seus metabolismos para remediar solos ou corpos hídricos, fazendo que os contaminantes passem para formas não tóxicas[41].

As bactérias, os fungos e as algas surgem de áreas contaminadas por esses microrganismos, pois nesses locais possuem substâncias que são fontes de carbono que auxilia no desenvolvimento desses organismos. Através dessas amostras as bactérias, os fungos e as algas são isolados e transportados para o local de tratamento que contém o mesmo contaminante do local retirado[40,41,42].

As bactérias ou fungos são seres vivos imperceptíveis a olho nu, eles existem há milhões de anos transformando substâncias, que muitas vezes são altamente tóxicas aos seres humanos, em alimentos. Tais substâncias, que são somente fonte de energia e proliferação dos microrganismos, podem ser decompostas em compostos com menor teor de toxicidade ou ainda transformá-lo em um composto não tóxicos[41,42].

Porém há substâncias químicas que são difíceis de serem degradadas, como as ligninas ou quitinas, ou as espécies antropogênicas, como o plástico, corantes, pigmentos e resinas fenólicas, mas que por muitas vezes são oferecidas como fonte de carbono junto com os nutrientes necessários para os fungos, especialmente para as bactérias[41,42].

Segundo Pagga (1997)[41], a biodegradação teve início no setor da engenharia no século XX, quando buscava-se otimizar instalações para tratamento de resíduos sólidos e líquidos, usando a degradação aeróbica (em presença de oxigênio) e anaeróbica (encontrada mais em remediação de solos, onde não há a presença de oxigênio). A biodegradação aeróbica pode ser verificada através da medição do carbono orgânico dissolvido (COD), da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), ou da formação biogênica de dióxido de carbono (CO_2)[41].

Para a sobrevivência e reprodução dos microrganismos, é essencial o controle de pH, da temperatura, da umidade, disponibilidade de nutrientes e oxigênio, pois as condições de seus habitats otimizam os seus crescimentos. E a quantidade de carbono tem que ser abundante em relação a outros nutrientes, isso porque é o elemento fundamental à sobrevivência de todos os seres vivos[40,41].

Os processos de biorremediação são reproduzidos em escalas laboratoriais e pilotos, modificando a adaptação das bactérias no meio contaminado com o intuito de otimizar o rendimento da degradação, por exemplo, tratamento de efluentes[41,42].

Para ocorrer a degradação de uma substância química utilizando bactérias, os contaminantes que serão degradados bem como o ambiente no qual os microrganismos foram isolados são analisados. Fatores como concentração do poluente de interesse para não ocorrer a inibição das bactérias, espécies ou colônias microbianas capazes de consumirem os poluentes, disponibilidade direta dos contaminantes para as bactérias, meio de cultura, temperatura, pH, presença de oxigênio e nutrientes, são essenciais para que o processo de degradação seja promissor[40,41,42].

No caso dos compostos fenólicos que são considerados como antissépticos, é possível encontrar bactérias que conseguem degradar os compostos fenólicos e para tanto é necessário considerar a concentração máxima permitida no qual não se torna letal para as bactérias. Assim, quando estabelecido o meio de cultura, as bactérias conseguem hidrolisar os anéis aromáticos que constituem a fórmula estrutural dos compostos fenólicos[43].

Os métodos analíticos para a avaliação da degradação primária são a cromatografia gasosa (GC sigla em inglês para *Gas Chromatography*) ou a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC sigla em inglês para *High*

Performance Liquid Chromatography), os quais possibilitam identificar e quantificar a concentração dos compostos degradados[41,44].

Na biorremediação, há vantagens e desvantagens, sendo que os benefícios trazidos por essa técnica são: o baixo custo quando comparado com os outros meios de tratamento de resíduos, sendo um processo natural e podendo ser aplicada em *in situ*[41,44]. Já as desvantagens são:a limitação de degradação dos compostos e a complexidade de degradação que exige um meio mais rigoroso, em relação as condições que são empregadas para cada tipo de bactéria empregada[41,44].

Bactérias degradadoras de compostos fenólicos estão sendo isoladas e adaptadas em laboratórios para melhoria de suas capacidades de degradação[44,45,46,47].

A literatura reporta bactérias que conseguem degradar compostos fenólicos como, por exemplo, a *Achromobacter.*sp que chega a degradar até 600 µg/L de fenol utilizando-o como sua única fonte de carbono. Outros gêneros de bactérias que utilizam o fenol como a única fonte de carbono são as *Pseudomonas*.sp, *Alcaligenes*.sp, *Sphingomonas*.sp, *Burkholderia*.sp e *Ralstonia eutropha*[41,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59].

As bactérias listadas acima são todas gram-negativas, portanto, elas são multifuncionais e são conhecidas pelas suas propriedades metabólicas que possibilitam que algumas delas se evolua. Por isso, encontram-se frequentemente envolvidas em diversos processos de biorremediação, cuja única fonte de carbono é o fenol. As enzimas envolvidas no processo de degradação do fenol realizam a para-hidroxilação, bastante incomum na via degradativa de bactérias, que normalmente hidroxilam, através da enzima fenol hidroxila-se na posição orto, formando cresol como principal intermediário[41,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59].

A bactéria mais conhecida pela ciência contemporânea é a *Pseudomonas*, cuja capacidade de degradação de fenol é superior à 1000 µg/L[51,60].

De acordo com o estudo realizado por Sahar Zaki (2006)[61], os metabolismos aeróbicos das bactérias clivam o fenol que é transformado em catecol[61].

As bactérias do gênero *Burlkholderia* que são versáteis e que são encontradas em toda natureza, têm importante participação na área da biotecnologia, devido ao seu potencial em controle biológico, em biorremediação e

em controle de pragas em plantações. As *Burlkholderias* são geralmente patogênicas e podem ser encontradas em infecções hospitalares[56–58,62,63].

Todas as bactérias precisam de nutrientes para sobreviver além da fonte de carbono. Essas bactérias degradadoras de fenol citadas anteriormente são aeróbicas, e, portanto elas usam o oxigênio como fonte de nutriente, e ainda necessitam de alguns sais como suplemento, por exemplo, o fosfato de sódio, o fosfato de potássio, o sulfato de magnésio e sulfato ferroso.[58–60].

Estudos voltados ao tratamento biológico de degradação da resina fenólica que compõe a areia de fundição são realizados com fungos[67], os quais modificam a cadeia molecular dos compostos fenólicos. Entretanto, a utilização de bactérias na degradação de tais resinas ainda, é pouco explorada. A vantagem de utilizar bactérias é que não há risco na contaminação do ar e a incomplexidade no entendimento do metabolismo da bactéria, diferentemente dos fungos[67,68].

3. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho consiste em estudar a degradação de compostos fenólicos presentes nas areias de fundição por bactéria adaptada ao fenol. Para tanto foram realizados os seguintes objetivos específicos.

Para caracterização da areia de fundição: analisar o pH da areia de fundição, analisar os tamanhos dos grãos pelo método de granulometria e a quantificar os poluentes presentes no resíduo sólido a serem degradados.

Para a biorremediação da areia de fundição: identificar e caracterizar a bactéria trabalhada e degradação dos poluentes presentes na areia de fundição.

4. MATERIALE MÉTODOS

Este trabalho descreve a biodegradação bacteriana do fenol em areia de fundição. A bactéria usada foi cedida pelo laboratório de microbiologia do CEPEMA-USP (Centro de Pesquisa em Meio Ambiente da Universidade de São Paulo), ela foi isolada de um efluente oriunda de uma indústria de Petróleo.

O método utilizado de isolamento foi o plaqueamento seletivo no qual foi utilizado placas de Petri com meio de cultura LB-Luria Bertani (10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar-ágar).

A areia de fundição ou a areia fenólica utilizada foi obtida de uma indústria metalúrgica.

A pesquisa foi desenvolvida em duas etapas, sendo que a primeira etapa envolveu a caracterização da areia de fundição e dos contaminantes nela contidos. Já na segunda etapa foi realizado o tratamento de degradação da areia fenólica, a Figura 8 ilustra o desenvolvimento realizado.

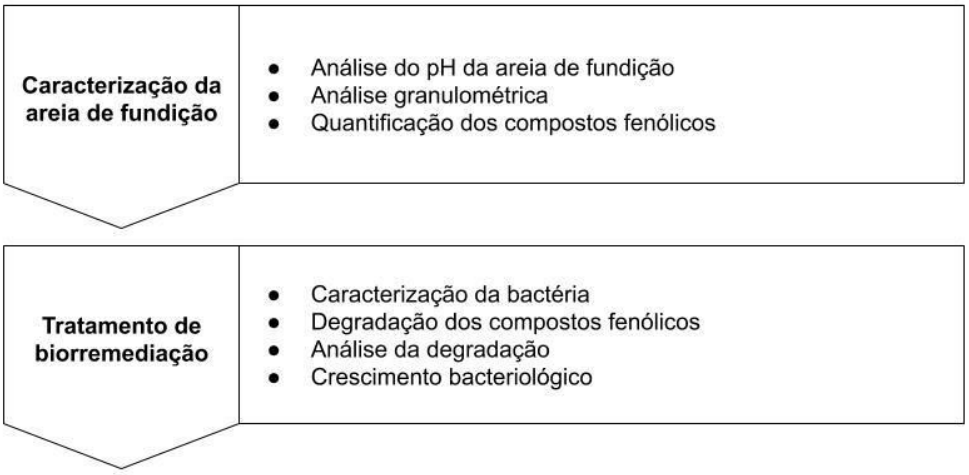


Figura 8: Etapas realizadas para o estudo do tratamento da areia de fundição

Na primeira etapa foram analisados o pH, a granulometria, os metais contidos na areia de cromita e a quantificação do fenol, orto-cresol e meta-cresol da areia de

fundição.

Na segunda etapa seguiu-se com o tratamento, utilizando a bactéria para degradar as moléculas dos compostos fenólicos. A identificação da bactéria e a coloração de Gram também foram realizados nesta etapa, além da análise do crescimento bacteriológico.

A variação de concentração de fenol, orto-cresol e meta-cresol também foram analisados pelo método de concentração mínima inibitória (MIC), pois compostos fenólicos possuem propriedades antimicrobianos, portanto se estiverem em excesso podem levar a morte da bactéria[69,70,52,71].

4.1. Caracterização da areia de fundição com resina fenólica

4.1.1. Análise do pH do substrato

A determinação do pH tem como intuito caracterizar o substrato trabalhado, e esse ensaio foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, foi medido o pH de uma solução aquosa da areia fenólica, que foi realizada em um béquer com capacidade volumétrica de 25 mL, neste béquer foram adicionados 10 mL de água Milli-Q e 5 gramas de areia de fundição. Após feita a solução, agitou-se por 5 minutos em agitador magnético, em seguida o pH foi determinado. O tempo foi baseado na turbidez da solução. Na segunda etapa foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém a água Milli-Q foi substituída pelo meio de cultura (descrito na Subseção 4.2.2), o objetivo desta etapa foi analisar o comportamento do pH da areia fenólica em contato com o meio de cultura.

4.1.2. Análise de granulometria da areia de fundição

Para realização do ensaio foi usado um agitador de peneiras contendo,8 peneiras. As peneiras possuem aberturas de 4mm, 2mm, 1mm, 50µm, 250µm, 125µm, 75µm e 38µm.

Foram pesados 4,5 gramas de areia de cromita e todas as peneiras e o fundo. As peneiras são empilhadas uma sobre outra (Figura 9). A areia foi então depositada

na primeira peneira com abertura 4mm.

Figura 9: Jogo de peneiras empilhadas acoplado no agitador de peneiras

O jogo de peneiras com a areia foi levado para o agitador por 15 minutos em uma frequência de 60 hz.

Depois da agitação o material retido nas peneiras e no fundo foram pesados.

4.1.3. Extração do fenol, orto-cresol e meta-cresol total na areia de fundição

A extração do fenol e de seus derivados presentes na resina fenólica teve como objetivo quantificar os mesmos. Segundo o método de Gardiziella, Pilato & Knop[6], o metanol foi utilizado como solvente. A sequência para realizar o ensaio foi pesar 100 gramas de areia de fundição contendo 1% de resina fenólica em sua composição, essa porcentagem foi informada pela empresa que disponibilizou o resíduo para o estudo. Essa massa foi pesada em um béquer com capacidade volumétrica de 100mL e acrescentou-se neste mesmo béquer 100mL de metanol, agitou-se com um bastão de vidro para homogeneizar o meio, em seguida foram retiradas alíquotas (1mL) em intervalos de 1 hora no período de 8 horas e então em 24 horas. Os fracos (os vials) utilizados para este ensaio foram específicos para cromatográficos com capacidade de 1,5mL. Todas as alíquotas retiradas foram filtradas com seringa utilizando filtro de 0,45µm.

Os frascos foram levados para o cromatógrafo líquido de alta performance, em inglês "*High Performance Liquid Chromatographic*" (HPLC). O equipamento

utilizado para esse trabalho foi com detecção UV-VIS no comprimento de onda de 254nm em uma coluna de fase reversa (C18 ACE 121-2546, 250x4,6mm) tendo como fase móvel acetonitrila, com gradientes de 22% com tempo de corrida de 0 a 3 minutos e 10 a 12 minutos; e 50% com tempo de corrida de 3 a 5 minutos e de 5 a 10 minutos[43].

Para padronizar o tempo de retenção no equipamento das substâncias analisadas foram feitas curvas de padronização, essas curvas auxiliaram na identificação dos compostos fenólicos estudados. Para tanto foram feitas diluições separadas de fenol, meta-cresol e orto-cresol, sendo respectivamente os valores de concentração descritos a seguir: fenol (1000ppm, 750ppm, 500ppm, 250ppm e 100ppm), meta-cresol e orto-cresol (500ppm, 400ppm, 300ppm, 100ppm e 50ppm).

4.2. Degradação biológica dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição

4.2.1. Visualização da morfologia da bactéria trabalhada

Foi realizado o pré-inóculo antes de iniciar o ensaio para visualização da morfologia da cepa. Para tanto foi preparado 50mL de solução contendo meio de cultura mínimo de nutrientes com concentração inicial de 400ppm de fenol, a absorbância inicial do pré-inóculo foi de 0,1. Esse inóculo permaneceu em uma incubadora do tipo *shaker* por um período de três dias em agitação e temperatura constantes, respectivamente 180rpm e 28°C.

Após o terceiro dia o inóculo foi lavado para eliminação de qualquer impureza e que houvesse uma melhor coloração e consequentemente uma melhor visualização no microscópio óptico[75].

O tratamento da cepa foi conduzido em um fluxo laminar da seguinte maneira:

- ✓ Uma alíquota de 200µL do inóculo foi transferida para um tubo de microcentrifuga estéril com capacidade volumétrica de 1,5mL, centrifugada por 5 minutos e em 8.000rpm em uma ultra centrífuga de bancada da marca CAPP e de modelo CR 1512;
- ✓ Após a centrifugação, o precipitado obtido são as bactérias, e o sobrenadante é o meio de cultura com as possíveis impurezas. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta automática de volume de 20 a 200µL da marca Nichiryo e modelo Nichipet EXII Autoclavável;
- ✓ O precipitado foi lavado com 400µL de água Milli-Q esterilizada. Para isso, a bactéria foi resuspendida com o auxílio da pipeta de 200µL, e depois foi novamente centrifugada por 5 minutos a 8.000rpm;
- ✓ Passados os 5 minutos o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente resuspendidas em 400µL de água Milli-Q autoclavada.;

Com a cepa tratada deu-se início ao método de visualização da morfologia que foi realizado nas seguintes etapas[75]:

- ✓ 20µL da cepa lavada foi transferida para uma lâmina de microscopia em forma de gota e depois dispersada com auxílio de uma haste;
- ✓ Após a completa secagem em temperatura ambiente, 25°C(±5);
- ✓ Foi adicionado o corante de cristal violeta. Esse corante permaneceu por 1 minuto na lâmina;
- ✓ Passado um minuto o corante foi retirado em água corrente e esperou-se secar em temperatura ambiente;
- ✓ Após a secagem da lâmina foi acrescentado o lugol para a fixação da cepa na lâmina, sendo que o tempo de espera foi de 1 minuto para que o lugol reagisse com a cepa;
- ✓ Após um minuto a lâmina foi lavada em água corrente para a retirada do lugol;
- ✓ A lâmina foi seca em temperatura ambiente e então foram pingadas gotas de uma solução de álcool com acetona com proporção de 1:1, e o tempo de espera foi somente de 35 segundo para que não houvesse mudanças na morfologia;
- ✓ Depois dos trinta e cinco segundos a lâmina foi lavada novamente em água corrente esperando assim secar em temperatura ambiente;
- ✓ Após a lâmina seca, a cepa foi coberta com um corante de sefranina, e esperou-se 1 minuto para que o corante reagisse com a bactéria;
- ✓ Passado um minuto a lâmina foi lavada em água corrente e esperou-se secar em temperatura ambiente;
- ✓ Com a lâmina seca e com a cepa já corada, realizou-se a análise da morfologia microscópio óptico.

4.2.2. Identificação da bactéria através da técnica de MALDI-Biotyper

MALDI-Biotyper permite identificar as espécies de bactérias através da comparação do espectro de massas das proteínas ribossomais da amostra em estudo com um banco de dados. Para essa análise, a bactéria isolada foi aplicada

em uma placa de análise, na qual é adicionada uma matriz, geralmente um ácido orgânico de baixo peso molecular. Após a completa secagem, a placa é irradiada com um laser e a amostra é vaporizada e ionizada. As moléculas ionizadas são separadas através de analisador por tempo de vôo (*Time of Flight*) no qual as moléculas com menor peso molecular e, consequentemente, maior velocidade, chegam antes ao detector. Os dados gerados fornecem um espectro de massas que é comparado em um banco de dados[76,77,78].

A cepa pré-inoculada em uma solução contendo 4.00ppm de fenol foi adicionada em 50mL de meio de cultura mínimo líquido, cuja composição de sais é 5,35 g/L de NH_4Cl, 31,20 g/L de $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 13,61 g/L de KH_2PO_4, 0,15 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 246 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 11 g/L de $CaCl_2$. No final o pH foi ajustado para 6,5 com NaOH com concentração de 200 g/L. Essa solução foi esterilizada em uma autoclave à temperatura e pressão constantes, respectivamente 121 °C e 1 atm durante 15 minutos.

O pré-inóculo foi incubado à 28 °C e 180 rpm por um período de três dias em um agitador orbital. A partir do pré-inóculo foram preparadas duas placas de Petri, uma contendo meio de cultura LB e 15 g/L de ágar-ágar, cuja solução foi autoclavada em temperatura e pressão constantes, a 121 °C e 1 atm por 15 minutos. A segunda placa contendo meio de cultura mínimo de nutrientes e 15 g/L de ágar-ágar, e o pH foi ajustado para 6,5 com NaOH com concentração de 200 g/L. Essa solução foi autoclavada a uma temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

Foram então preparadas duas soluções, uma sendo composta por 50mL de meio LB e 0,307μL de fenol, e a outra contendo 50mL de meio mínimo e 0,307μL de fenol, ambas resultando em uma concentração de 400ppm de fenol. Essas duas Essas duas soluções foram colocadas em placas de Petri, e esperadas 3 minutos para que elas se solidificassem dentro de um fluxo laminar.

Após a secagem foi transferido um volume de 10μL do inóculo em cada placa de Petri, depois as placas foram levadas para estufa com temperatura constante de 30 °C por um período de 3 dias para o crescimento das bactérias.

Antes das placas serem retiradas da estufa foi preparada uma solução matriz, conforme etapas descritas a seguir:

- ✓ A solução matriz foi preparada utilizando α ciano diluído em 20μL de água destilada, essa solução foi agitada e centrifugada.
- ✓ As placas de Petri contendo as colônias e a matriz foram levadas para um fluxo laminar. Com auxílio palitos de madeira com pontas pontiagudas as colônias isoladas foram transferidas para a placa de amostragem do MALDI-Biotyper.
- ✓ Em seguida foram adicionados 1μL de matriz em cada ponto de amostragem a ser analisado.

A placa de amostragem foi levada à análise de MALDI-Biotyper.

4.2.3. Tratamento de degradação biológica do fenol, meta-cresol e orto-cresol

4.2.3.1. Ensaio de degradação direto na areia de fundição

O ensaio de biodegradação do fenol, meta-cresol e orto-cresol presentes na areia de fundição foi realizado no terceiro dia após a preparação do inóculo em uma solução com concentração inicial de 400ppm de fenol em meio de cultura com mínimo de nutrientes contendo uma concentração bacteriana inicial de 0,1de absorbância.

Em um fluxo laminar esterilizado foi preparado em duplicata as soluções de areia de fundição contaminada com os compostos fenólicos e o meio de cultura com mínimo de nutrientes, a massa e o volume de cada composto foi respectivamente de 15 gramas e de 350mL. Feito as soluções foi adicionado o inóculo com uma concentração inicial de 0,1 de absorbância[43].

A Figura 10 apresenta de forma esquematizada o processo que foi realizado.

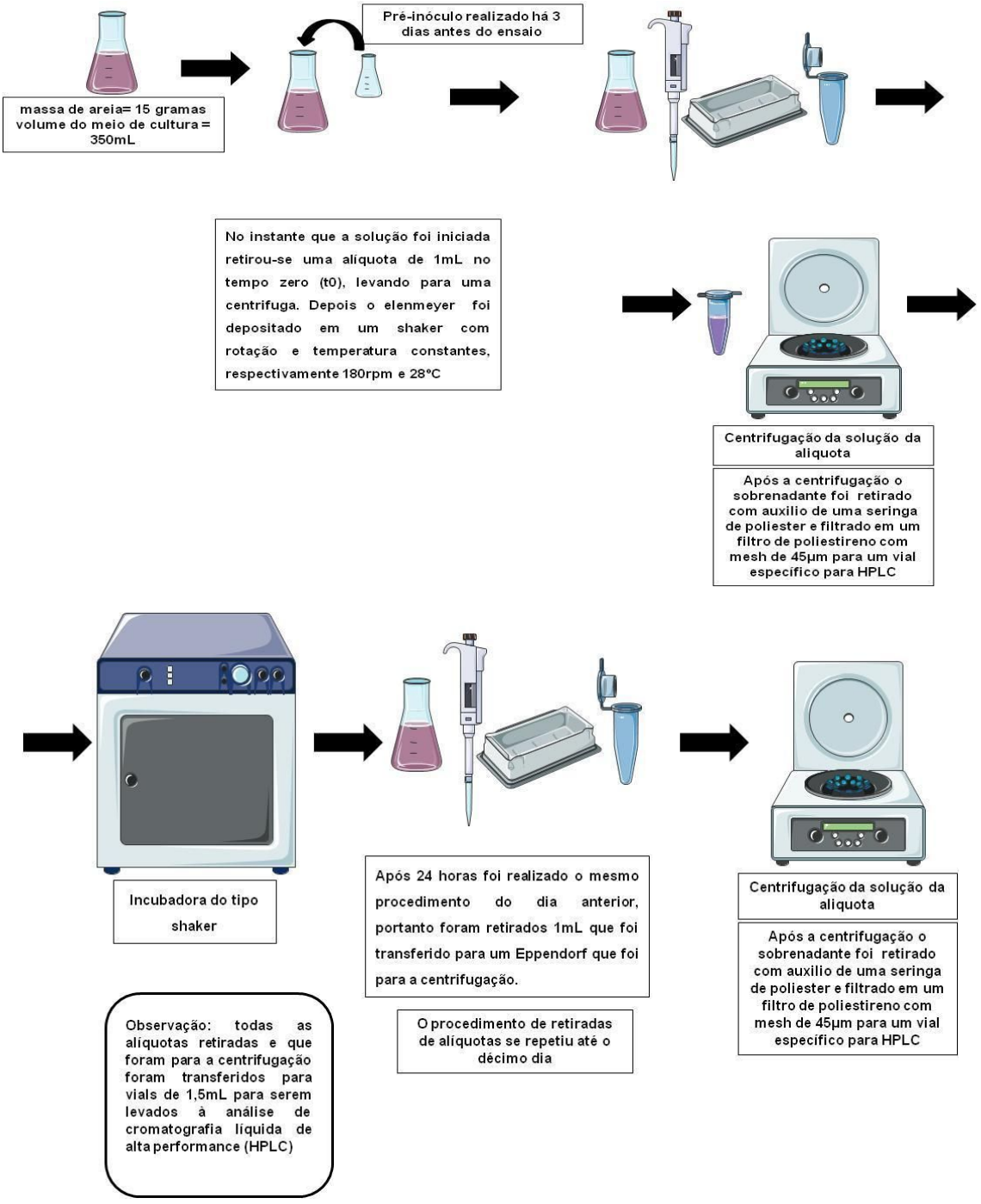


Figura 10: Etapas realizadas no tratamento de degradação dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição

Foram realizados ensaios em diferentes condições de agitação e temperatura para testar o desempenho da biodegradação em cada situação, a Tabela 4 lista as agitações e temperaturas testadas.

Tabela 3-Ensaios para verificar o efeito da agitação e da temperatura no desempenho da biodegradação

Ensaio	Agitação (rpm)	Temperatura (ºC)
B-1	180	28
B-2	200	40

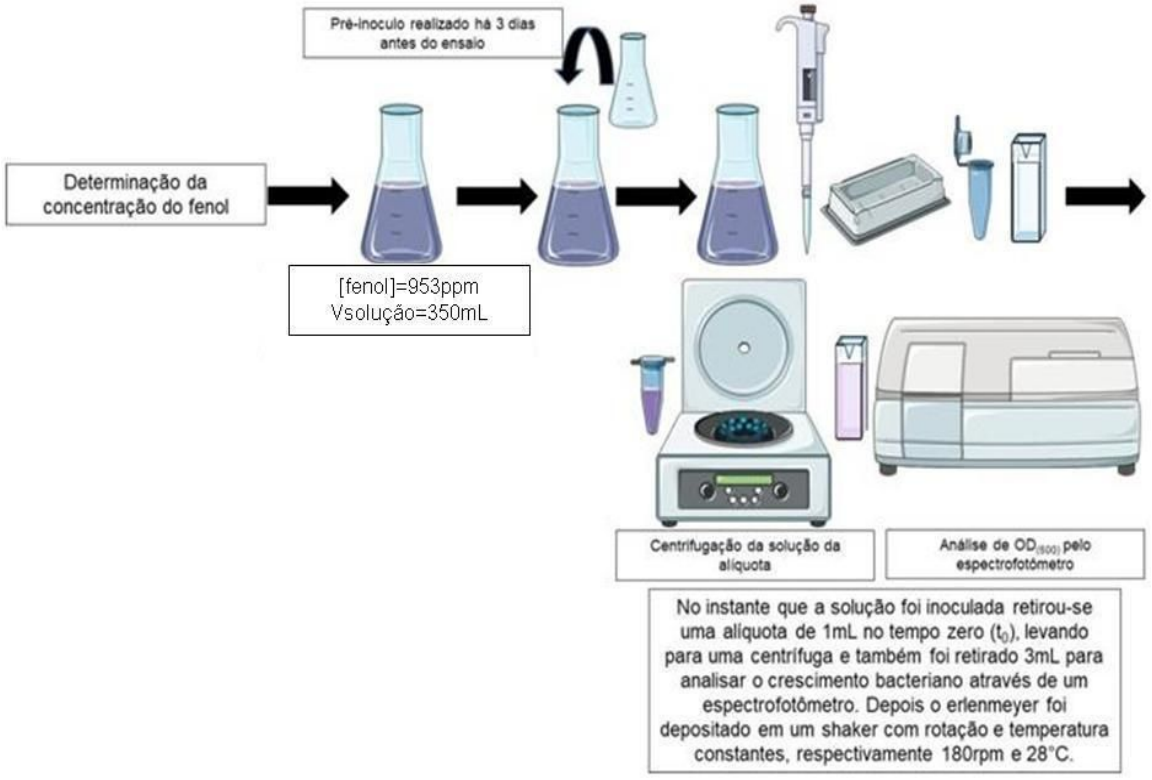
4.2.3.2. Ensaio de degradação das soluções aquosas contendo os compostos fenólicos

A degradação bacteriana do fenol, meta-cresol e orto-cresol foi baseada nas concentrações encontradas no ensaio de extração destes poluentes.

Além das soluções de todos os poluentes foi realizada a degradação do fenol, meta-cresol e orto-cresol presentes diretamente na areia de fundição, o procedimento foram os mesmos (Figuras 11 e 12).

Os parâmetros fundamentais foram decididos antes de o ensaio ser realizado, e esses parâmetros foram: temperatura constante de 28°C e agitação constante de 180rpm.

A Figura 11 apresenta o esquema usado para a degradação do fenol e a Figura 12 ilustra o esquema para a degradação do meta-cresol e do orto-cresol.



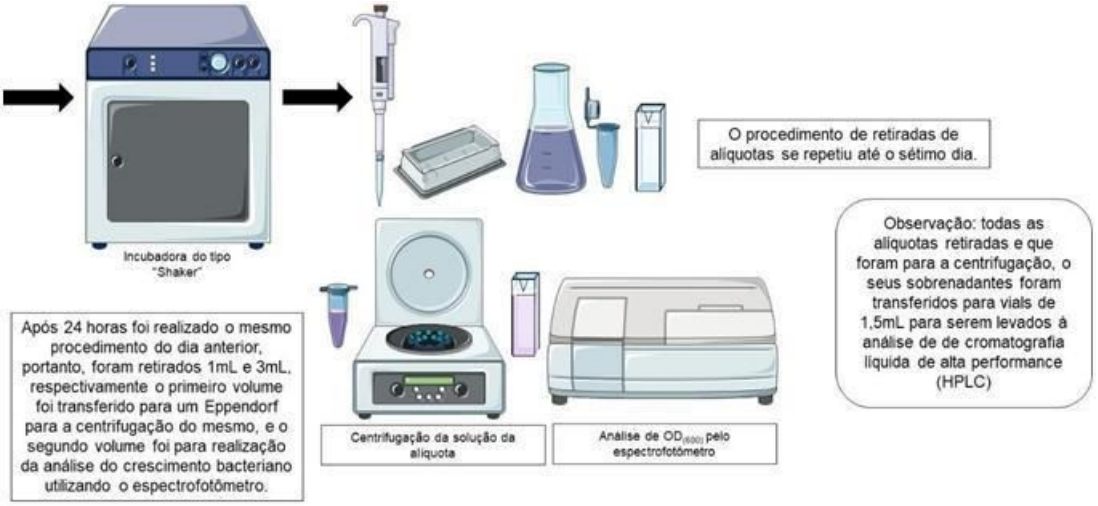
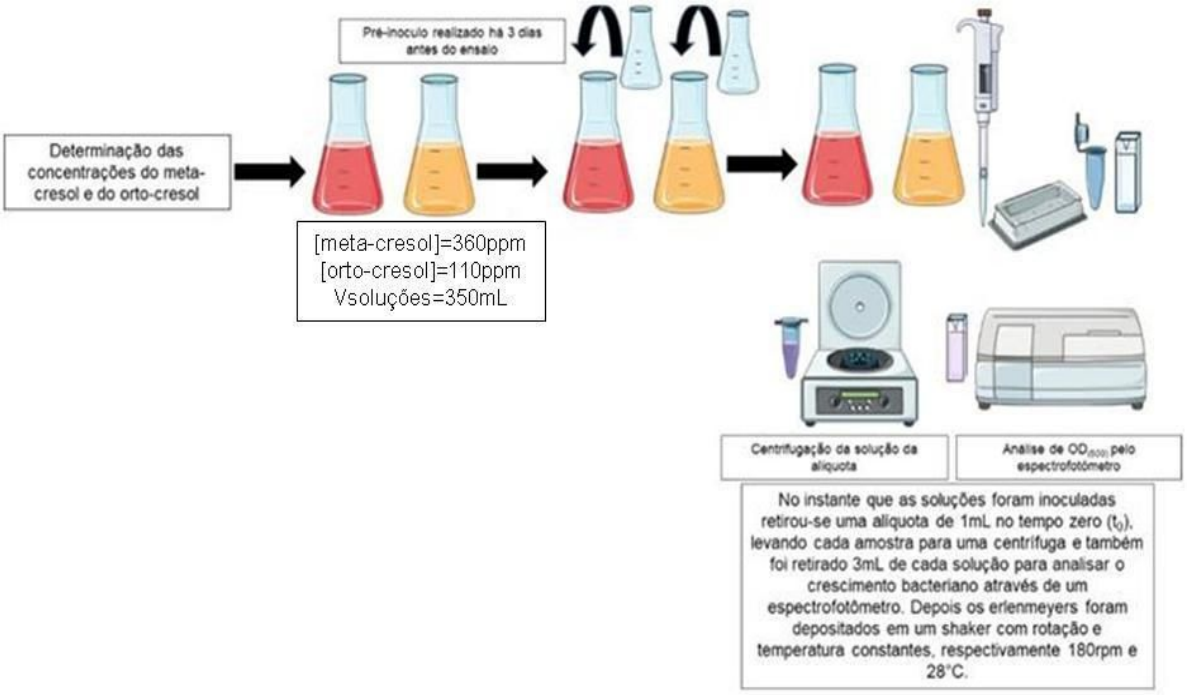


Figura 11: Etapas realizadas no tratamento de degradação do fenol



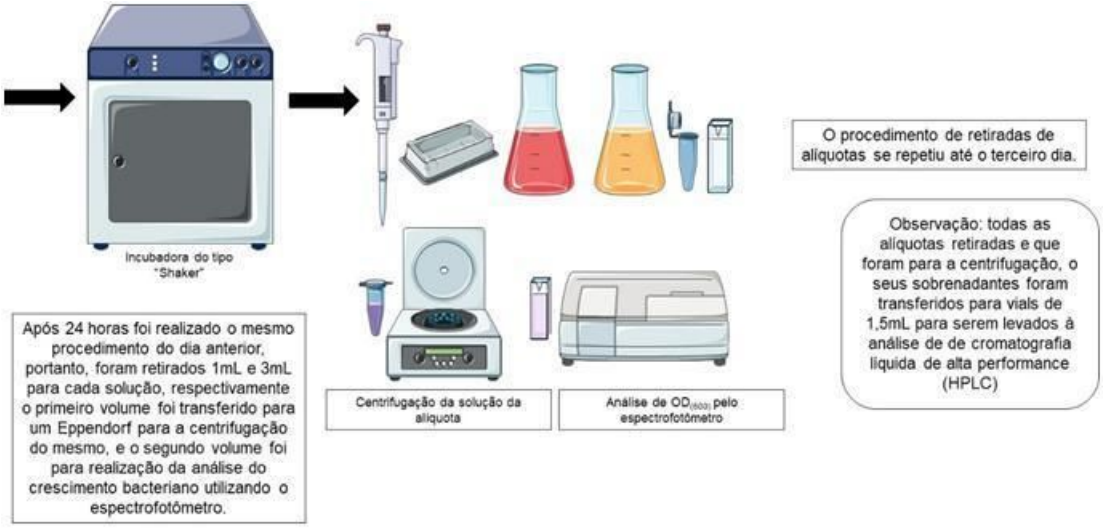


Figura 12: Etapas realizadas no tratamento de degradação do meta-cresol e orto-cresol

A totalidade de amostras recolhidas não excedeu 10% do volume total das soluções. Para cada tratamento de degradação bacteriano foi preparado um controle em branco, ou seja, sem a presença de bactéria. As degradações foram realizadas em duplicatas para cada um dos contaminantes

Simultaneamente, foi realizada a análise da densidade óptica para acompanhamento do crescimento da biomassa.

Igual o ensaio de degradação direta na areia foi realizado também as soluções aquosas em determinadas situações de agitação e temperatura para avaliar o rendimento biodegradação (Tabela 5).

Tabela 4-Ensaios para verificar o efeito da agitação e da temperatura no desempenho da biodegradação

Ensaio	Agitação (rpm)	Temperatura (ºC)
A-1	180	28
A-2	200	40

4.3.3.3. Análise da densidade óptica (OD_{600})

O crescimento da biomassa foi analisado através da densidade óptica do meio de cultura. Foram retiradas alíquotas de 3mL em intervalos de tempo definidos, para medir a absorbância do cultivo bacteriano no comprimento de onda de 600nm

(OD_{600}).

As alíquotas foram transferidas para uma cubeta de quartzo de 3mL com caminho óptico de 10mm e analisadas em um espectrofotômetro UV-VIS (Spectroquant, Pharo 300). O meio de cultura utilizado para a preparação da solução contendo a bactéria foi utilizado como branco, cuja finalidade foi de zerar o espectrofotômetro antes do início das análises. As absorbâncias foram medidas em duplicatas.

Com as absorbâncias obtidas foram construídas curvas de crescimento celular em função do tempo, com o propósito de determinar as fases de adaptação (lag), crescimento exponencial (log) e estacionária.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da areia de fundição com resina fenólica

Na Tabela 5 se encontram as informações passadas pela empresa metalúrgica que disponibilizou a areia de fundição para o estudo.

Tabela 5-Características da areia de fundição

Caracterização da areia de fundição	
Composição química da areia	$FeO.Cr_2O_3$
T que a areia suporta (ºC)	2.000~3.000
Reagente de aglomeração	Resina Fenólica Novolaca
Proporção da resina fenólica em relação com a areia de cromita	1%

5.1.1. Análise do pH do substrato

O valor do pH encontrado para a amostra de areia de fundição foi de 3,5. Esse valor é inferior ao que o do crescimento da bactéria empregada nesse trabalho. O pH do meio deve estar entre 6,5 e 7,0. O meio mínimo apresentou pH de 7,1. Já a areia de fundição juntamente com o meio mínimo de cultura apresentou o pH de 6,5, sendo portanto dentro da faixa para o crescimento bacteriano (Tabela 6).

Tabela 6-Valores dos pHs da areia de fundição em meio aquoso e com o meio de cultura

Amostras	pH
Areia de fundição em solução aquosa	3,5
Meio Mínimo	7,1
Meio Mínimo com a areia de fundição	6,5

Levando em consideração o valor do pH da areia em solução aquosa, conclui-se que a resina sintética que envolve os grãos de areia é do tipo novolaca, cuja principal característica é a sua acidez com pH em 5,6; resultado que corrobora

com as informações sobre a resina fornecidas pela empresa.

5.1.1. Análise de granulometria da areia de cromita

Na Figura 13 pode ser observada a distribuição de tamanhos de partículas da areia.

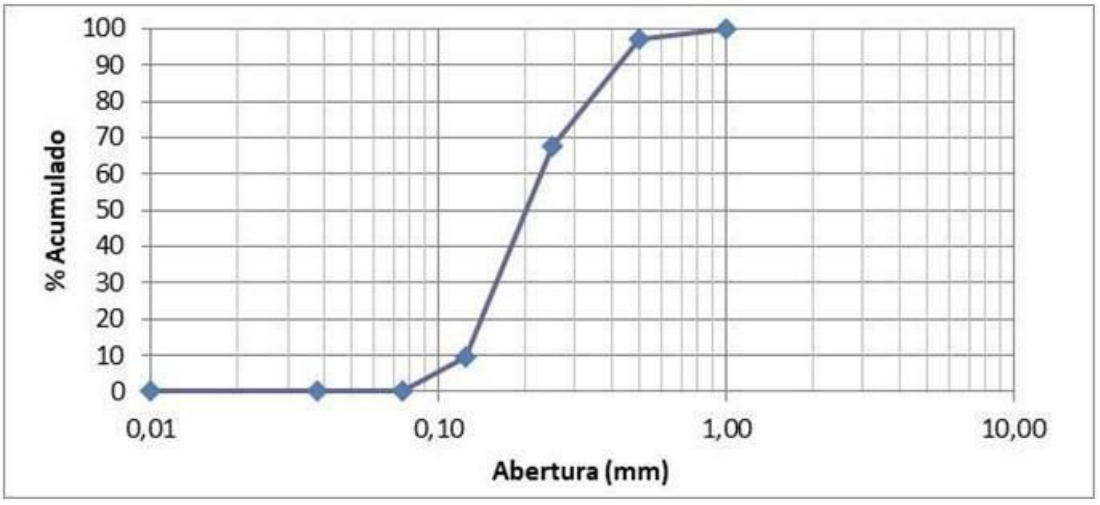


Figura 13: Distribuição granulométrica de areia de cromita.

É possível observar através da análise da Figura 13 que o tamanho médio das partículas ($A_{(50)}$) é de 0,30mm. Correlacionando a gramatura dos grãos com a degradação bacteriana, pode-se concluir que a super

5.1.2 Extração do fenol, meta-cresol e orto-cresol total na areia de fundição

No final do ensaio de extração dos poluentes, as amostras foram analisadas por HPLC para verificar se houve degradação dos compostos e a quantificação dos mesmos.

A Figura 14 representa o cromatograma resultante da extração do fenol, meta-cresol e orto-cresol presentes na areia de fundição.

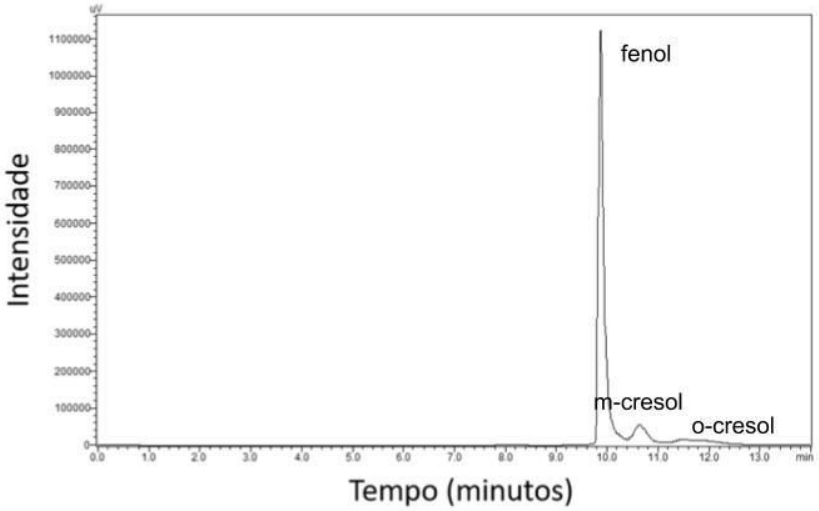


Figura 14: Cromatograma dos poluentes presentes na areia de fundição

Observa-se na Figura 14, que aparecem outros picos além dos picos do fenol, meta-cresol e do orto-cresol. As Figuras 15, 16 e 17 representam a evolução da extração dos compostos, respectivamente, fenol, meta-cresol e orto-cresol, e seus dados estão correlacionados com os valores obtidos pela cromatografia e foram convertidos em concentração (ppm) em função do tempo de extração.

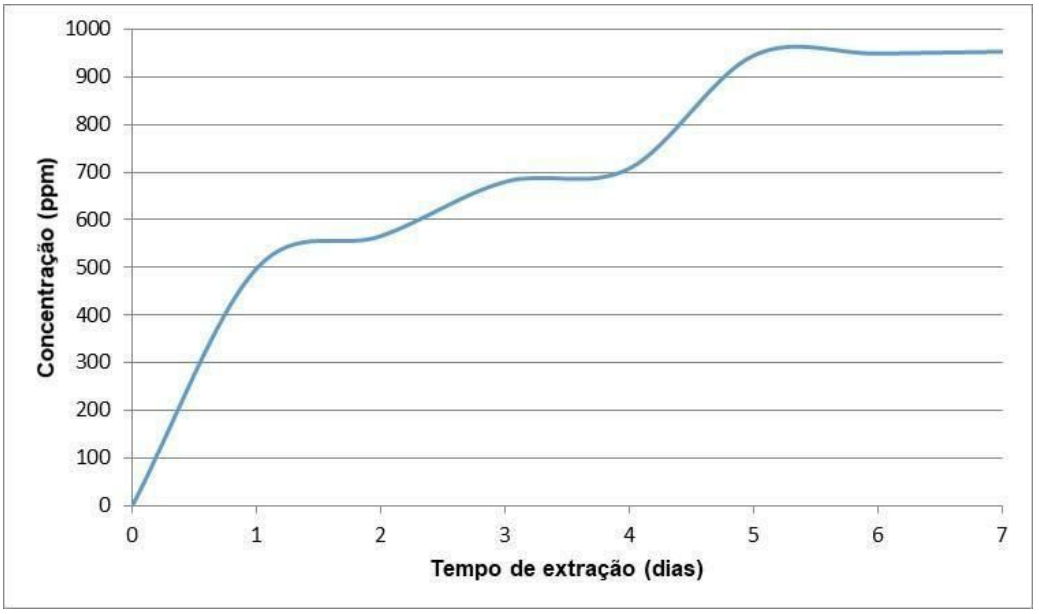


Figura 15: Cinética do fenol

A Figura 15 representa a extração do fenol ao longo de 7 dias, portanto, observa-se que a concentração deste poluente quando a extração total foi de 953ppm, pois a formação de um platô significa concentração constante.

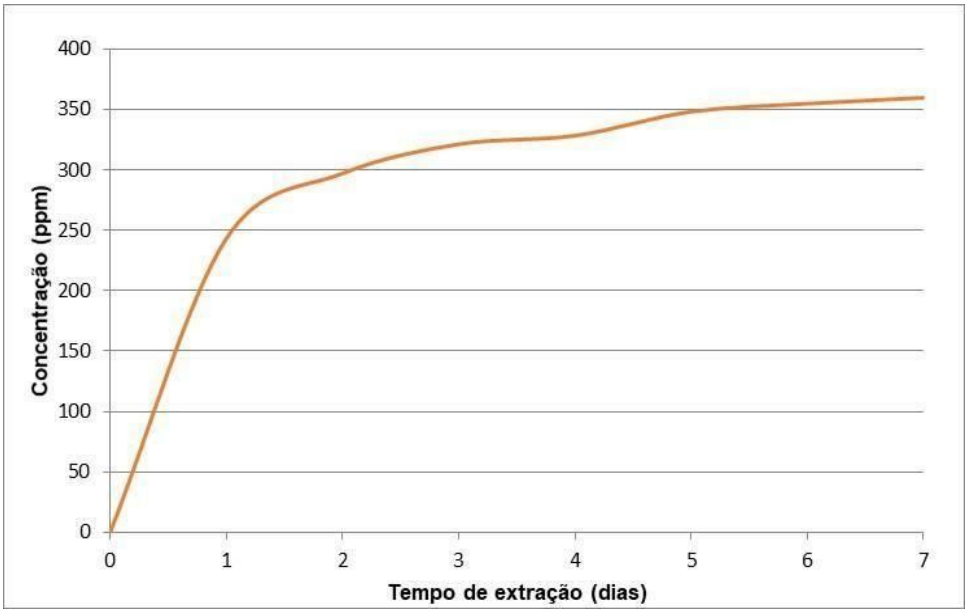


Figura 16: Cinética do meta-cresol

A Figura 16 apresenta a extração do meta-cresol no decorrer dos 7 dias de ensaios, e nota-se uma concentração de 360ppm referente à extração total do poluente presente na areia de fundição.

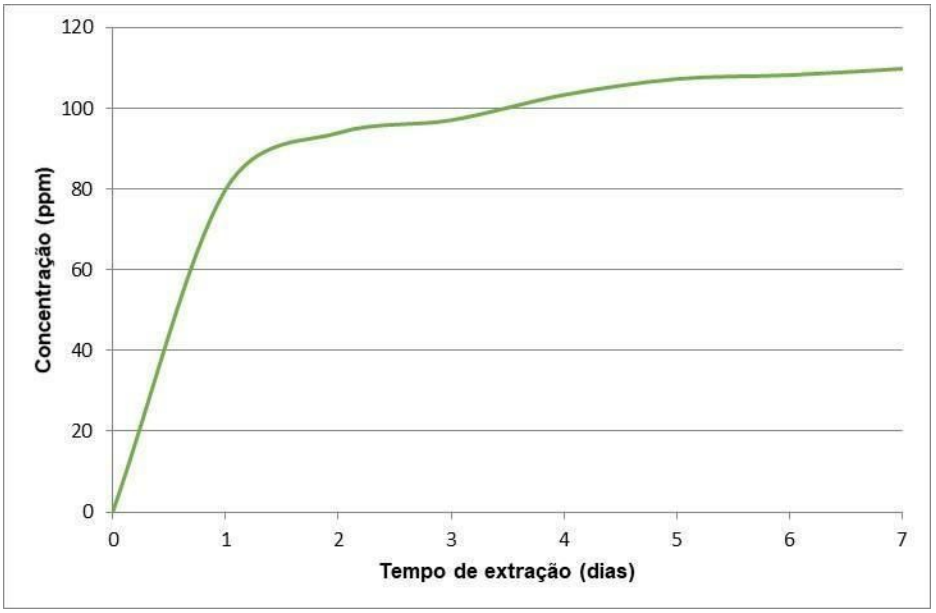


Figura 17: Cinética do orto-cresol

Na Figura 17 nota-se a concentração do orto-cresol presente na areia de fundição de 110ppm no decorrer dos 7 dias de extração.

As concentrações encontradas após 7 dias do processo de extração foram consideradas totais para cada contaminante estudado, porque nota-se um pequeno platô no último dia de extração.

Na Tabela 7 estão descritas as concentrações em ppm encontradas na massa de areia e a relação entre a massa do composto encontrado pela massa total de areia estudada.

Tabela 7-Concentração dos compostos em ppm e a porcentagem de cada poluente em relação com a areia de fundição

Poluentes	Concentração($mg.L^{-1}$)
Fenol	953
Meta-cresol	360
Orto-cresol	110

5.2. Degradação biológica dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição

Após a caracterização do resíduo iniciou-se os ensaios biológicos com o intuito de degradar ou amenizar a toxicidade do fenol, meta-cresol e do orto-cresol.

Paralelamente a esta etapa, foi realizada a identificação da bactéria isolada.

5.2.1. Visualização da morfologia da bactéria trabalhada

As Figura 18 apresentam micrografias obtidas em um microscópio óptico.

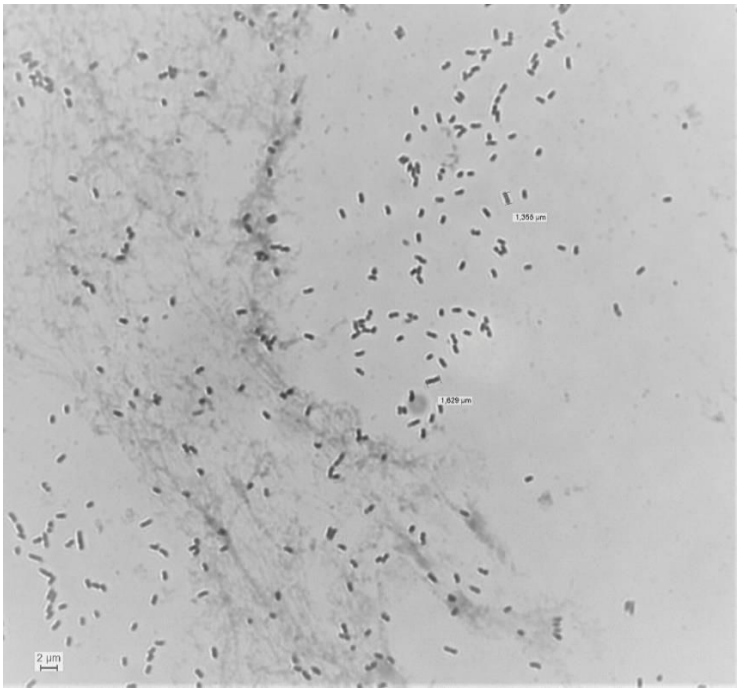
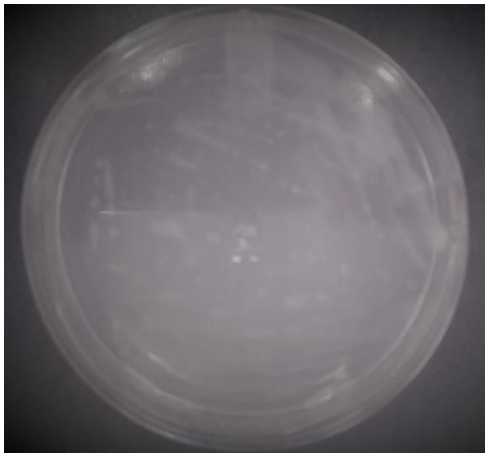


Figura 18: Imagem do tamanho da bactéria

Nota-se que a bactéria tem formato de bacilo simples e que o seu tamanho é aproximadamente de 2µm de comprimento.[75,70]

5.2.3. Identificação da bactéria através da técnica de MALDI-Biotyper

A identificação da bactéria se iniciou com a sua ativação. Foram preparadas duas placas de Petri com meios de cultura distintos (Mínimo e LB, Figuras 19 e 20, respectivamente), para comparar o crescimento da bactéria nos diferentes meios. Em meio favorável e rico de nutrientes, com o LB, as bactérias reproduzem mais facilmente e consequentemente produzem muito mais proteínas, favorecendo a identificação via MALDI-Biotyper[71,62,76,77,78].



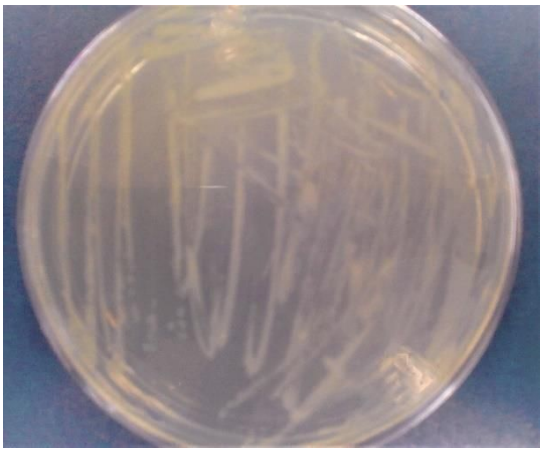


Figura 19: Cultivo em meio de cultura mínimo com a cepa isolada

Figura 20: Cultivo em meio de cultura LB com a cepa isolada

Nota-se que na Figura 20 a placa com meio LB está mais preenchida de colônias do que a placa com o meio mínimo de nutrientes, e como relatada anteriormente, no meio rico a bactéria não sofre tanto estresse, e, portanto, se desenvolve melhor. Entretanto, tal resultado não significa que a bactéria em meio mínimo não degrade com eficiência o fenol.

A Figura 21 apresenta o espectro de proteínas ribossomais da bactéria estudada obtido através da técnica de espectrometria de massas MALDI-Biotyper.

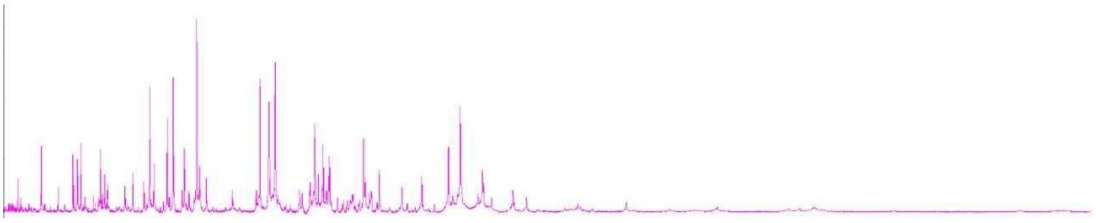


Figura 21: Espectro de proteínas da bactéria estudada obtido através do MALDI-Biotyper

O espectro de proteínas ribossomais, que permite identificar as espécies de microrganismos.

O MALDI-Biotyper usado no presente trabalho busca comparar espectros de proteínas já existentes no banco de dados com as proteínas dos microrganismos[76,77,78]. Os resultados são fornecidos através de pontuações, sendo que valores entre 3 e 2,30 significa identificação confiável da espécie. Para valores entre 2,299 e 2 significa identificação confiável de gênero e provável identificação de

espécie. Pontuação entre 1,700 e 1,999 indica provável identificação de gênero e pontuação inferior a 1,700 indica que não há identificação confiável. As pontuações obtidas bem como a identificação para as bactérias estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8-Resultados da identificação da bactéria pela técnica MALDI-Biotyper

Identificação	Organismo	Pontuação
Placa meio mínimo	Burkholderia diffusa	2,007
Placa LB	Burkholderia diffusa	2,264

Observa-se que ambas placas obtiveram pontuações maiores que 2, sendo que a placa com meio mínimo foi de 2,007 e para o LB 2,264, com esses valores pode-se concluir que a bactéria pertence ao gênero *Burkholderia*.

Porém, não há certeza que a bactéria pertença à espécie *diffusa.* A *Burkholderia diffusa*, faz parte de um grupo de espécies que têm como maioria característica patogênica, como por exemplo, a bactéria *Burkholderia cepacia*, porém a espécie *Burkholderia diffusa* não possui essa mesma característica[56,63,62,57,58].

Este microrganismo apresenta um formato de bacilos retos, sua célula é gram-negativa e seu metabolismo é aeróbico. A *Burkholderia* sp. cresce em temperaturas de 15 a 40°C e geralmente é encontrada no solo e ela apresenta uma capacidade degradativa de compostos orgânicos.[63,58]

5.2.3. Tratamento de degradação biológica do fenol, meta-cresol e orto-cresol

5.2.3.1. Ensaio de degradação direto na areia de fundição

O primeiro ensaio a ser realizado de degradação foi com contato direto da bactéria com o substrato estudado, a areia de fundição, resíduo sólido oriundo de uma indústria metalúrgica.

O experimento foi avaliar o desempenho da bactéria da espécie *Burkholderia* em meios que não há substâncias fenólicas livres.

Foi observado também o desenvolvimento da bactéria em diferentes condições de cultivo, agitação e temperatura.

A Figura 22 apresenta a degradação dos compostos fenólicos presentes na areia em temperatura e agitação constantes, respectivamente 28 ºC e 180 rpm. A concentração inicial do fenol, meta-cresol e orto-cresol foi respectivamente de 953 ppm, 360 ppm e 110 ppm. Ao longo do tempo observou-se que a concentração das três substâncias foi diminuindo, chegando em 97% (27,60 ppm, concentração residual) de degradação para o fenol e 100% para o meta-cresol e para o orto-cresol.

Nota-se que o rendimento de degradação do fenol não foi de 100% como os cresóis, isso ocorreu pois o meta-cresol e o orto-cresol estão presentes de forma mais simples no meio para que as bactérias possam degradar. Segundo Gardziella, Pilato, Knop (2000)[6], os cresóis são derivações do próprio fenol, ou seja, eles são a decomposição da resina fenólica, sendo que o fenol se encontra ainda complexado aos grãos de areia, levando à dificuldade das bactérias encontrarem o fenol[6].

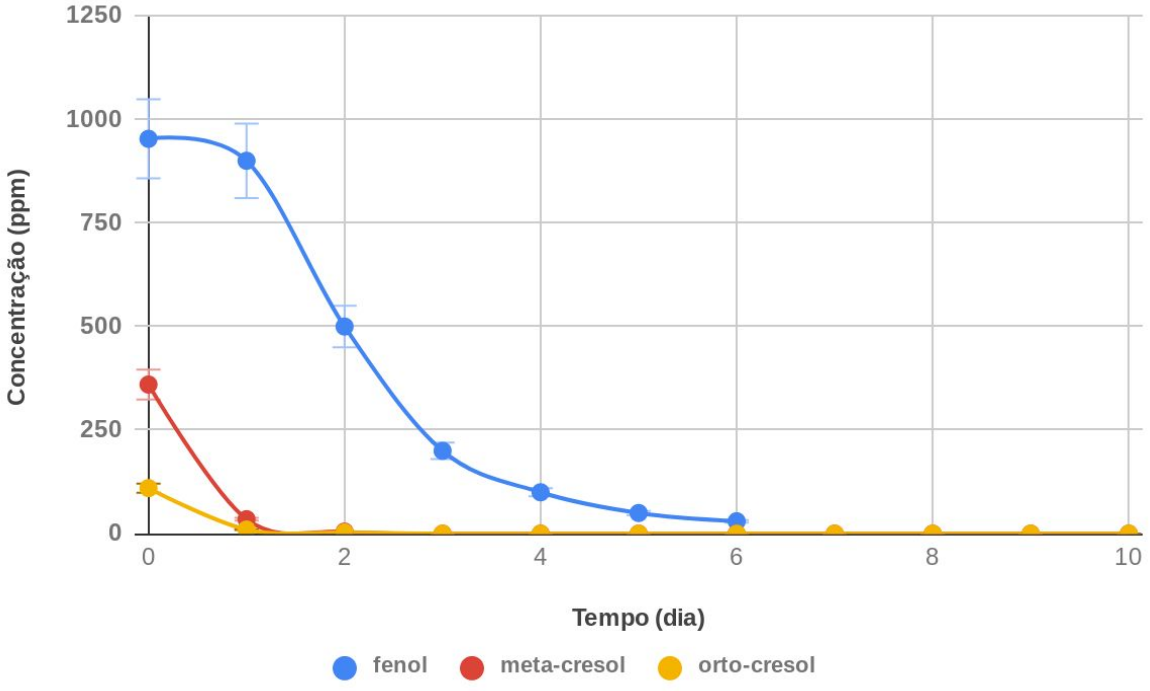
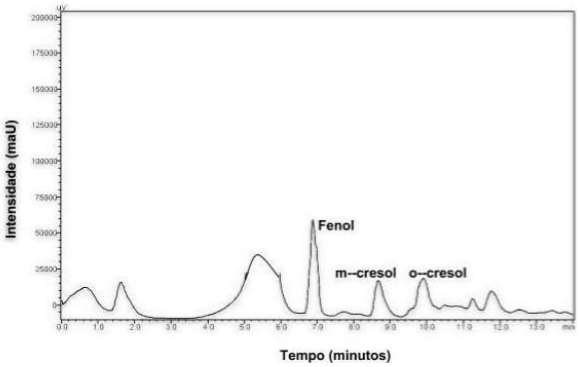


Figura 22: Degradação dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição

A Figura 23-A apresenta o cromatograma do início da degradação enquanto que a Figura 23-B apresenta o final da degradação, essas duas figuras elas mostram com clareza que a degradação de fato ocorreu, pois elas foram reproduzidas através do programa do próprio equipamento de cromatografia (HPLC).



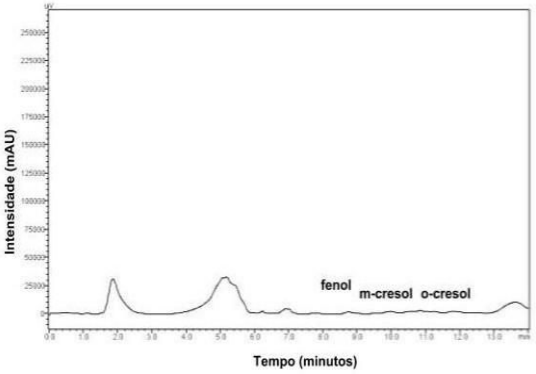


Figura 23-A: Cromatograma inicial da degradação **Figura 23-B: Cromatograma final da degradação**

Além dos cromatogramas servindo como base para comprovação da degradação foi realizado também o controle negativo, sendo que só foi colocado a areia de fundição com o meio de cultura mínimo de nutrientes, neste caso foi observado se ocorreu alguma degradação natural, porém nota-se que a concentração dos compostos só foi aumento ao decorrer dos dias, chegando ao um patamar de 953 ppm para o fenol, 360 ppm para o meta-cresol e 110 ppm para o orto-cresol (Figura 24).

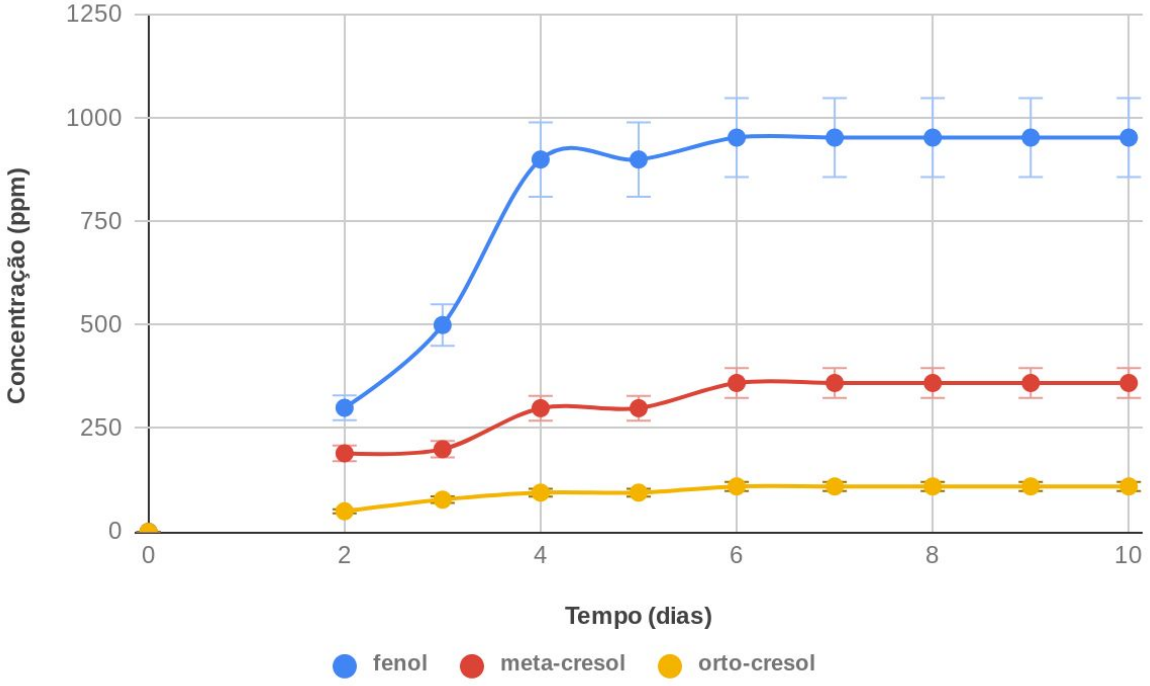


Figura 24: Controle negativo da solução de areia de fundição com o meio de cultura

Foi observado também os cromatogramas de início e final do controle, e realmente observa-se que a concentração aumentou ao decorrer dos 10 dias de ensaio (Figura 25-A e Figura 25-B).

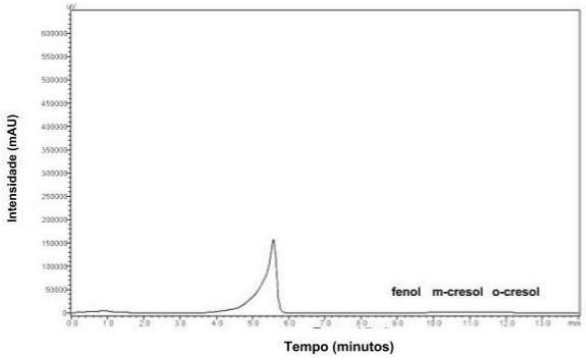


Figura 25-A: Cromatograma inicial do controle

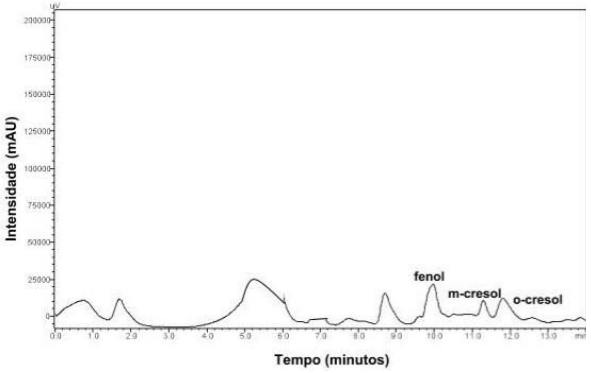


Figura 25-B: Cromatograma final do controle

Nesse ensaio não foi possível realizar a densidade óptica (OD_{600}), pois o meio contendo a areia de fundição ficou com aspecto turvo.

Foram testados parâmetros de temperatura e agitação, e como nota-se na Figura 26, a temperatura e velocidade com melhor adaptação foram respectivamente a de 28 ºC e 180 rpm. Porém quando passado esses parâmetros, como no caso de 40 ºC e 200 rpm a bactéria ela não tem capacidade de se desenvolver, isso ocorre porque a bactéria *Burkholderia* sp. só consegue se reproduzir na faixa de temperatura de 20 a 30 ºC[44,81,82].

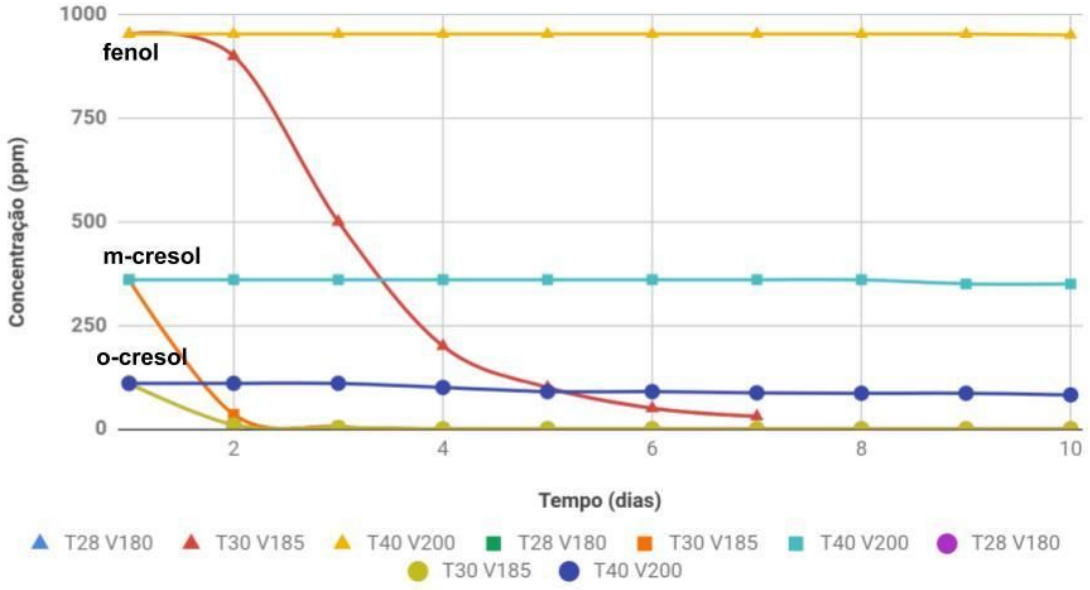


Figura 26: Variação dos parâmetros em relação da variação da concentração dos compostos fenólicos presentes na areia

Observando a Figura 26, nota-se que a concentração dos três compostos na condição crítica (temperatura à 40 ºC e em velocidade de 200 rpm) não apresentou quase nenhuma variação sobre suas concentrações.

5.2.3.2. Ensaio de degradação das soluções aquosas contendo os compostos fenólicos

Os estudos de degradação bacteriana visaram avaliar a influência da temperatura e agitação sobre a degradação dos compostos fenólicos. As soluções sintéticas empregadas foram preparadas com concentração de 953 $mg.L^{-1}$ de fenol, 360 $mg.L^{-1}$ de meta-cresol e 110 $mg.L^{-1}$ de orto-cresol, concentrações as quais foram obtidas através da extração dos compostos fenólicos presentes na areia de fundição.

Segundo Gracios[44,81,82], bactérias degradadoras de compostos fenólicos conseguem sobreviver em temperaturas de 20 °C a 30 °C, e, portanto, foram definidas temperatura de 28 °C e em agitação de 180 rpm para o presente estudo.

Para avaliar a degradação dos contaminantes foram realizadas análises cromatográficas das alíquotas coletadas ao longo de 7 dias para todos os contaminantes.

Fenol

A Figura 27 representa a curva de degradação bacteriana do fenol.

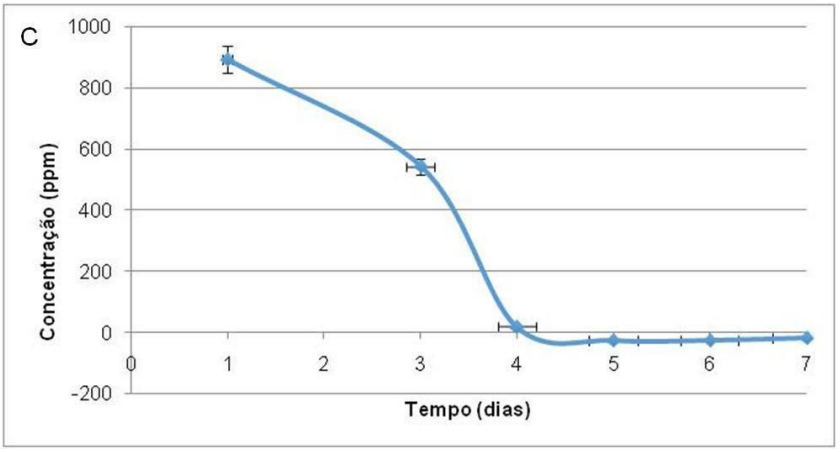


Figura 27: Degradação do fenol

Observando a Figura 28 A, nota-se que a intensidade do fenol chega à 450 mAU, já na Figura 28 B a intensidade do fenol no final do experimento diminuiu a

zero. Na Figura 27 apresenta a degradação em relação da concentração em $mg.L^{-1}$ com o decorrer do tempo do ensaio, é de se observar que a concentração inicial representada pela intensidade de 450 mAU foi de 953 $mg.L^{-1}$. No transcurso temporal foi constatado que a concentração foi diminuindo, assim zerou a quantidade de fenol na solução.

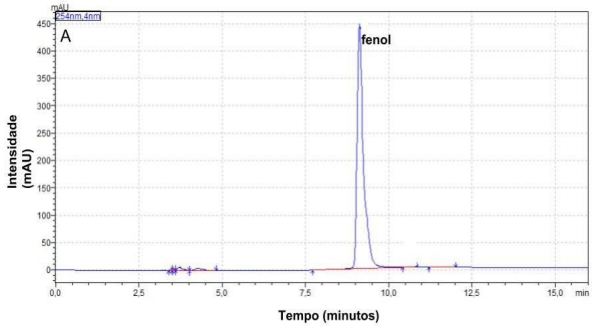


Figura 28-A: Cromatograma inicial da degradação de fenol

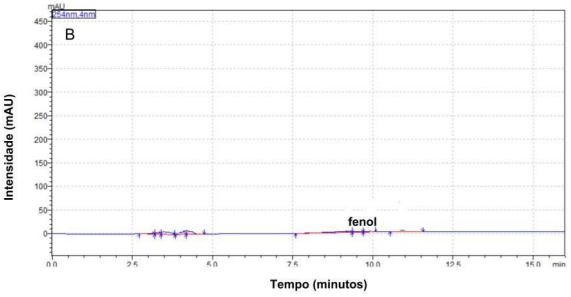
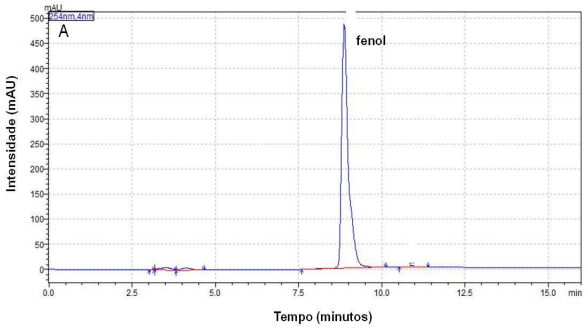


Figura 28-B: Cromatograma final da degradação de fenol

As Figuras 29 A e B são os cromatogramas da solução de fenol que não possuía bactéria, denominado como controle negativo. O controle negativo funciona como base de comparação, isso significa que a concentração de fenol deve permanecer constante.



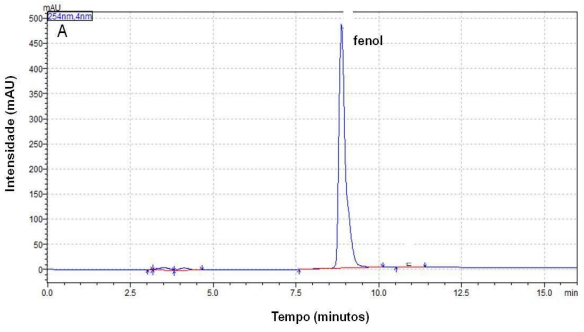


Figura 29: A-Cromatograma inicial do controle negativo com o fenol; B-Cromatograma final do controle negativo com o fenol

Observando as Figuras 30 A e 30 B, nota-se que a concentração do fenol permaneceu a mesma desde o início até o final do ensaio, possivelmente houve alguma volatilização no percurso, pois o sistema utilizado não foi fechado, mas isso

não afetou o controle.

Meta-cresol

As Figuras 30 A, B e C apresentam a degradação do meta-cresol.

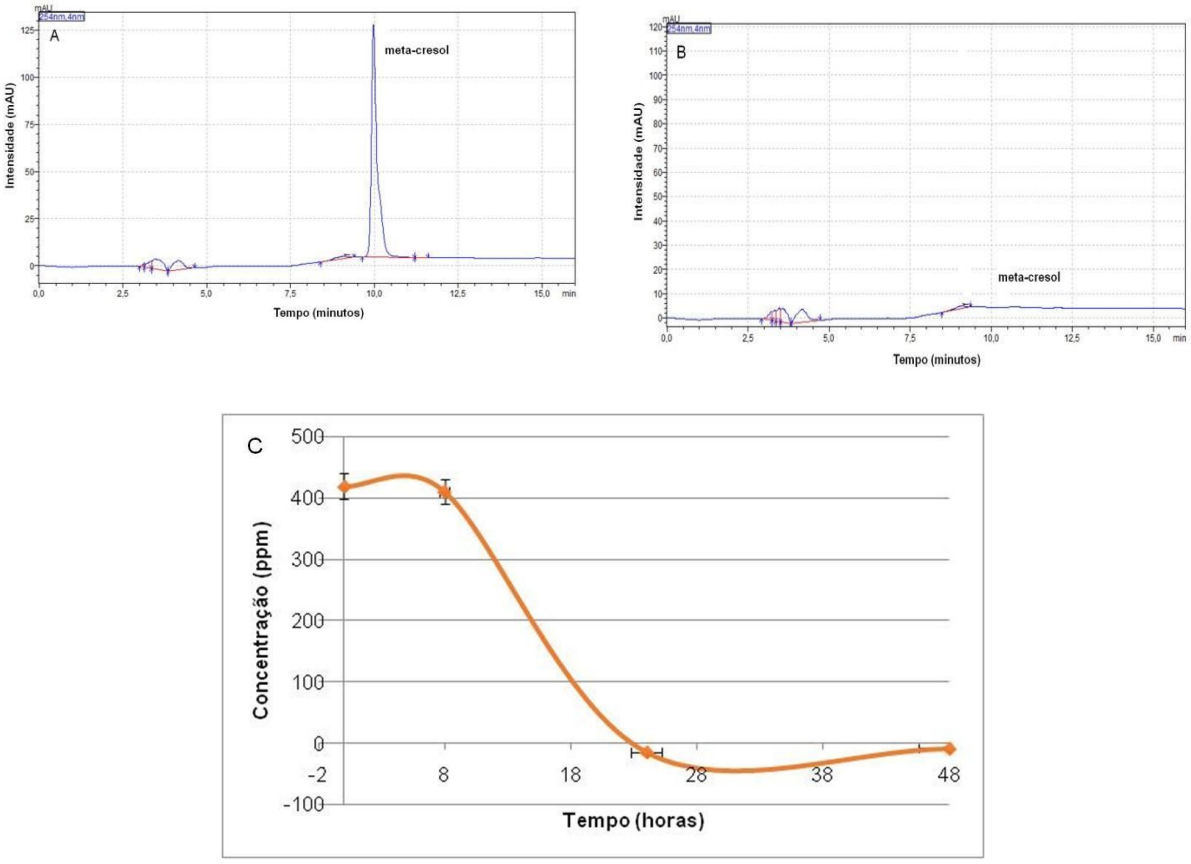


Figura 30: A-Cromatograma inicial da degradação do meta-cresol; B-Cromatograma final da degradação do meta-cresol; C- Degradação do meta-cresol

A Figura 30 A representa início da degradação da solução contendo meta-cresol, tendo a intensidade igual a 125 mAU com tempo de retenção de 10 minutos e a Figura 30 B representa o fim da degradação tendo a intensidade igual a zero. Na Figura 30 C fica mais claro que houve a concentração do meta-cresol ao percorrer do ensaio, sendo que a concentração inicial foi de 360 $mg.L^{-1}$ e a final igual a zero.

As Figuras 31 A e B, representam os cromatogramas do controle negativo e ao observar essas duas figuras, nota-se que a concentração (intensidade) do meta-

cresol permaneceu constante, significando que a degradação da substância foi devido a capacidade bacteriana.

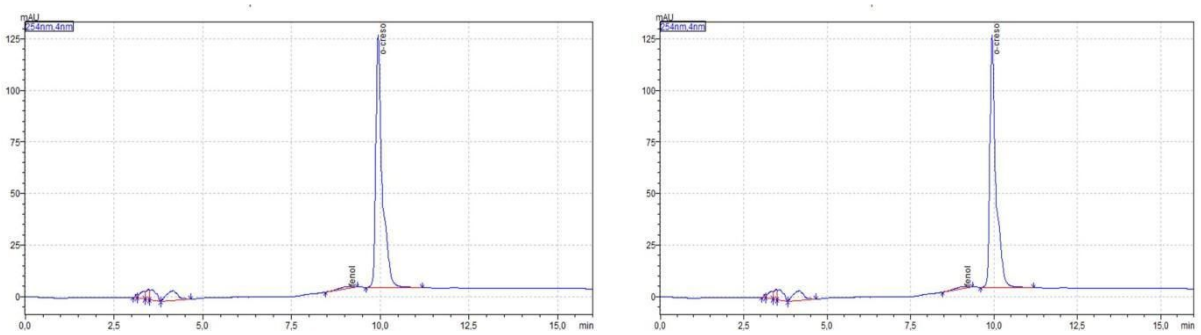


Figura 31: A-Cromatograma inicial do controle negativo com meta-cresol; B-Cromatograma final di controle negativo com meta-cresol

Orto-cresol

Nas Figuras 32 A, B e C, representam a biodegradação do orto-cresol.

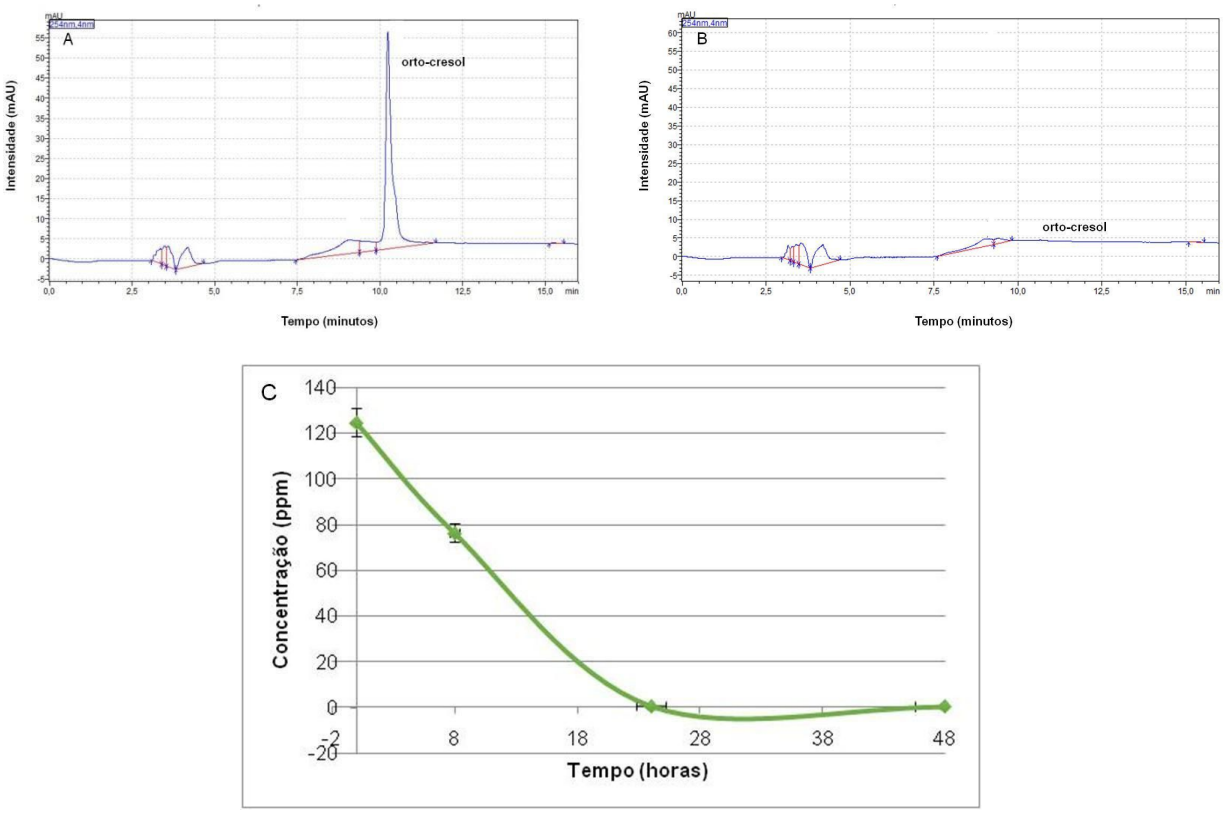


Figura 32: A-Cromatograma inicial da degradação do orto-cresol; B-Cromatograma final da degradação do orto-cresol; C-Degradação do orto-cresol

As Figuras 32 A e B representam os cromatogramas inicial e final, apresentam uma diferença de intensidade, sendo que a intensidade do início da degradação foi de 55 mAU e a final foi igual a zero. Na Figura 32 C, é possível notar as concentrações ao decorrer do tempo, tendo como concentração inicial igual a 110 $mg.L^{-1}$ e a final igual a zero.

Nas Figuras 33 A e B nota-se que não houve degradação dos controles negativos das soluções de orto-cresol, pois não apresentam diferenças de intensidade ao decorrer do ensaio.

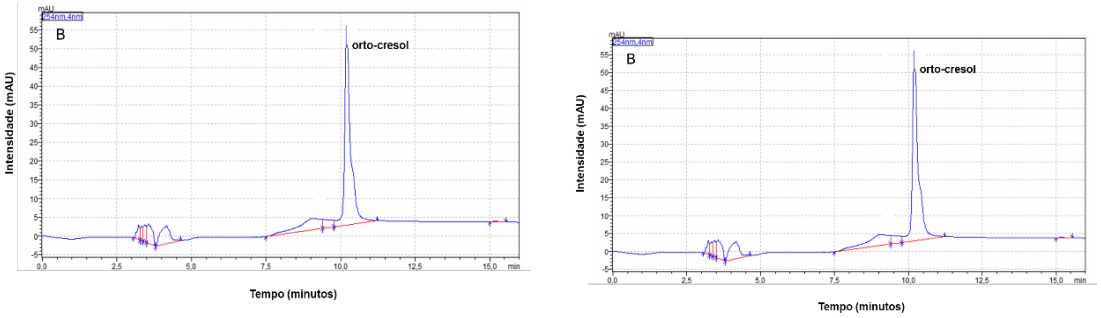


Figura 33: A-Cromatograma inicial do controle negativo com orto-cresol; B-Cromatograma final do controle negativo com orto-cresol

Nas Figuras 34, 35 e 36, representam o crescimento bacteriano no decorrer do ensaio de degradação dos poluentes, analisando cada figura nota-se diferentes comportamentos da mesma bactéria em cada solução.

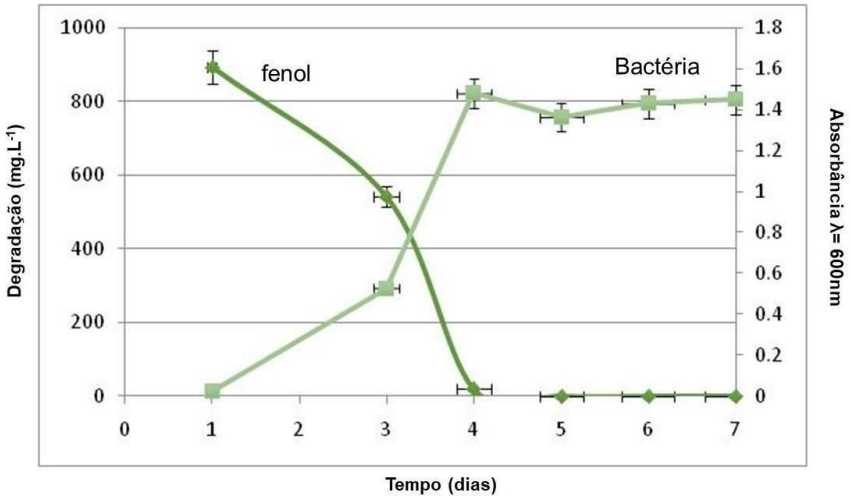


Figura 34: Consumo do fenol pela bactéria x Crescimento bacteriano no percorrer da degradação

Observando a Figura 34, nota-se que a fase de adaptação da bactéria *Burkholderia* sp. foi de um dia para uma concentração de fenol de 953 $mg.L^{-1}$, isso acontece devido a concentração do fenol, pois o inóculo onde as bactérias foram cultivadas teve a concentração de fenol de 400 $mg.L^{-1}$. Por isso a demora de 1 dia para a bactéria começar a degradar o fenol.

No eixo y do lado direito representa a absorbância de onda de 600 nm, observando esse eixo, nota-se que a bactéria chegou na fase estacionária em absorbância de 1,4 e o fenol foi degradado totalmente.

A fase estacionária é quando a bactéria não encontra mais fonte de carbono, no caso foi o fenol, e algumas células acabam morrendo até chegar na fase de morte.

A Figura 35 representa o crescimento bacteriano na solução de meta-cresol.

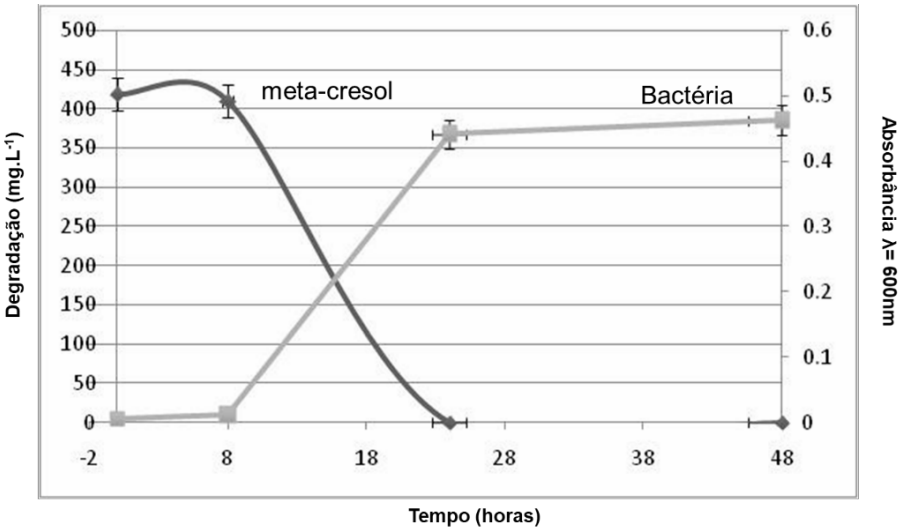


Figura 35: Consumo do meta-cresol pela bactéria x Crescimento bacteriano no percorrer da degradação

Nota-se que a fase de adaptação da mesma bactéria utilizada para o fenol foi de 8 horas, a diferença do tempo de adaptação foi devido a concentração do meta-cresol de 360 $mg.L^{-1}$.

A fase exponencial aconteceu logo em seguida, alcançando uma absorção de 0,5, chegando em sua fase estacionária.

A absorbância da bactéria na solução de meta-cresol foi inferior quando comparado com o fenol e superior quando comparado com o orto-cresol, isso acontece em virtude da concentração.

A Figura 36 representa o crescimento da bactéria *Burkholderia* sp. em solução de orto-cresol.

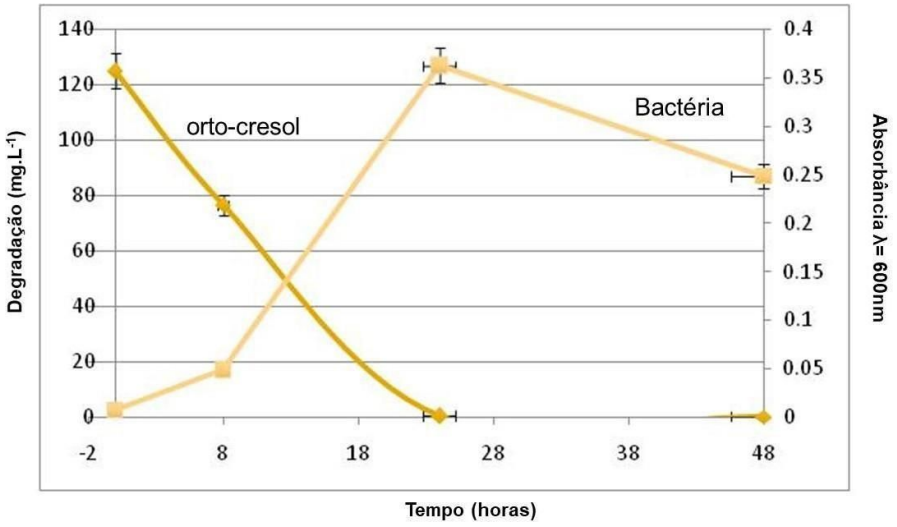


Figura 36: Consumo do orto-cresol pela bactéria x Crescimento bacteriano no percorrer da Degradação

Observando a Figura 36, nota-se que em menos de 8 horas a bactéria se adaptou e iniciou a fase estacionária, atingindo uma absorbância de 0,35, e logo começou a sua fase de morte em 24 horas. Isso ocorreu por causa da concentração de 110 $mg.L^{-1}$ de orto-cresol que foi muito inferior quando comparado com o 953 $mg.L^{-1}$ do fenol e 360 $mg.L^{-1}$ do meta-cresol.

No caso do orto-cresol o crescimento bacteriano chegou em sua fase de morte com absorbância igual a 0,25, haja vista que não tinha mais fonte de carbono para que a bactéria se desenvolvesse.

O resíduo de areia de fundição descartada pela metalúrgica foi também tratada, porém não foi viável realizar o teste de oxigênio dissolvido, porque a solução apresentou uma certa turbidez. Mas através dos cromatogramas e com o diagrama de degradação dos compostos fenólicos foi possível identificar a degradação bacteriana.

Teste envolvendo situações de temperatura e velocidade diferentes foi realizado também para cada solução aquosa, e os resultados obtidos foram os mesmo que ocorreu para o ensaio da areia de fundição, sendo que à temperatura de 28 ºC e agitação de 180 rpm, a degradação ocorreu, consumindo 100% dos três compostos. Já o ensaio em temperatura de 40 ºC e em velocidade de 200 rpm não ocorreu degradação.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados pode-se concluir que:

1. A mistura da areia com o meio de cultura apresentou um pH adequado para o crescimento bacteriano, apresentando valor de pH igual 6,5.
2. A concentração de fenol, de meta-cresol e orto-cresol foram respectivamente de 953 $mg.L^{-1}$, 360 $mg.L^{-1}$ e 110 $mg.L^{-1}$.
3. A melhor condição para o crescimento bacteriano foi de utilizar meio de cultura mínimo de nutrientes em pH 6,5.
4. Em condições física, como temperatura e velocidade de rotação acima de 40ºC e 200 rpm a bactéria não consegue se reproduzir.
5. A eficácia da degradação em meio aquoso utilizando somente os poluentes separados foi de 100% para todos os compostos.
6. A eficácia da degradação em meio contendo o rejeito de areia de fundição foi de 97% para o fenol e 100% para o meta-cresol e para o orto-cresol.
7. A bactéria *Burkholderia* sp. degradou os compostos fenólicos em todos os meios aplicados, sendo em meio aquoso com os compostos livres ou sendo em meio contendo o substrato estudado

O presente trabalho cria uma perspectiva futura de trabalhar em escala industrial e com a utilização de um espectrofotômetro de massa identificar outras substâncias presentes na composição da resina fenólica. Para a identificação da bactéria é interessante realizar um sequenciamento de DNA, como o método 16-S para melhor identificar a espécie da bactéria do gênero *Burkholderia* sp..

REFERÊNCIAS

1. Singh, G.; Siddique, R. Effect of waste foundry sand (WFS) as partial replacement of sand on the strength, ultrasonic pulse velocity and permeability of concrete. Constr Build Mater. Journal Conbuidmat, p. 1-7, Jun.2011.
2. ABNT. NBR 10.004 - Resíduos Sólidos - Classificação. v. 18. Rio de Janeiro; 2004.
3. BERNDT, H. A Tecnologia Do Processo Shell. Abifa. São Paulo, 1989. p. 100-160.
4. Penkaitis, G.; Sígolo, J.B. Waste foundry sand. Environmental implication and characterization. Geol USP - SerCient. p. 57-70, Dez.2012.
5. Rampazzo,D.;Jeronymo,J.R.Resinas Sintéticas para Fundição. Alba Química. São Paulo, 1989. p.41-61
6. Gardziella, A.; Pilato, L.A.; Knop, A. Phenolic Resins: Chemistry, Applications, Standardization, Safety and Ecology.v 2. Spriger. Berlin, 2000. p.13-289.
7. Guney,Y.;Aydilek,A.H.;Demirkan,M.M.Geo environmental behavior of foundry sand amended mixtures for highway sub bases. Waste Manag. Journal Wasman, p. 1-9, Jun.2006.
8. Yazoghli, M.O.; Vulcano, G.N.; Cantegrit, L.; Friteyre, L.; Julien A. Recycling foundry sand in road construction-field assessment. Constr Build Mater.Journal Conbuildmat. p. 69-78. Fev.2014.
9. Siddique R.; Schutter, G.; Noumowe, A. Effect of used-foundry sand on the mechanical properties of concrete. Constr Build Mater. Jounal Conbuildmat. p. 976-980. Mai.2009.
10. Partridge, B.; Alleman, J.; Fox, P.; Mast, D. Performance Evaluation of Highway Embankment Constructed with Waste Foundry Sand.TranspResRec.p.55-63. Jun.1998.
11. Woodard & Curran, Inc. Industrial waste treatment Handbook. Cap. 9. Solid waste treatment and disposal, v1. Butterworth-Heinemann. Estados Unidos. 2006.
12. Antonova, I.A.; Gryaznov, O.N.; Guman, O.M.; Makarov, A.B.; Kolosnitsina, O.V.Geological conditions for allocation of solid municipal and industrial waste

disposal sites in the Middle Urals. Water Resour. p. 896-903. Jun. 2014.

13. Branchini O.B. Cadeia de suprimento e avaliação do ciclo de vida do produto: revisão teórica e exemplo de aplicação. O Pap. p. 52-72. Jun.2009.

14. Mbuligwe, S.;Mengiseny K. Assessment of industrial solid waste management and resource recovery practices in Tanzania. Resour Conserv Recycl. Journal Resconcrec. p. 260-276. Nov.2006.

15. Matias, M.A. Procedimentos de gerenciamento de resíduos de empresas sob a ótica da instituacionalização dessas práticas. Reun – RevAdmContab e Sustentabilidade. p. 80-102. Mar.2013.

16. Sisinno, C.L. Disposição em aterros controlados de resíduos sólidos industriais não-inertes:avaliaçãodoscomponentestóxicoseimplicaçõesparaoambiente e para a saúde humana. Cad Saúde Pública. p. 369-374. Jun.2003.

17. ABNT. NBR 10.005 - Procedimento Para Obtenção de Extrato Lixiviado de Resíduos Sólidos. Rio de Janeiro;2004.

18. ABNT. NBR 10.006 - Procedimento Para Obtenção de Extrato Solubilizado de Resíduos Sólidos. Rio de Janeiro;2004.

19. Demirbas, A. Waste management, waste resource facilities and waste conversion processes. Energy ConversManag. p. 1280-1287. Set.2011.

20. Fadel, M.; Zeinati, M.; Jisr, K.; Jamali, D. Industrial-waste management in developing countries: the case of Lebanon. Journal Environmental Management. p. 2812-300. Mai.2001.

21. Willumsen, H.C.Energy Recovery from landfill gas in Denmark and worldwide. LFG Consult. p.1-9. Dinamarca. 2000.

22. ABNT. NBR 10.007. Amostragem de Resíduos Sólidos. Rio de Janeiro;2004.

23. Conama R. Gestão de Resíduos E Produtos Perigosos - Inventário Nacional de Resíduos Sólidos Industriais. 2002.

24. Krishnaraj R. Control of pollution emitted by foundries. EnvironChem Lett.p. 149-156. 2015.

25. Beeley,P.Foundry Technology. Butterworth-Heinnemann. 2ªed. p.300-500. Estados Unidos. 2001

26. Krishnaraj, R. Contemporary and futuristic views of pollution control devices in foundries. Ecotoxicol Environmental. P. 130-135. 2015.

27. Cunha, B.A. Estudo da contaminação por compostos fenólicos de uma área impactada por resíduo de areia de fundição. Dissertação (Mestrado Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 20005.

28. Lahl, U. Recycling of waste foundry sands. Sci Total Environ. p.185-193.1992

29. Salihoglu, G. Industrial hazardous waste management in Turkey: Current state of the field and primary challenges. J Hazard Mater. p :42-56. 2010

30. Sampat, P. Groundwater shock. World Watch.2000. p.10-22. Fev/2010

31. Casotti, B.P.; Filho, E.D.B.; Castro, P.C. Indústria de fundição: situação atual e perspectivas. Bndes. p.121-162. 2011

32. ABIFA. Guia ABIFA de fundição. São Paulo; 2015.

33. Pribulová, A.; Futáš, P.; Baricová, D. Processing and utilization of metallurgicals lag. p. 2-5. 2016:

34. Katz, S. Foundry Processes. Their Chemistry and Physics. Springer. p.1-192. Estados Unidos. 1988.

35. Brown, J. Foseco Foundryman's Handbook. Butterworth-Heinemann. 10ªed. p.1-400. Estados Unidos. 1994.

36. Soares, W.Â.A.; Ferraresi, G.N.; Quináglia, G.A.; Umbuzeiro, G.D.A. Toxicidade do resíduo areia de fundição utilizando o teste com a bactéria luminescente. Vibriofischeri. Ver BrasToxicol. p. 17-21.2010.

37. Bitencourt, C.S.; Pandolfelli, V.C. Resinas termofixas e a produção de refratários contendo carbono: base teórica e insights para futuros desenvolvimentos. Cerâmica. p.1-26. 2013.

38. Chanda, M.S.K.R. Industrial Polymers, Specialty Polymers and their applications. 1a Ed. Boca Raton. p.1-20. 2008.

39. Pagga, U. Testing biodegradability with standardized methods. Chemosphere. p. 2953-2972.1997.

40. Vidali, M. Bioremediation An Overview. Pure Appl.Chem p.1163–1172. 2001.

41. Baydar, N.G.; Ozkan, G.; Sagdiç. O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (Vitisvinifera L.) extracts. Elsevier. p.1-5. 2003.

42. Kumaran, P.; Paruchuri, Y.L. Kicnetics of phenol biotransformation. Waste Research. Elsevier. p.1-8. Jan/1997.

43. Hase, Gracioso L, Regina, Avanzi I, Baltazar , P.G.M. Proteome Analysis of

Phenol-Degrading Achromobacter Sp. Strain C-1, Isolated from an Industrial Area. Vol 9. 2012.

44. Maurice, C.F.; Haiser, H.J.; Turnbaugh PJ. Xenobiotics Shape the Physiology and Gene Expression of the Active Human Gut Microbiome. Cell. p.39-50.2013.

45. Babich, H.; Davis. D.L. Phenol: A review of environmental and health risks. Regulatory toxicology and pharmacology.p.90-109. Estados Unidos. 1981.

46. Seo, J.; Keum, Y.; Li, Q.X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds.2009.

47. Biophys B.; Finazzi-agrb, A.; Rotilio, G. Pseudomonas fluorescens.p.2009-2014. 2009.

48. Hannaforda, M.; Kuek,C.AerobicbatchdegradationofphenolusingimmobilizedPseudomonasputida. J Ind Microbiol Biotechnol.p.121-126. 1999.

49. Hassen, A.; Saidi, N.; Cherif, M.; Boudabous, A. Effects of heavy metals on Pseudomonas aeruginosa and Bacillus thuringiensis. Bioresour Technol.p.73-82. 1998.

50. Kumar, A.; Kumar, S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using Pseudomonas putida MTCC 1194.p.151-159. 2005

51. Baydar, N.G.; Özkan, G.; Sağdiç, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (Vitisvinifera L.) extracts. FoodControl. p.335-339. 2004

52. Bamforth, S.M.Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons : current knowledge and future directions. p.723-736. Fev/2005

53. Albuquerque, A.F. Biodegradação de compostos fenólicos incorporados em areia de moldagem utilizando microrganismos.2000.

54. Heesche-Wagner, K.; Schwarz, T.; Kaufmann, M. Phenol degradation by an enterobacterium: a Klebsiella strain carries a TOL-like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase. J Microbiol. P. 162-171. 1999.

55. Uehlinger, S.; Schwager, S.; Bernier, S.P. Identification of specific and universal virulence factors in Burkholderia cenocepacia strains by using multiple infection hosts. InfectImmun. p. 4102-4110. 2009.

56. De Smet, B.; Mayo, M.; Peeters, C. Burkholderia stagnalis sp. nov.and Burkholderia territorii sp. nov., two novel Burkholderia cepacia complex species from

environmental and human sources. Int J SystEvol Microbiol. p.2265-2271. 2010.

57. Vanlaera, E.; LiPuma, J.J.; Baldwin, A. Burkholderia latens sp. nov.,Burkholderia diffusa sp. nov., Burkholderia arboris sp. nov., Burkholderia seminalis sp. nov., and Burkholderia metallica sp. nov., novel species within the Burkholderia cepacia complex.Int.J.Syst.Evol.Microbiol. p. 1580-1590. 2008.

58. Léonard, D.; Lindley, N.D. Growth of Ralstonia eutropha on inhibitory concentrations of phenol: Diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbation of phenol hydroxylase activity. Enzyme Microb Technol.p. 271-277. 1999.

59. Bettmann, H.; Rehm, H.J. Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms. p.285-290. 1984

60. Sahar, Zaki. Detection of meta- and ortho - cleavage dioxygenases in bacterial phenol-degraders Engineering G, Applications T, Burg-elarab N. 2006.

61. Cuong, N.D.; Nicolaisen, M.H.; Sørensen, J.; Olsson, S. Hyphae-Colonizing Burkholderia sp.-A New Source of Biological Control Agents Against Sheath Blight Disease. Microb Ecol. p.425-434. 2011.

Ibrahim, M.; Wang, F.; Lou, M. Copper as an antibacterial agent for human pathogenic multidrug resistant Burkholderia cepacia complex bacteria.JBiosciBioeng. p.570-576. 2011.

63. Peixoto, J.; Silva, L.P.; Krüger, R.H. Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. J Hazard Mater. p.634-644. 2017.

64. Gilbert, W.J.R.; Johnson, S.J.; Tsau, J.; Liang, J.; Scurto, A.M. Enzymatic degradation of polyacrylamide in aqueous solution with peroxidase and H_2O_2. p.1-10. 2010.

65. Ding, Y.; Tian, R.; Yang, Z.; Chen, J.; Lu, N. NADPH oxidase-dependent degradation of single-walled carbon nanotubes in macrophages. J MaterSciMater Med. p.1-28. 2017.

66. Gusse, A.C.; Miller, P.D.; Volk, T.J. White-rot fungi demonstrate first biodegradation of phenolic resin. EnvironSciTechnol. p. 4196-4199. 2006.

67. Ander, P.; Eriksson, K.E. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot Fungus Sporotrich umpulverulentum. ArchMicrobiol. p.

1-8. 1976.

68. Cleland, W.W. Substrate inhibition. Methods Enzymol.p.500-513. 1979.

69. Murray, P.R.; Rosenthal, K.S. Microbiologia médica. Microbiol médica. Capítulo I. p.17-18. 2005.

70. Wang, L.; Li, Y.; Niu, L.; Zhang, W.; Li, J.; Yang, N. Experimental studies and kinetic modeling of the growth of phenol-degrading bacteria in turbulent fluids. EnvironSciPollut p.22711-22720. 2016.

71. Chaves, A.P. Teoria e prática do tratamento de minérios. P.100-1006. 2004.

72. M. F. Ashby, “Materials Selection in Mechanical Design” Butterworth Heinemann, 1999

73. Tobergte, D.R.; Curtis, S. Microwave assisted acid digestion of sileceous and organically based matrices. J ChemInfModel. p.1689-1699. 2013.

74. Madigan, M.; Martinko, J.; Bender, K. Microbiologia de Brock. Pearson Educ.p.987-1000. 2016.

75. Dhiman, N.; Hall, L.; Wohlfiel, S.L.; Buckwalter, S.P.; Wengenack, N.L. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. J ClinMicrobiol. p.1614-1616. 2010.

76. Ferroni, A.; Suarez, S.; Beretti, J.L. Real-time identification of bacteria and Candida species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J ClinMicrobiol. p. 1542-1548.2010.

77. Degand, N.; Carbonnelle, E.; Dauphin, B. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients. J ClinMicrobiol. p. 3361-3367. 2008.

78. Gonçalves, M. Cromo. Balanço Mineral Brasileiro. DNPM. 2001.

79. Scheunemann, R. Regeneração de areia de fundição através de tratamento químico via processo fenton. Univ.Fed.St Catarina.2005.

80. Avanzi, I.R.; Gracioso, L.H. Isolamento e identificação de bactéria degradora de fenol da zona industrial de Cubatão-SP, através da técnica de amplificação do DNA. p.66-70. 2009.

81. Gracioso, L.H. Análise das proteínas expressas em resposta ao fenol em

bactérias isoladas da Zona Industrial de Cubatão-SP.2012.