



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

RITA DE CÁSSIA MENDONÇA DE MIRANDA

**DEGRADAÇÃO DE EFLUENTES TÊXTEIS, DO PÓLO INDUSTRIAL DE
CARUARU-PE, POR FUNGOS**

Recife

2010

RITA DE CÁSSIA MENDONÇA DE MIRANDA

**DEGRADAÇÃO DE EFLUENTES TÊXTEIS, DO PÓLO INDUSTRIAL DE
CARUARU-PE, POR FUNGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor (a) em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Fungos Industriais

Orientador: Norma Buarque de Gusmão

Co-orientador: Katia Maria Gomes Machado

Recife

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Bibliotecária: Claudina Karla Queiroz Ribeiro CRB4/1745

Miranda, Rita de Cássia Mendonça de

Degradação de efluentes têxteis, do polo industrial de Caruaru-PE, por fungos/ Rita de Cássia Mendonça de Miranda - 2010.

119 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão

Coorientador: Kátia Maria Gomes Machado

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2010.

Inclui referências e anexos

1. Águas residuais 2. Resíduos industriais 3. Fungos I. Gusmão, Norma Buarque de (orient.) II. Machado, Kátia Maria Gomes (coorient.) III. Título

553.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-352

RITA DE CÁSSIA MENDONÇA DE MIRANDA

**DEGRADAÇÃO DE EFLUENTES TÊXTEIS, DO PÓLO INDUSTRIAL DE
CARUARU-PE, POR FUNGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em
Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do
Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutor (a) em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 05/11/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Cristina Maria Sousa Motta
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Dácio Roberto Matheus
Universidade Federal do ABC

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin Morales
Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita

Prof^a. Dr^a. Galba Maria Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco

A minha **JULIA**, sem dúvida minha maior e melhor realização.

Aos meus pais **GENEVALDO** e **STELLA** por tudo que me ensinam até hoje.

A minha avó **GERTRUDES** pelo exemplo de amor a vida que me dá diariamente.

Ao meu esposo e companheiro **EDELVIO** por estar ao meu lado em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em minha vida, me permitindo experimentar a cada dia, Aos meus pais Genevaldo e Stella, por acreditarem em mim.

A minha Julia por todos os momentos que passamos juntas, sem você nada disso teria sentido.

A Edelvio, meu amor, por partilhar comigo momentos ímpares, onde discutíamos, não só ciência mas também a vida.

A minha orientadora professora Norma Buarque de Gusmão, por ter acreditado em mim desde o início, pela pessoa humana que é e acima de tudo pelas oportunidades que me proporcionou.

A minha co-orientadora professora Kátia Maria Gomes Machado que apesar de distante nunca esteve ausente.

Ao professor Nei Pereira Jr, pelo exemplo de profissional que é e por abrir as portas do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) para a execução da parte analítica deste trabalho.

A professora Maria Aparecida Marin Morales, por me apresentar ao mundo da mutagênese, me permitindo conviver com essa ciência tão fascinante e reveladora. Os momentos no Laboratório de Mutagênese serão inesquecíveis.

Um agradecimento muito especial aos anjos que Deus colocou em minha vida:

Aliny por fazer meus dias mais felizes,

Carla por sempre acreditar em mim,

Cynthia e Danielle Patrice por me acalmarem com um simples olhar,

Flávia pelo ser humano incrível que é,

Nelânia, Maira, Talyce, Mariana e Vanessa por tudo que vocês me permitiram aprender,

Pérsio, Eric e Luis por jamais me deixarem sozinha,

Igor e Renato pelos bate papos maravilhosos.

Aos amigos do Laboratório de Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos em especial Fátima Regina e Diana.

Aos amigos do Laboratório de Elaboração de Meio de Cultivo e Preparo de Material do Departamento de Antibióticos, em especial José Orlando.

Aos novos e velhos amigos: Solange, Julliana, Rodrigo, Rodrigo, Lia, Mariana, Vladi, Carlos Eduardo, Manuela, Breno, Marema, Amanda, Darne, Glória, Miriam, Gladstone,

Vaneide, Domingos, Gláucia, Helena, Evelyne, Thales, Maria Cláudia, Márcio, Guilherme, Jefferson, pelos maravilhosos momentos que passamos juntos.

As professoras Kesia Xisto e Janete Magali de Araújo por estarem comigo desde o início da minha formação sempre dispostas a me ajudar.

Aos meus colegas de turma em especial a minha amiga Patrícia por todos os momentos compartilhados.

Aos professores da Pós Graduação em Biologia de Fungos pelos ensinamentos transmitidos, em especial a professora Maria Auxiliadora pelo seu exemplo de garra e amor a ciência.

Aos meus sogros Eliú e Antonia por terem me adotado como filha e a minha cunhada Delma por sempre me receber com um sorriso no rosto.

Aos meus tios, tias, primos e primas, que apesar de não entenderem bem o que eu fazia sempre torceram por mim.

Ao CNPq por me conceder a bolsa de estudo e a FACEPE pelo auxílio concedido para realização de parte deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho meu muito obrigada.

Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.

(Amyr Klink, 2007, p. 42)

RESUMO

No estado de Pernambuco um dos grandes problemas ambientais é a poluição hídrica provocada pelas lavanderias industriais localizadas na Região Agreste. Os efluentes descartados em corpos hídricos, vem acarretando problemas na qualidade de água para o abastecimento público. Assim o objetivo do presente trabalho foi investigar a biodegradabilidade de efluentes de origem textil proveniente do pólo industrial do município de Caruaru-PE. O Efluente textil foi caracterizado quanto a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), pH, presença de compostos fenólicos (Método Folin-Ciocalteu) e o corante presente no efluente (MS/MS). Vinte fungos foram testados quanto a capacidade de descolorir o efluente textil em condições estáticas e sob agitação de 130rpm. A fim de otimizar a condição do processo, os fungos selecionados foram testados quanto sua capacidade de descolorir o efluente em diversas condições de cultivo utilizando metodologia do planejamento experimental do tipo DCCR (27 corridas). Com fungos mais promissores e as melhores condições de cultivo estabelecidas, foram realizados experimentos em reator com e sem aeração onde foram investigadas a degradação do corante em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a produção das principais enzimas ligninolíticas. A formação de produtos de degradação por espectrometria de massa, bem como a toxicidade desses produtos em ensaio com *Allium cepa*, foi investigada a partir do processo que apresentou uma melhor eficiência. Dos vinte fungos testados, os *Phanerochaete chrysosporum* URM 6181, *Lentinula edodes* CCT 4519, *Curvularia lunata* URM 6179 e *Aspergillus* sp. foram selecionados. Análise estatística confirmou diferença significativa entre as condições de cultivo avaliadas, com maior eficiencia de descoloração do efluente textil sob agitação para a maioria dos fungos avaliados. O experimento 19 se destacou por facilitar a descoloração em 99% do efluente ao final do décimo dia pelos quatro fungos selecionados. A cinética de descoloração demonstra que a os fungos *P. chrysosporum* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 se destacam por iniciarem a descoloração antes dos outros fungos. Ambos os fungos apresentam capacidade de descolorir 99% o efluente, tendo uma pequena quantidade de corante residual ao final do décimo dia de tratamento. Os fungos *C. lunata* URM 6179 e *P. chrysosporium* URM 6181 demonstraram uma maior capacidade de degradar o corante quando o efluente foi tratado em reator aerado, embora os perfis de degradação tenham sido diferenciados entre os fungos. Após dez dias de tratamento, observa-se que a degradação do corante indigo presente no efluente pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 gera um novo composto, este fenômeno não ocorre quando o efluente é tratado pela *C. lunata* URM 6179. Este composto gerado ao longo do processo de degradação demonstrou uma genotoxicidade maior que a do efluente puro, enquanto que nas amostras tratada pelo fungo *C. lunata* URM

6179 houve diminuição da genotoxicidade e mutagenicidade em relação ao efluente puro.

Palavras-chave: Tratamento. Efluente Têxtil. Fungo.

ABSTRACT

In Pernambuco a major environmental problem is water pollution caused by industrial laundries located in Agreste's Region. Liquid waste disposed in water bodies, has been causing problems in the quality of water for public supply. So the purpose of this study was to investigate the biodegradability of effluents from textile from the industrial hub of the city of Caruaru-PE. The textile effluent was characterized as the Biochemical Oxygen Demand (BOD), Chemical Oxygen Demand (COD), pH, phenolic compounds (Folin-Ciocalteu method) and dye in the wastewater (MS / MS). Twenty fungi were tested for the ability to decolorize textile effluent under static and shaken at 130rpm. In order to optimize the process condition, the selected fungi were tested for their ability to decolorize the effluent in various culture conditions using the methodology of experimental planning DCCR (27 races). Fungi with the most promising and best growing conditions established, experiments were performed in a reactor with and without aeration were investigated where the degradation of the dye in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the production of the main ligninolytic enzymes. The formation of degradation products by mass spectrometry and the toxicity of chemicals in the *Allium cepa* test, was investigated from the process that presented a better efficiency. Of the twenty fungi tested, *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181, *Lentinula edodes* CCT 4519, URM 6179 *Curvularia lunata* and *Aspergillus* sp. were selected. Statistical analysis confirmed a significant difference between the culture conditions evaluated, with greater efficiency of decolorization of textile effluent under agitation for most of the AMF. The experiment was highlighted by 19 to facilitate the discoloration in 99% of the effluent at the end of the tenth day of the four selected fungi. The kinetics of discoloration shows that the fungus *P. chrysosporium* URM 6181 and *C. lunata* URM 6179 stand out for discoloration prior to commencing other fungi. Both fungi have the ability to decolorize 99% of the effluent, with a small amount of dye remaining at the end of the tenth day of treatment. Fungi *C. lunata* URM 6179 and *P. chrysosporium* URM 6181 showed a greater ability to degrade the dye when the effluent was treated in aerated reactor, although the degradation profiles were different between the fungi. After ten days of treatment, it is observed that the degradation of indigo dye in the wastewater by the fungus *P. chrysosporium* URM 6181 generates a new compound, this phenomenon does not occur when the effluent is treated by *C. lunata* URM 6179. This compound generated during the degradation process showed a higher genotoxicity than the pure effluent, while the samples treated with the fungus *C. lunata* URM 6179 decreased the genotoxicity and mutagenicity in relation to pure effluent.

Key-words: Treatment. Effluent. Fungi.

Fundamentação Teórica

Figura 1–	Mapa de localização dos municípios de Caruaru, Toritama e Santa Cruz do Capibaribe	19
Figura 2 –	Exemplo de uma estrutura química característica de um grupo cromóforo de um azo corante.	20
Figura 3–	Estrutura do Corante Reativo Preto 5	21
Figura 4 –	Corante Vermelho Congo contendo grupo diazo como cromóforo	22
Figura 5 –	Estrutura Molecular do Corante Ácido Violeta	22
Figura 6 –	Corante vermelho de ionamina KA, solubilizado temporariamente através da reação de hidrólise	23
Figura 7 –	Exemplo da interação de hidrogênio entre o corante sulfuroso e os grupos carboxilas da fibra de lã	23
Figura 8 –	Estrutura química do corante índigo.....	24

Caracterização de Efluente da Indústria Têxtil

Figura 1 –	Espectro de absorção do efluente têxtil coletado no tanque de estocagem de resíduos da lavanderia “Stomp” no município de Caruaru, PE	47
Figura 2 –	Detecção de compostos fenólico presentes no efluente têxtil	48
Figura 3 –	Espectro de massa do corante Indigo Carmin após a primeira fragmentação em uma faixa de energia de 400 a 445 m/z.	48
Figura 4 –	Espectro de massa do corante Indigo Carmin após a segunda fragmentação em uma faixa de energia de 400 a 465 m/z.	49
Figura 5 –	Espectro de massa do efluente têxtil após a primeira varredura em uma faixa de 215 a 275 m/z.	49
Figura 6 –	Espectro de massa do efluente têxtil após a segunda varredura em uma faixa de 240 a 440 m/z.....	50

Descoloração de Efluente de Lavanderia de Jeans do Município de Caruaru-PE por Fungos Filamentosos.

Figura 1 –	Percentual de descoloração do efluente da lavanderia de jeans nas 27 corridas executadas no planejamento experimental pelos fungos <i>P. chrysosporum</i> , <i>L. edodes</i> <i>Aspergillus</i> sp. e <i>C. lunata</i>	59
------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 2 – Cinética de descoloração do efluente pelos fungos <i>P. chrysosporium</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>C. lunata</i> e <i>L. edodes</i> ao longo de dez dias quando submetidos ao tratamento 19 gerado pelo planejamento experimental.....	59
Figura 3 – Gráfico de Pareto indicando quais variáveis apresentam uma maior influência no processo de descoloração do efluente têxtil pelo fungo <i>P. chrysosporium</i>	59
Figura 4 – Superfície resposta de agitação e concentração de extrato de levedura (g/L) com variável resposta o percentual de degradação (%) do <i>P. chrysosporium</i>	60
Figura 5 – Gráfico de Pareto indicando quais variáveis apresentam uma maior influência no processo de descoloração do efluente têxtil pelo fungo <i>C. lunata</i>	60
Figura 6 – Superfície resposta de agitação e concentração de extrato de levedura (g/L) com variável resposta o percentual de degradação (%) do <i>Curvularia lunata</i>	61

Tratamento de Efluente Têxtil em Reator Estático pelos Fungos *Curvularia*

***Lunata* URM 6179 e *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181**

Figura 1 – Corante índigo residual no efluente tratado pelos fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> URM 6181 e <i>Curvularia lunata</i> URM 6179 após dez dias em reator sem aeração.....	70
Figura 2 – Corante índigo residual no efluente tratado pelos fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> URM 6181 e <i>Curvularia lunata</i> URM 6179 após dez dias em reator aerado.....	71
Figura 3 – Percentual de degradação do corante índigo presente no efluente têxtil após dez dias de tratamento pelos fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> URM 6181 e <i>Curvularia lunata</i> URM 6179 em reator sem aeração	72
Figura 4 – Percentual de degradação do corante índigo presente no efluente têxtil após dez dias de tratamento pelos fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> URM 6179 e <i>Curvularia lunata</i> URM 6181 em reator aerado.....	73
Figura 5 – Espectro de massa da amostra do efluente tratado pelo fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> URM 6181 após 10 dias de tratamento....	74
Figura 6 – Espectro de massa da amostra do efluente tratado pelo fungo <i>Curvularia lunata</i> URM 6179 após dez dias de tratamento	74

Fundamentação Teórica

Tabela 1 – Taxa de expansão da Indústria em Geral, Indústria de Transformação, Indústria Têxtil e Indústria de Vestuário, Calçados e Artefatos de Tecidos.....	18
Tabela 2 – Classificação pelo “Colour Index” segundo o substrato a ser tingido	24
Tabela 3 – Classificação pelo “Colour Index”: de materiais corantes por aplicação	25
Tabela 4 – Características dos despejos do processamento do algodão	26

Caracterização de Efluente da Indústria Têxtil

Tabela 1 – Caracterização físico-química do efluente têxtil coletado no tanque de estocagem de resíduos da lavanderia “Stomp” no município de Caruaru, PE	47
--	----

Descoloração de Efluente de Lavanderia de Jeans do Município de Caruaru-PE por Fungos Filamentosos.

Tabela 1 – Valores estabelecidos no planejamento fatorial experimental.....	55
Tabela 2 – Percentual de decoloração do efluente pelos 20 fungos avaliados após dez dias de cultivo sob ambas as condições testadas.	57
Tabela 3 – Análise estatística entre os grupos de fungos testados	58
Tabela 4 – Quantificação da atividade total das três principais enzimas do aparato lignolítico dos fungos <i>Aspergillus</i> sp. F75, <i>C. lunata</i> UFPEDA 885, <i>P. chrysosporium</i> CCT 1999 and <i>L. edodes</i> CCT 4519.....	62

Tratamento de Efluente Têxtil em Reator Estático pelos Fungos *Curvularia Lunata* URM 6179 e *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181

Tabela 1 – Quantificação das enzimas lacase, LiPeroxidase e MnPeroxidase produzidas pelos fungos <i>P. chrysosporium</i> URM 6181 e <i>C. lunata</i> URM 6179 ao final de dez dias de tratamento de efluente textil em reatores com e sem aeração	75
---	----

Avaliação da Toxicidade de Efluente Têxtil Biotratados em Reator Aerado pelos Fungos *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181 e *Curvularia lunata* URM 6179 pelo Sisyema Biológico *Allium cepa*

Tabela 1 – Percentual (%) do Índice de Germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> expostas a amostras do efluente puro e biotratadas pelos fungos <i>P. chrysosporium</i> URM 6181 e <i>C. lunata</i> URM 6179 ao longo de 15 dias em reator aerado.	80
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2 – Índices Mitóticos de células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a amostras de efluente puro e do efluente biotratado pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 ao longo de 15 dias em reator aerado 81
- Tabela 3 – Índices de Alterações Cromossômicas das células meristemáticas de *Allium cepa* expostas em amostras do efluente puro e do efluente biotratado pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* 6179 ao longo de 15 dias em reator aerado 81
- Tabela 4 – Índices de Mutagenicidade das células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a amostras do efluente puro e do efluente biotratado pelos fungos *P. chrysosporium* e pelo *C. lunata* ao longo de 15 dias em reator aerado 82
- Tabela 5 – Número de aberrações cromossômicas obtidas nos testes com *Allium cepa* nas amostras estudadas. 82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	INDÚSTRIAS TÊXTEIS	17
2.1.1	Corantes Têxteis	19
2.2	EFLUENTES TÊXTEIS	25
2.2.1	Tratamento de Efluentes Têxteis	28
2.2.1.1	Tratamento Físico-Químico	29
2.2.1.2	Tratamento Biológico.....	31
2.2.1.2.1	<i>Bactérias Degradadoras de Corantes</i>	32
2.2.1.2.2	<i>Fungos Degradadores de Corantes</i>	33
2.3	PROBLEMAS TOXICOLÓGICOS ASSOCIADOS AOS CORANTES	37
2.3.1	Sistema de Teste com <i>Allium cepa</i>	40
3	CARACTERIZAÇÃO DE EFLUNTE DA INDÚSTRIA TÊXTIL	43
4	DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTE DE LAVANDERIA DE JEANS DO MUNICÍPIO DE CARUARU-PE POR FUNGOS FILAMENTOSOS....	52
5	TRATAMENTO DE EFLUENTE TÊXTIL EM REATOR ESTÁTICO PELOS FUNGOS CURVULARIA LUNATA URM 6179 AND PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM URM 6181.....	65
6	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTE TÊXTIL BIOTRATADOS EM REATOR AERADO PELOS FUNGOS <i>Phanerochaete chrysosporium</i> URM 6181 e <i>Curvularia lunata</i> URM 6179 PELO SISTEMA BIOLÓGICO <i>Allium cepa</i>	76
7	CONCLUSÕES	85
8	PERSPECTIVAS	86
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICE A - SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA NO SISTEMA CLAE UV...	99
	ANEXO A - TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY.....	104

1 INTRODUÇÃO

Os corantes sintéticos foram descobertos por um químico inglês, William Perkin, em 1856, e a partir de então, teve início a grande produção de corantes orgânicos sintéticos (VAN der ZEE, 2002). Há no mercado mais de 100.000 corantes, sendo a maioria de origem sintética. Possuem diversas utilidades, entre as quais se destacam: a coloração e o tingimento de materiais têxteis, couro, plástico, produtos alimentares, farmacêuticos e cosméticos. Estes corantes, devido à finalidade a que se destinam, são resistentes ao ataque biológico, luz, calor e oxidação. Atualmente, são conhecidas diferentes estruturas químicas de corantes sintéticos associados à indústria têxtil (MANU; CHAUDHARI, 2002; NEAMTU et al., 2002).

Os processos têxteis são grandes consumidores de água e de corantes sintéticos. São geradores de efluentes volumosos e complexos com elevada carga orgânica, aliada ao elevado teor de sais inorgânicos (CEGARRA, 2000). Quando lançadas num curso d'água, os corantes sintéticos provocam graves danos ambientais. A presença de apenas um miligrama de corante por litro de água é suficiente para colorir pelo menos parcialmente um manancial conforme esta informação. Como resultado, a luz solar deixa de atingir as plantas aquáticas, impedindo a fotossíntese e assim sua adequada reprodução. Como consequência, os peixes têm a oferta de alimentos e oxigênio reduzida (HASSEMER et al., 2001).

No estado de Pernambuco um dos grandes problemas ambientais é a poluição hídrica provocada pelo lançamento de efluentes das lavanderias industriais de jeans, em especial aquelas localizadas na Região Agreste, especificamente no Pólo de confecções nos municípios de Caruaru, Santa Cruz do Capibaribe e Toritama. Os efluentes dessas lavanderias são descartados em corpos hídricos responsáveis pelo abastecimento de água dos municípios citados, o que vem acarretando problemas na qualidade de água para o abastecimento público (JORNAL DO COMÉRCIO, 2007).

Há diversas formas de tratamento para os efluentes têxteis: físicos, químicos e biológicos. Os microrganismos vêm sendo intensamente estudados com a finalidade de remover compostos tóxicos do ambiente. As pesquisas sobre degradação de compostos químicos têm mostrado que bactérias e fungos são extremamente versáteis em degradar substâncias recalcitrantes. Enquanto as bactérias são bastante eficientes degradando anaerobicamente substâncias como corantes do tipo azo, os fungos têm a habilidade de degradar produtos da degradação de forma aeróbia (KAUSHIK; MALIK, 2009). Entre os fungos, os basidiomicetos degradadores de lignina, denominados “causadores da podridão branca da madeira”, tem demonstrado eficiência na degradação de grande variedade de

compostos poluentes, incluindo corantes têxteis, com potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (MACHADO; MATHEUS; BONONI, 2005).

De acordo com Kaushik e Malik (2009), o mecanismo de descoloração de corantes têxteis por fungos da podridão branca envolve as enzimas peroxidases da lignina (LiPs), peroxidases dependente do manganês (MnPs) e as lacases. Entretanto, estes fungos diferem na habilidade e capacidade de degradar corantes, com base nas diferenças qualitativas e quantitativas dessas enzimas.

Balan e Monteiro (2001) constataram a degradação do corante índigo em meio de cultura líquido pelos basidiomicetos *Phellinus gilvus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Picnoporus sanguineus* e *Pleurotus ostreatus*. Ranzani (2002) selecionou linhagens de *Pleurotus* capazes de degradar o corante índigo, utilizando meios de cultura líquido e sólido. Neste estudo, o autor constatou que o emprego de bagaço de cana misturado com folha de bananeira como substrato para crescimento do fungo ofereceu condições favoráveis para a degradação do corante presente em lodo residual, procedente de estação de tratamento de efluente de uma indústria têxtil.

A grande diversidade e complexidade dos efluentes têxteis, aliadas às imposições cada vez mais restritivas da legislação brasileira, exigem o desenvolvimento de novas tecnologias, que busquem o tratamento melhor e mais adequado, considerando custos, tempo e eficiência do processo no tratamento desses resíduos, promovendo a eliminação da toxicidade (KAUSHIK; MALIK, 2009).

Neste sentido essa tese apresenta os seguintes objetivos:

Geral: Investigar a biodegradabilidade de efluente têxtil proveniente do pó industrial do município de Caruaru – PE

Específicos: Efetuar a caracterização química e físico-química do efluente têxtil a ser utilizado; Selecionar espécies de fungos com capacidade de descolorir o efluente têxtil; Realizar ensaios de descoloração do efluente têxtil, com os organismos selecionados, a fim de otimizar as condições do processo; Realizar ensaios de biodegradabilidade do(s) corante(s) presente no efluente têxtil, com as culturas selecionadas, utilizando as melhores condições estabelecidas nos ensaios prévios; Analisar os produtos resultantes da degradação do efluente têxtil pela cultura selecionada; Quantificar a produção das principais enzimas envolvidas no processo de degradação do efluente têxtil pela cultura selecionada; Avaliar a toxicidade dos compostos intermediários produzidos ao longo do processo de degradação do efluente têxtil pela cultura selecionada.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 INDÚSTRIAS TÊXTEIS

A indústria têxtil é uma das maiores do mundo, no que diz respeito à produção e ao número de trabalhadores e engloba atividades como fiação, tecelagem, malharia, acabamento ou beneficiamento e confecção. Uma das características deste segmento industrial é a geração de rejeitos com grandes quantidades de água, corantes e produtos químicos utilizados ao longo de uma complexa cadeia produtiva. Cerca de 100m³ de água são consumidos, em média, para cada tonelada de tecido processado.

No Brasil, o setor têxtil constitui um fator importante para a economia, sendo os estados de Santa Catarina e São Paulo os maiores pólos têxteis em volume de produção (HASSEMER, 2001). A indústria têxtil brasileira teve uma participação histórica e decisiva no processo de desenvolvimento do país, pois foi um dos primeiros setores industriais a ser implantado. Este segmento estrutura-se com empresas espalhadas por todo o país, gerando milhões de empregos, diretos (produção fabril) ou indiretos (produção de matérias-primas) e vários outros insumos. Destaca-se como estimulador da criação de outras indústrias, entre as quais de máquinas têxteis, de fibras artificiais e sintéticas, de embalagens, de drogas e anilinas. Não devendo omitir a imensa massa trabalhadora, existente na produção de fibras naturais, na lavoura e na pecuária ovina (VIEIRA, 1995).

O Brasil encontra-se entre os 10 maiores produtores mundiais, ocupando a sétima posição na produção de fios e tecidos planos e a terceira na produção de malha. No entanto, no comércio internacional sua participação é muito pequena, estando apenas entre os 20 maiores comerciantes de têxteis no mundo. O consumo per capita de têxteis no Brasil cresceu de 8,3 kg/habitante em 1990 para 9,5 kg/habitante em 1999, o que significa um crescimento acumulado superior ao da população, embora ainda seja considerado um nível baixo em relação ao consumo médio dos maiores mercados mundiais (GORINI, 2000; MONTEIRO; SANTOS, 2002).

No estado de Pernambuco, segundo a Federação das indústrias, as maiores empresas dos setores de têxteis e de confecções são a fábrica da Vicunha, localizada em Paulista, com 850 empregados, que detém a Santista Têxtil, com 459 empregados. Além disso, em Camaragibe, no entorno da Região Metropolitana do Recife (RMR), duas grandes fábricas empregam juntas, quase 1.400 pessoas. Há, ainda, registros de empresas de grande porte, no Recife, Olinda, Igarassu, Moreno, Abreu e Lima e Jaboatão, na Região Metropolitana.

No interior do Estado, no agreste, pode-se destacar Caruaru, Toritama e Santa Cruz do Capibaribe, onde se concentra um grande número de pequenas empresas de confecções (IBGE, 2009). No Sertão, há registros de empresas de grande porte, em Araripina (Araripe Têxtil, com 250 empregados) e em Petrolina (Cia Têxtil do Vale, com 340 empregados). Na Tabela I, encontra-se um resumo dos dados da pesquisa industrial do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), destacando o desempenho, no período de 1991 a 2003, das indústrias Têxteis e de Vestuário, Calçados e Artefatos de Tecidos, em Pernambuco e no Nordeste. A Tabela 1 também inclui, para proporcionar um contexto mais amplo de comparações, os desempenhos no mesmo período da indústria “Geral” e da “Indústria de Transformação”. É preciso ressaltar que o universo da pesquisa do IBGE se restringe ao setor formal, o que deixa de fora uma boa parte do setor de Vestuário (ou confecções) do Estado de Pernambuco (IBGE, 2009).

Tabela 1 – Taxa de expansão da Indústria em Geral, Indústria de Transformação, Indústria Têxtil e Indústria de Vestuário, Calçados e Artefatos de Tecidos

Região/ Indústria	Média¹ de 1991	Jul 1998	Jul 1999	Jul 2000	Jul 2001	Jul 2002	Jul 2003
Nordeste							
Indústria Geral	100.0	109.9	107,2	104,6	105,4	109,7	102,3
Indústria de Transformação	100.0	111.1	108,5	106,0	107,9	114,1	104,8
Têxteis	100.0	96.6	98,6	105,8	90,1	98,7	95,2
Vestuário, Calçados, Artefatos de Tecidos	100.0	109,8	79,5	95,2	87,5	82,1	57,7
Pernambuco							
Indústria Geral	100.0	78,8	72,3	69,9	77,5	76,0	73,4
Indústria de Transformação	100.0	78,8	73,4	70,0	77,6	76,0	73,4
Têxteis	100.0	50,4	52,8	65,9	72,5	75,1	74,1
Vestuário, Calçados, Artefatos de Tecidos	100.0	67	39,6	34,6	29,9	31,5	9,4

1. Índices de Produção Física, 1991, 1998/2003 (Média de 1991=100).

Fonte: IBGE (2009).

No início da década de noventa houve uma abertura industrial no país o que causou mudança significativa neste setor. Um exemplo disto é que em julho de 1998 a produção física da indústria têxtil, em Pernambuco, era 50% menor do que havia sido em 1991; a indústria de “vestuário, calçados e artefatos de tecidos” teve um choque um pouco menor, mesmo assim, sua produção física, em julho de 1998, não alcançava 70% da média mensal de 1991. Em ambos os casos no Estado de Pernambuco, essas indústrias tiveram taxas de crescimento superior do que em toda região Nordeste (CONDEPE, 2008).

Outro dado significativo é que no Estado, os 4.988 empregos formais do setor têxtil representavam 3,69% do emprego industrial total de todo o país. Para o caso das confecções, o percentual correspondente era de 7,96%. O setor industrial, nas estatísticas acima, está

representado apenas pelas indústrias de transformação e extrativa. Assim, analisando os dados se percebe que boa parte da indústria nacional sofreu com a abertura comercial, principalmente pelo aumento de competitividade. Isto posto, no que tange a indústria têxtil vê-se que esta sentiu ainda mais, observando o ano de 1998. Contudo, observa-se também que o setor vem crescendo, principalmente a partir de 2001, momento em que as políticas de desenvolvimento das regiões do Estado começaram a surgir efeito (IBGE, 2009).

Apesar do benefício na economia, com a geração de empregos diretos e indiretos e a circulação do capital, o setor industrial têxtil tem provocado sérios problemas ambientais. Em Pernambuco a poluição hídrica provocada pelo lançamento de efluentes das lavanderias industriais de jeans, em especial as localizadas na Região Agreste (Figura 1), especificamente no Pólo de confecções nos municípios de Caruaru, Santa Cruz do Capibaribe e Toritama, tem sido motivo de preocupação dos órgãos ambientais responsáveis. Os efluentes dessas lavanderias são descartados em corpos hídricos responsáveis pelo abastecimento de água dos municípios citados, o que vem acarretando problemas na qualidade da água para o abastecimento público.

Figura 1 – Mapa de localização dos municípios de Caruaru, Toritama e Santa Cruz do Capibaribe



Fonte: Google maps (2009).

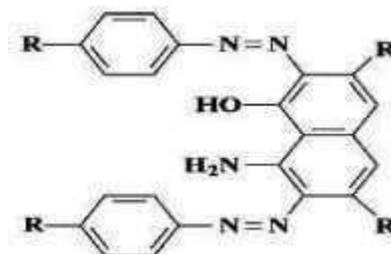
2.1.1 Corantes Têxteis

Em sentido amplo, o termo corante designa toda e qualquer substância que dá cor, colore, ting e pinta. Em química, corante denomina apenas a substância de caráter aromático,

capaz de colorir irreversivelmente um substrato suporte. Os corantes e pigmentos são substâncias empregadas pelo homem há mais de 20 mil anos para coloração de alimentos, couro, lã, materiais têxteis naturais e sintéticos, cosméticos, plásticos, papel e outros materiais. Até a metade do século dezanove só existiam pigmentos naturais provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais. Entretanto muitos corantes naturais utilizados na antigüidade ainda são empregados em larga escala, como é o caso do índigo, um pigmento azul extraído da *Indigofera tinctoria* L. (ZANONI; CARNEIRO, 2001; QMCWEB, 2004). Sua natureza química permite que sejam retidas suas moléculas por adsorção física, formações de sais, soluções, retenção mecânica ou por constituição de pontes químicas covalentes (DELLAMATRICE; MONTEIRO; BALAN, 2008). Estas substâncias podem ser naturais ou compostos sintéticos e para apresentar utilidade têxtil são necessárias três características: cor, afinidade com a fibra e solidez aos agentes os quais a fibra têxtil será submetida após seu tingimento, como luz, peróxidos e outros agentes químicos interferentes (GOMES, 2001).

A molécula do corante utilizada para tingimento da fibra têxtil pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo e a estrutura responsável pela fixação à fibra. Baseado nisto, existem duas formas de classificação dos corantes: a primeira é pela constituição química, de acordo com os grupos cromóforos ou unidade de cor da molécula; a segunda é baseada na aplicação do uso final do corante (DELLAMATRICE; MONTEIRO; BALAN, 2008). Existem vários grupos cromóforos utilizados na síntese de corantes. No entanto, o grupo mais representativo e largamente empregado pertence à família dos azocorantes (Figura 2), que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos do tipo: -N=N-, ligados a sistemas aromáticos. Esta classe representa o maior grupo de corantes utilizados no mundo, com uso na coloração de fibras têxteis (VANDERVIVERE; BIANCHI; VERSTRAETE, 1998; CHEN; WANG; CERNIGLIA, 2004; KUMAR et al., 2006; JADHAV et al., 2007).

Figura 2 – Exemplo de uma estrutura química característica de grupo cromóforo de azo corante



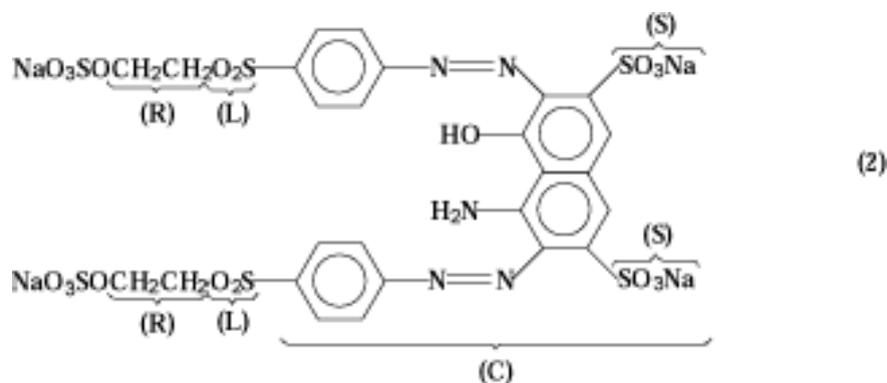
Fonte: Kunz e Peralta-Zamora (2002).

A outra parte da molécula do corante, ligada ao grupo cromóforo, é responsável pela fixação do corante à fibra. Existem várias classes de corantes classificados segundo sua fixação, como, por exemplo, ácido, básico, direto, de enxofre e reativos, sendo este último o mais utilizado em nível mundial (MANGOLD, 1995).

Ferreira (2001) relata os principais grupos de corantes, classificados pelo modo de fixação à fibra têxtil:

Corantes reativos: realizam uma ou mais ligações covalentes com grupos hidroxila das fibras celulósicas (Figura 3), com grupos amino, hidroxila e tiol das fibras protéicas e também com grupos amino das poliaminas, pois contém grupos eletrofílicos (reativos), geralmente clorotriazina e/ou vinilsulfona. Tais reações de impregnação à fibra ocorrem em meio alcalino. São muito solúveis em água e os cromóforos geralmente são antraquinona e azo. Eles podem ser utilizados no tingimento de fibras celulósicas com boas características de tingimento, solidez e estabilidade química (MANGOLD, 1995; ALACANTARA; DALTIM, 1996).

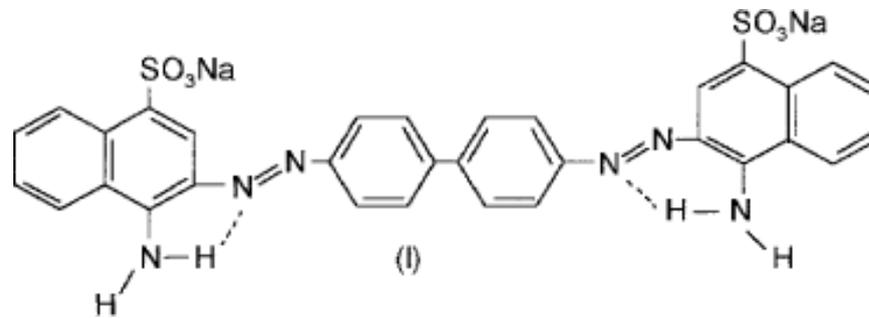
Figura 3 – Estrutura do Corante Reativo Preto 5



Fonte: Weber e Stichney (1993).

Corantes diretos: caracterizam-se como compostos solúveis em água, capazes de tingir fibras de celulose através de interações de Van Der Waals. A afinidade do corante é aumentada pelo uso de eletrólitos, pela planaridade das moléculas ou pela presença de duplas ligações conjugadas que aumentam a adsorção do corante à fibra. Esta classe de corantes é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo (diazo, triazo e etc.) ou pré-transformados em complexos metálicos (Figura 4).

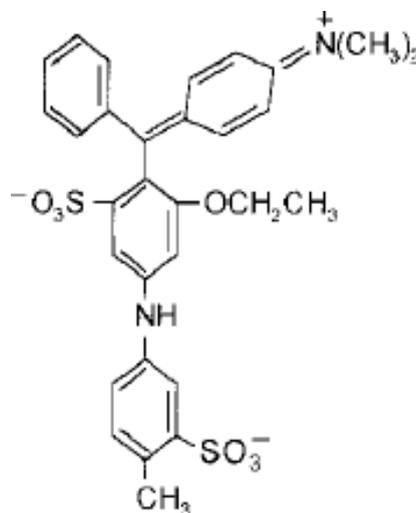
Figura 4 – Corante Vermelho Congo contendo grupo diazo como cromóforo



Fonte: Guaratini e Zanoni (2000).

Corantes ácidos: o termo corante ácido corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos (Figura 5). Estes substituintes tornam o corante solúvel em água, e têm vital importância no método de aplicação do corante em fibras protéicas (lã e seda) e em poliamida sintética. No processo de tintura, o corante previamente neutralizado (solução contendo cloreto e principalmente acetato) liga-se através de interações envolvendo o par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilato das fibras na forma não protonada;

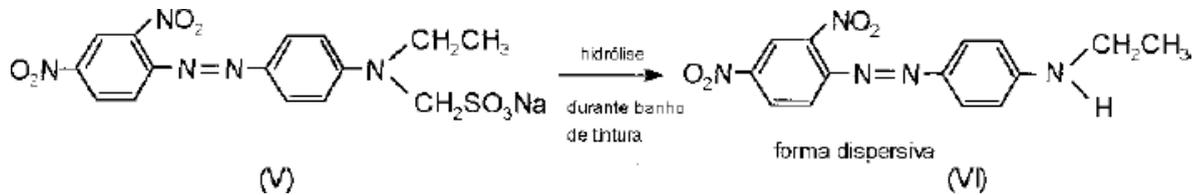
Figura 5 – Estrutura Molecular do Corante Ácido Violeta



Fonte: Guaratini e Zanoni (2000).

Corantes dispersivos: constituem uma classe de corantes insolúveis em água, aplicados através de suspensão. Durante o processo de tintura, o corante sofre hidrólise e a forma insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa (finamente dividida) sobre o acetato de celulose, nylon, poliéster e poliácridonitrila (Figura 6);

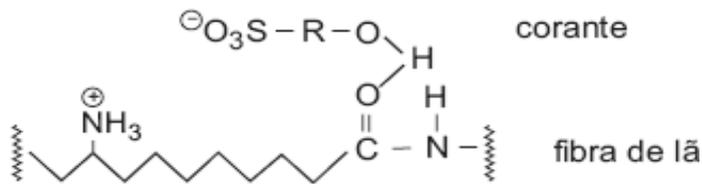
Figura 6 – Corante vermelho de ionamina KA, solubilizado temporariamente através da reação de hidrólise



Fonte: Guaratini e Zanoni (2000).

Corantes Sulfurosos: é uma classe de corantes que após a aplicação caracterizam-se como compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos (-Sn) os quais são altamente insolúveis em água (Figura 7). São utilizados, principalmente, na tintura de fibras celulósicas conferindo-lhes as cores: preta, verde oliva e azul marinho;

Figura 7 - Exemplo da interação de hidrogênio entre o corante sulfuroso e os grupos carboxilas da fibra de lã



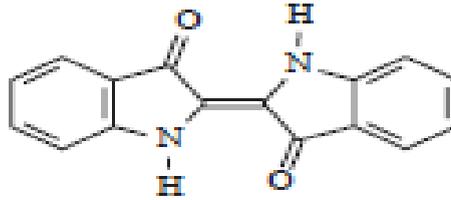
Fonte: Guaratini e Zanoni (2000).

Corantes básicos: são corantes catiônicos que interagem com as fibras, principalmente sintéticas, por interações eletrostáticas.

O índigo “blue” é usado no tingimento de fios de algodão empregados na manufatura do tecido conhecido como jeans (FALZONI, 1995). É um composto azul, insolúvel em água e conhecido desde longa data. Era extraído de plantas (GILLAM et al., 2000) antes da introdução do índigo sintético comercial (LUBS, 1955). A característica química deste composto é a presença do grupo cetônico (C = O) (Figura 8), que é insolúvel em água, mas, quando se altera na forma reduzida (C – OH), torna-se solúvel e este passa a ter afinidade química pela fibra celulósica (LUBS, 1955; BALFOUR-PAUL, 1998). Cerca de 5 a 20% do corante é perdido no processo de tingimento, e quando é descartada diretamente no meio ambiente, pode gerar sérios problemas nos processos biológicos aquáticos fundamentais (IBANEZ; SING; SZAFRAN, 1998). Este problema se torna ainda mais sério, pois grandes amostras de corantes sintéticos são encontradas em efluentes de indústrias de processamento

têxtil durante a coloração e subsequente lavagem do tecido, uma vez que eles são partes integrante de muitos processos industriais (KEHARIA; MADAMWAR, 2003).

Figura 8 – Estrutura química do corante índigo



Fonte: Falzoni (1995).

No processo de tingimento, outros critérios, além da afinidade com a fibra têxtil, influenciam na aplicação de um corante. Em sua maioria, esses processos podem ser divididos em categorias: contínuo, semi-contínuo e por esgotamento, o que define a escolha do corante adequado. São também fatores decisivos para a seleção do corante adequado as características técnicas que se quer atingir em matérias de solidez como, por exemplo, à luz, à fricção, e ao suor (LANGE; SOUZA; SOUZA, 2005; ROSA, 2003; SANTOS, 2003).

A utilização de corantes no Brasil concentra-se, principalmente, nos corantes reativos para fibras celulósicas, que hoje respondem por 57% do mercado, seguidos pelos corantes dispersos com 35%, poliamida com 3% e acrílico com 2% (ABIQUIM, 2008). Pelo Colour Index (2009) os corantes e pigmentos podem ser classificados em vinte e seis tipos, segundo os critérios das classes químicas e em vinte tipos, além de algumas subdivisões, do ponto de vista das aplicações (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Classificação pelo “Colour Index” segundo o substrato a ser tingido

CLASSE	PRINCÍPAIS CAMPOS DE APLICACÃO
Branqueadores ópticos	Detergentes. Fibras naturais, fibras artificiais, fibras sintéticas, óleos, plásticos, sabões, tintas e papel.
Corantes	
A Cuba Sulfurados	Fibras naturais e fibras artificiais
À Tina	Fibras naturais
Ácidos	Alimentos, couro, fibras naturais, fibras sintéticas, lã e papel
Ao Enxofre	Fibras naturais
Azóicos	Fibras naturais, fibras sintéticas
Básicos	Couro, fibras sintéticas, lã, madeira e papel
Diretos	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
Dispersos	Fibras artificiais e fibras sintéticas
Mordentes	Alumínio anodizado, lã, fibras naturais e fibras sintéticas
Reativos	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
Solventes	Ceras, cosméticos, gasolina, madeira, plásticos, solventes orgânicos, tintas de escrever e vernizes
Pigmentos Orgânicos	Tintas gráficas, tintas e vernizes, estamperia têxtil, plásticos
Pigmentos Inorgânicos	Tintas gráficas, tintas e vernizes, estamperia têxtil, plásticos

Tabela 3 – Classificação pelo “Colour Index”: de materiais corantes por aplicação

CLASSES	
Acrinida	Básicos, pigmentos orgânico
Aminocetona	À tina, mordentes
Antraquinona	Ácidos, mordentes, à tina, dispersos, azóicos, básicos, diretos, reativos, pigmentos orgânicos
Ao enxofre	Enxofre, a cuba
Azina	Ácidos, básicos, solventes, pigmentos orgânicos
Azo	Ácidos, diretos, dispersos, básicos, mordentes, reativos
Azóico	Básicos, naftóis
Bases de oxidação	Corantes especiais para tingimento de pelo, pelegos, cabelos
Difenilmetano	Ácidos, básicos, mordentes
Estilbeno	Diretos, reativos, branqueadores ópticos
Ftalocianina	Pigmentos orgânicos, ácidos, diretos, azóicos, a cuba, reativos, solventes
Indamina e Indofenol	Básicos, solventes
Indigóide	À tina, pigmentos orgânicos
Metina e Polimetina	Básicos, dispersos
Nitro	Ácidos, dispersos, mordentes
Nitroso	Ácidos, dispersos, mordentes
Oxazina	Básicos, mordentes, pigmentos orgânicos
Quinolina	Ácidos, básicos
Tiazina	Básicos, mordentes
Tiazol	Branqueadores ópticos, básicos, diretos
Triarilmetano	Ácidos, básicos, mordentes
Xanteno	Ácidos, básicos, mordentes, branqueadores ópticos, solventes

No processo de enobrecimento têxtil para atender a demanda do consumidor, moda e tendências de mercado, são empregados além de corantes, também pigmentos e branqueadores ópticos. Os pigmentos têm a característica funcional de somente fornecer cor ao sistema. Por esse motivo, sua aplicação é extremamente difundida nos diferentes materiais e substratos. São materiais orgânicos sintéticos, obtidos por meio de sínteses químicas, partindo-se do petróleo ou carvão. Diferentemente dos corantes ou pigmentos, que incorporam a cor ao substrato tratado, os agentes branqueadores fluorescentes que conferem o “branco puro” ou “branco-neve” são compostos orgânicos incolores que, aplicados a um substrato, absorvem luz na região próxima ao ultravioleta do espectro (340-380nm), e reemitem a maior parte da energia absorvida como luz fluorescente violeta-azulada, na região visível (400-500nm). Os principais tipos de branqueadores óticos usados industrialmente são derivados estilbênicos, obtidos pela condensação de cloreto cianúrico com ácido diamino-estilbemo-dissulfônico, seguido de condensações sucessivas com outras aminas (DELLAMATRICE; MONTEIRO; BALAN, 2008).

2.2 EFLUENTES TÊXTEIS

Os processos têxteis são grandes consumidores de água e de corantes sintéticos, gerando efluentes volumosos e complexos com elevada carga orgânica e elevado teor de sais

inorgânicos como pode se observado na tabela 4. Ainda nesta tabela pode-se visualizar o grande consumo de água no processamento do algodão. A geração de grandes volumes de efluentes resulta em enorme dificuldade no gerenciamento ambiental desses efluentes, quer sejam gerados pelas emissões ou descargas dos processos de rotina, pelo descarte de resíduos do processo, embalagens usadas ou mesmo por emissões acidentais (BALAN, 2002; YUZHU; VIRARAGHAVAN, 2001). Dentro de vários setores industriais, os usuários e produtores de corantes estão se confrontando dia-a-dia com questões sobre saúde, segurança e proteção ao meio ambiente pelo uso e manuseio desse grupo de produtos químicos. Nos efluentes líquidos a presença do corante é de fácil percepção visual, atraindo atenção dos órgãos fiscalizadores à necessária proteção ambiental e às adequadas alternativas para a sua degradação e para a minimização de sua toxicidade (ROSOLEN et al., 2004).

Tabela 4 - Características dos despejos do processamento do algodão

PROCESSO	COMPOSIÇÃO	DBO mg/L	pH	CONSUMO DE ÁGUA L/kg
Engomagem	Amidos naturais, PVA e carboximetilcelulose (CMC)	620-2500	7 - 9	0,5 - 7,8
Desengomagem	Glicose da hidrólise do amido, PVA solúvel e CMC solúvel	200-5200	6 - 8	2,5 - 20,8
Cozimento	Ceras, pectinas, álcoois, gomas, óleos e graxas, detergente e NaOH	100-2900	10 - 13	2,5 - 42,6
Mercerização	NaOH	50-800	5,5 - 14	16,7 - 309,0
Alvejamento	Agentes oxidantes: hipoclorito de sódio, H ₂ O ₂	100-1700	8,5 - 12	2,5 - 124,5
Tingimento e Estamparia	Corantes e auxiliares de tingimento	60-600	6 - 12	41,8 - 250,6

Embora os corantes representem menos de 1% do total de venda de químicos orgânicos do mundo, esta medida não fornece o grau de importância dos corantes na vida cotidiana. Aproximadamente 10.000 corantes sintéticos são usados como insumos industriais especialmente na indústria têxtil e tinturarias (ZAMORA et al., 2002). A situação tem se agravado com o surgimento de novas classes de corantes, visando atender as necessidades e exigências atuais do mercado em relação ao tingimento de novos tipos de fibras químicas. Isto agrava um problema já existente que é o do efluente industrial da manufatura dos corantes ou de indústrias que deles se utilizam, já que são considerados potencialmente tóxicos aos organismos vivos (MACEDO; SILVA, 2002).

Os resíduos da indústria têxtil se caracterizam por sua baixa degradabilidade, sendo, considerados um dos mais difíceis de serem tratados (JOSHI et al., 2004). A origem sintética e a estrutura molecular complexa dos corantes dificultam a sua degradação, pois os organismos presentes na natureza não desenvolveram ainda mecanismos eficientes para a sua degradação. Assim, estes resíduos não têm um método adequado de tratamento e efluentes tratados de forma ineficiente têm sido descartados no ambiente contendo ainda alta carga poluidora levando, comprometendo os ambientes aquáticos (DELLAMATRICE; MONTEIRO; BALAN, 2008).

Características do corante como: brilho, cor visível a baixas concentrações e estabilidade à luz e a ataques químicos, necessárias para o processo de tingimento, tornam essas moléculas mais difíceis de serem degradadas. Corantes, como os do grupo antraquinona (C=O), os quais possuem estruturas aromáticas fundidas, e corantes básicos, que possuem cores brilhantes e intensas, são bastante resistentes à degradação (DELLAMATRICE; MONTEIRO; BALAN, 2008). Segundo Robinson et al. (2001), corantes aniônicos, como os reativos e ácidos, são muito solúveis e tendem a passar inalterados pela estação de tratamento, principalmente se contém também grupos azo, os quais têm forte afinidade por elétrons, o que confere a estas substâncias proteção contra enzimas oxigenases.

Cerca de 15% dos corante empregados no processo de coloração têxtil são encontrados no efluente como resultado da incompleta fixação dos corantes durante a etapa de tingimento (KANDELBAUER; GUBITZ, 2001). Métodos convencionais de tratamento, como o de lodo ativado, têm demonstrado baixa eficiência na remoção da cor, e a maior parte dos corantes são removidos do efluente durante o processo de decantação, se acumulando no lodo que é o sub-produto da degradação do efluente (KUMAR et al., 2006).

O município de Toritama, localizado no agreste de Pernambuco, integrava até 2006, juntamente com Caruaru, Santa Cruz do Capibaribe, Surubim e diversas outras cidades, o pólo de confecções do Estado. Segundo o Sindicato das Indústrias do Vestuário do Estado de Pernambuco (Sindinvest/PE), o pólo representava 70% da produção de confecções do Estado e todo o efluente da lavagem do jeans era descartado no Capibaribe sem tratamento.

Em 2001, o Ministério Público instaurou inquérito público. Mas como nenhuma ação foi desenvolvida, em 2002, esta instituição deu um ultimato e ameaçou fechar todas as 50 empresas por não terem se enquadrado na legislação ambiental brasileira, no que tange ao lançamento, no Rio Capibaribe dos efluentes de seus processos industriais, ao tratamento dos resíduos sólidos e à poluição atmosférica provocada pelas caldeiras. O promotor de Justiça da comarca de Toritama instaurou o inquérito contra as lavanderias e estava empenhado em

auxiliar na busca de soluções para a redução da poluição do Rio Capibaribe. Portanto, as lavanderias do município poderiam ter suas portas literalmente lacradas se não implantassem processos tecnológicos para se enquadrarem na legislação vigente. O problema era incontornável para a localidade de Toritama, já que o Rio Capibaribe era, na época, uma das fontes de abastecimento de água potável da cidade do Recife (JORNAL DO COMÉRCIO, 2007).

2.2.1 Tratamento de Efluentes Têxteis

Nas últimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e frequentes, principalmente devido ao desmedido crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. Devido à ação antrópica, os problemas ambientais têm atingido dimensões catastróficas, podendo ser observados pelas alterações na qualidade do solo, ar e água. Sem dúvida, a contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna. A economia de água em processos produtivos vem ganhando especial atenção devido ao valor agregado que tem sido atribuído a este bem, através de princípios como consumidor pagador e poluidor pagador, recentemente incorporado à legislação brasileira. Aliado a isso, existem previsões não muito animadoras para este século no que diz respeito a falta de água no planeta. Dentro deste contexto, o setor têxtil apresenta um especial destaque, devido ao seu parque industrial instalado gerar grandes volumes de efluentes, os quais, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental.

Os efluentes têxteis se caracterizam por serem altamente coloridos, devido à presença de corantes que não se fixam na fibra durante o processo de tingimento (O'NEILL et al., 1999), por apresentarem pH variando entre muito alcalino ou bastante ácido, elevada temperatura, alta concentração de materiais coloridos (DANESHVAR; ASHASSI-SORKHABI; TIZPAR, 2003), elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO) e elevada salinidade (LIN; CHEN, 1997; SENAN et al., 2003). O teor de sólido total varia de 1000 a 1600 mg L⁻¹ enquanto que o teor dos sólidos em suspensão varia de 30 a 50 mg L⁻¹.

A poluição de corpos d'água com estes compostos provoca, além da poluição visual, alterações em ciclos biológicos afetando principalmente o processo de fotossíntese. Além deste fato, estudos têm mostrado que algumas classes de corantes, principalmente azocorantes, e seus subprodutos, podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos (BROWN; DEVITO, 1993).

O tratamento de efluentes têxteis pode ser fundamentado em dois processos básicos: remoção por técnicas que permitem eliminar os compostos por transferência, a partir de suportes adequados, sem, no entanto degradar os compostos coloridos, ou a degradação parcial ou completa, até a mineralização da molécula dos corantes (SLOKAR; LE MARECHAL, 1998). Vários tipos de tratamento são relatados na literatura, porém a escolha por um deles depende do porte da empresa. Enquanto as indústrias de grande porte dão preferência para processos biológicos de tratamento, as indústrias de médio porte têm adotado sistemas de tratamento baseados em métodos como a coagulação química, adsorção por carbono ativado e, com menor frequência a ultrafiltração. Esses sistemas são não-destrutivos e embora o volume dos rejeitos seja diminuído, a disposição das fases sólidas continua sendo um problema ambiental (DELLAMATRICE; MONTEIRO; BALAN, 2008).

Os processos de tratamentos adotados pelas indústrias têxteis que operam por meio de sistemas físico-químicos, seguidos do tratamento biológico via lodo ativado, embora apresentem cerca de 80% de eficiência na remoção da cor, denota como principal desvantagem a geração do lodo, considerado crítico do ponto de vista ambiental, visto o percentual de corante adsorvido criar um problema para sua disposição adequada (ROBINSON et al., 2001; MAAS; CHAUDHARI, 2005). Paralelamente, algumas alternativas vem sendo buscadas a fim de otimizar o tratamento de efluentes das industrias têxteis nas estações de tratamento utilizadas atualmente. Lu et al. (2010), sugerem uma planta de tratamento de efluente têxtil com capacidade para 600m³/dia, unindo o sistema biológico do tipo lodo ativado com um sistema de filtração com membranas de cerâmica. Ao final do tratamento, os autores verificaram a eficiência do processo analisando a remoção da cor, turbidez, demanda química e bioquímica de oxigênio. Além disso, o custo da planta foi estimado e foi demonstrado ser compatível com empresas de médio e pequeno portes.

2.2.1.1 Tratamento Físico-Químico

Os sistemas de coagulação utilizando polieletrólitos ou floculantes inorgânicos como sais de ferro e alumínio, seguidos de separação por flotação ou sedimentação, apresentam elevada eficiência na remoção de material particulado, porém a remoção de cor e de compostos dissolvidos é deficiente (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002; SELCUK, 2005). O resultado depende do tipo de corante, composição, concentração e fluxo de produção do rejeito. Para se obter alta eficiência, utiliza-se um excesso de polieletrólitos os quais

representarão outro tipo de resíduo que permanecerá no rejeito (DELLAMATRICE; MONTEIRO; BALAN, 2008).

As técnicas de adsorção têm se baseado na remoção do corante através da passagem do efluente por carvão ativado, sílica gel, bauxita, resinas de trocas iônicas, entre outros materiais, como lascas de madeira, turfa e bentonita, e ainda é um dos processos mais utilizados (KARGI; OZMIHCI, 2004; ROBINSON et al., 2001). Em geral, consistem em método lento, não econômico, porém efetivo principalmente para rejeitos de menor volume. Uma desvantagem deste sistema é que a superfície química do carbono possui cargas positivas, o que restringe a adsorção de corantes catiônicos (DELLAMATRICE; MONTEIRO; BALAN, 2008). Por ter um custo elevado devido à dificuldade na recuperação destes adsorbentes, os pesquisadores têm buscado materiais alternativos mais eficientes e econômicos, tais como talo de girassol (SUN; XU, 1997), casca de eucalipto (SALIBA et al., 2002), bagaço de cana-de-açúcar (CHANDRAN; SINGH; NIGAM, 2002), quitosana (UZUN, 2006) e quitina (LONGHINOTTI et al., 1998), dentre outros. Mahamoued (2010), em trabalho recente, propõe a utilização da combinação de pó de forno de cimento com carvão ativado em proporção de 1:1 v/v. Esta combinação permitiu uma maior eficiência de tratamento comprovada pelas análises de Carbono Orgânico Dissolvido (COD), turbidez e cor antes e após o tratamento do efluente têxtil, com um custo menor de recuperação.

Embora o carvão ativado seja o material sorbente mais popular e extensamente utilizado, processos de separação molecular fundamentados na utilização de membranas como ultrafiltração e osmose reversa têm sido propostos. Estas técnicas permitem a remoção de moléculas de corantes com dimensão suficientemente grande para serem retiradas pelo sistema. Mesmo este sendo muito eficiente, o custo é muito alto, além da limpeza das membranas serem difíceis. A grande vantagem deste sistema é permitir a reutilização da água no processo industrial (KIM et al., 2004).

Um processo bastante utilizado é a ozonização, a qual promove a clivagem das moléculas através da ação oxidante do ozônio. A oxidação pode ocorrer de forma direta, através da reação do ozônio com as moléculas orgânicas, ou de forma indireta, através da reação da hidroxila que é gerada pela decomposição do ozônio (WANG et al., 2003).

A utilização de mais de um tipo de tratamento pode aumentar a eficiência do sistema, já que estes produtos não são degradados pelos sistemas biológicos convencionais. Assim, a combinação de tratamentos pode aumentar significativamente a degradação. Muitas indústrias têm utilizado o sistema físico-químico de precipitação – coagulação seguido de tratamento biológico por lodo ativado, tendo esta combinação demonstrada ser eficiente na remoção de

80% de carga de corantes (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002). O grande problema desta associação de técnicas está relacionado com o acúmulo de lodo, que se torna crítico, uma vez que o teor de corantes adsorvido é bastante elevado, impedindo qualquer possibilidade de reaproveitamento. Por todos estes motivos, o estudo de novas alternativas para o adequado tratamento de efluentes deve ser considerado como uma prioridade dos profissionais que atuam nesta área de trabalho.

2.2.1.2 Tratamento Biológico

Dentre as opções mais econômicas e viáveis para o tratamento dos efluentes coloridos, os sistemas biológicos se apresentam como os mais práticos e de baixo custo. A grande motivação de todos os pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação pode ser expressa pela busca contínua de microrganismos versáteis, capazes de degradar de maneira eficiente um grande número de poluentes a um baixo custo operacional. Na prática, é sabido que isto é muito difícil, principalmente em função da diversidade, concentração e composição de espécies químicas presentes em cada efluente (MEDEZ-PAZ; OMIL; LEMA, 2005).

A literatura é abundante em relação à descoloração de efluentes contendo corantes do tipo azo pela ação microbiana. Inicialmente ocorre redução ou clivagem da ligação azo, anaerobicamente, resultando em compostos incolores ou aminas aromáticas (KODAM et al., 2005). As aminas aromáticas por sua vez são bastante estáveis em ambientes anaeróbicos e sua completa mineralização ocorre apenas sob condições aeróbicas (MENEZ-PAZ; OMIL; LEMA, 2005). Assim para superar esta problemática, muitos pesquisadores têm utilizado duas fases no processo de descoloração de azo corantes (O' NEILL et al., 2000).

Neste processo, a remoção do grupo azo ocorre sob condições anaeróbicas, enquanto os compostos aminados resultantes são bons substratos para degradação aeróbica (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003). Portanto para muitos autores é aconselhável o uso de culturas mistas para obtenção de uma descoloração eficiente dos corantes do tipo azo (HE; HU; LI, 2004). Segundo Forgacs, Cserháti e Oros (2004), a utilização de consórcios microbianos oferece consideráveis vantagens quando comparados ao uso de culturas puras, visto que os consórcios podem atacar os corantes em diversas posições ou podem, ainda, usar os produtos de degradação produzidos por uma dada espécie, em uma degradação adicional. Dentre os microrganismos mais promissores encontram-se os fungos lignolíticos.

A utilização de bactérias, como *Pseudomonas* sp. e *Sphingomonas* sp. têm sido reportadas na degradação de corantes (ZISSI; LYBERATUS; PAVLOU, 1997). Estes

microrganismos são particularmente úteis para degradação de azocorantes, pois tem a capacidade de realizar a clivagem redutiva nas ligações azo deste tipo de composto, fato este que geralmente está associado à enzima azoredutase (MACHUCA; AOYAMA; DURAN, 1999). Estudo realizado por Oses et al. (1998) mostra resultados muito interessantes com alguns fungos e bactérias produtoras de moléculas com atividade mimética de fenoloxidase e capazes de realizar a descoloração de efluentes e a degradação de compostos recalcitrantes.

A utilização de coculturas também é relatada como uma estratégia para o tratamento de efluentes têxteis. Machado, Matheus e Bononi (2005) verificaram uma maior eficiência de descoloração de um efluente sintético constituído por dez corantes quando os fungos *Trametes villosa* e *Pycnosporus sanguineus* formaram uma cultura mista. Gou et al. (2009), aumentaram a eficiência do fungo *Penicillium* sp. em adsorver o corante vermelho reativo brilhante X 3B quando este foi inoculado em um meio levemente ácido junto com a bactéria *Sphingomonas xenophaga*. A descoloração do corante azo ocorreu em condições de anaerobiose e após adição de surfactantes.

2.2.1.2.1 Bactérias Degradadoras de Corantes

Assim como os fungos, as bactérias também têm sido utilizadas na degradação de corantes. Estes microorganismos são particularmente úteis para a degradação de azocorantes, pois apresentam a capacidade de realizar a clivagem redutiva das ligações azo deste tipo de composto (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002).

O metabolismo de compostos aromáticos por bactérias tem sido bem documentado. Entre os gêneros mais comuns observados, pode-se citar *Achromobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., entre outros (BARBIERI, 1997). Ainda que diversos autores tenham demonstrado a habilidade de alguns fungos na degradação de corantes têxteis, a descoloração por bactéria ocorre rapidamente e com elevada taxa de degradação. Acredita-se que pelo menos dois mecanismos estejam envolvidos na degradação de azocorantes por bactérias. O primeiro seria a transferência direta de elétrons para os azocorantes que atuariam como aceptores finais de elétrons durante o catabolismo bacteriano de produção de ATP; já o segundo seria uma redução na molécula do azo corante por produtos finais do catabolismo bacteriano não relacionado a produção de ATP (PEARCE; LLOYD; GUTHERIE, 2003). Outro possível mecanismo de degradação de azocorantes por bactérias envolveria a redução das ligações azo por compostos inorgânicos, como Fe^{2+} ou H_2S , formados como produtos finais de certas reações anaeróbicas (KUDLICH et al., 1997).

Segundo Parales e Haddock (2004) as reações realizadas pelos microrganismos possuem um papel chave na biocatalização e na biodegradação de poluentes orgânicos. O recente seqüenciamento do genoma de bactérias relevantes ao meio ambiente tem mostrado um potencial metabólico que pode ser explorado para propósitos úteis, por exemplo, a oxigenase e outras enzimas biodegradativas podem ser usadas para a produção de compostos industriais. Algumas bactérias são capazes de imobilizar metais pesados tóxicos que contaminam aquíferos, ilustrando dessa forma o potencial dos microrganismos na remoção ou absorção de poluentes.

De acordo com Stolz (2001) as pesquisas nos últimos anos têm revelado diversas bactérias com a capacidade de descolorir azocorantes, como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Aeromonas* sp., *Klebsiella pneumoniae*. Trabalhos como o de Libra et al. (2004), por exemplo, verificaram que 65% da cor de um corante reativo foi removida através de um processo de tratamento biológico, utilizando-se duas fases, uma anaeróbica e outra aeróbica.

Sharma et al. (2004) conseguiram em seu trabalho a descoloração de 91 % do corante têxtil ácido violeta-17 utilizando também um consórcio de cinco bactérias. Silva (2008) constatou o potencial de uma bactéria isolada de ambiente poluído por petroderivados, para descolorir efluente gerado por lavanderias de jeans no município de Caruaru – PE em um processo de cometabolismo, utilizando a glicose como fonte de carbono associada com o corante, em pH 5. Mais recentemente, Dawkar et al. (2010) relataram a descoloração do corante industrial laranja T4LL por *Bacillus* sp. sob condições estáticas e anóxicas. Além disso, os autores também acompanharam ao longo da descoloração a produção das enzimas LiP, tirosinases e redutases que indicaram a degradação do corante. Parshetti et al. (2010) descreveram a degradação do corante laranja metil pela bactéria *Kocuria rosea* MTCC 1532. Os autores relataram que o processo envolvia a produção de enzimas redutases (NADH-DCIP e azoredutases), nas quais estavam envolvidas na degradação, sob condições estática, pH 6,8 e 30°C com o meio contendo extrato de levedura.

2.2.1.2.2 Fungos Degradadores de Corantes

Fungos basidiomicetos constituem o único grupo de organismos capazes de mineralizar a lignina, que devido a sua complexidade estrutural, deve ser degradada por sistema enzimático não específico. Sabe-se que, inicialmente, a lignina é despolimerizada por enzimas extracelulares que constituem o complexo enzimático lignolítico do basidiomiceto, no qual incluem peroxidases como LiP e MnP e fenoloxidasas, como Lacases, bem como

oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio. Conseqüentemente, outros compostos aromáticos, incluindo alguns xenobióticos, são altamente susceptíveis à degradação causada por este grupo de microrganismos (ZHOU; ZIMMERMANN, 1993).

Ao longo de décadas, pesquisadores têm aumentado o interesse no versátil fungo de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium* por sua capacidade de mineralizar, além da lignina, pelo menos parcialmente e em alguns casos completamente, uma variedade de poluentes resistentes a degradação. O sistema lignolítico deste fungo é representado principalmente pelas enzimas peroxidase da lignina (LiP) e peroxidase dependente de manganês (MnP), as quais são produzidas em meios contendo fontes limitadas de carbono e nitrogênio. Estas enzimas têm a capacidade de despolimerizar a lignina e uma grande variedade de outros compostos devido à inespecificidade do sistema enzimático lignolítico (MANIMEKALAI; SWAMINATHAN, 2000).

Especialmente para efluentes têxteis, alguns estudos têm sido realizados explorando a capacidade deste fungo de degradar e mineralizar corantes. Spadaro, Gold e Renganathan (1992), demonstraram que *P. chrysosporium* foi capaz de mineralizar alguns azocorantes, sendo a capacidade de descoloração diretamente relacionada com a natureza dos grupos substituintes dos anéis aromáticos. A secreção de enzimas por estes organismos também tem sido amplamente relatada. Ferreira et al. (2000) destaca a produção da enzima LiPeroxidase pelo fungo *P. chrysosporium* quando este organismo esteve envolvido na degradação por desmetilação do corante azul de metileno. Chader e Arora (2007), obteve 100% de descoloração de diferentes corantes pelo fungo *P. chrysosporium* BKM –F- 1767 e pelo extrato enzimático livre de células deste mesmo fungo.

A utilização de outros fungos como, por exemplo, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor* para degradação de corantes também vem sendo estudada (RODRIGUEZ; PICKARD; VAZQUEZ-DUHALT, 1999). Estes fungos caracterizam-se por serem bons produtores de lacase, uma fenoloxidase dependente de cobre. Esta enzima lignolítica tem a capacidade de catalisar reações de desmetilação, que é um passo inicial e importante em processos de biodegradação de cadeias poliméricas, com subseqüente decomposição de macromoléculas de lignina pelo rompimento de anéis aromáticos e ligações Ca - Cb em estruturas fenólicas. Em processos de oxidação de muitos compostos (principalmente de compostos fenólicos) a lacase apresenta uma grande especificidade para um grande número de compostos xenobióticos e efluentes industriais por não ser muito específica (DURAN; ESPÓSITO, 2000). Yamanaka et al. (2008) detectaram a produção da enzima lacase pelo

fungo *Trametes villosa* CCB 176 durante todo o período de cultivo do fungo independente da fase de crescimento.

Outras enzimas do aparato lignolítico vem sendo estudadas. Yamanaka et al. (2008) relataram um aumento na produção de Manganês Peroxidase (MnP) quando o meio foi suplementado por óleo vegetal suplementado com surfactante. Gomes et al. (2009) relataram a produção de 8000U/L da enzima LiP e 7000U/L da enzima MnP pelo fungo *Lentinus* sp., enquanto que o fungo *Coriolopsis byrsina* produziu 2000U/L da enzima lacase. Os autores atribuem esta alta produção enzimática a adição do nitrogênio no meio.

Fungos não pertencentes ao grupo dos basidiomicetos também tem demonstrado capacidade de produzir enzimas de interesse biotecnológico. Bonugli-Santos et al. (2010) relataram a capacidade de fungos isolados de ambiente marinho em produzir enzimas lignolíticas. Os fungos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 e *Mucor racemosus* CBMAI 847 demonstraram ser bons produtores das enzimas lacase, LiP e MnP quando cultivados em meio extrato de malte. Quando esses mesmos fungos foram cultivados em meio mineral contendo glicose e farelo de trigo, não se detectou a produção de LiP nem de MnP, entretanto houve um aumento na produção de lacase. Uma outra alternativa para tratamentos biológicos de efluente seria a utilização de enzimas produzidas por fungos. Khouni, Marrot e Amar (2010), otimizaram o processo de descoloração de dois corantes industriais por enzima lacase extraída do fungo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado. Os autores obtiveram melhores resultados de descoloração dos corantes quando o processo foi conduzido a 43°C, pH 6 e com concentração enzimática de 222U/L.

Cento e quinze fungos foram selecionados pela capacidade de degradar corantes com ligações azo e grupos antraquinonas utilizando meio sólido e líquido (JAROSZ-WILKOŁAZKAA et al., 2002). Dentre os mecanismos de descoloração do meio, pode-se destacar a adsorção, onde o fungo retira o corante do meio, absorvendo-o para o interior da sua célula ou metabolizando-o em nível de parede celular.

Muitos trabalhos têm sido relatados nesta linha, Chulhwan et al. (2004), selecionaram dentre dez fungos aqueles com potencial para degradar e/ou adsorver alguns tipos de corantes, e entender o mecanismo utilizado por estes organismos. O potencial de adsorção de corante pela biomassa inativada também vem sendo testada como alternativa para tratamento de efluentes de indústria têxtil. Os fungos *Cunninghamella elegans*, *Rhizomucor pusillus* and *Rhizopus stolonifer*, tiveram sua biomassa inativada em autoclave e seus potencial de

descoloração testados em meios de cultivo distintos contendo uma alta concentração de corantes, sendo demonstrado descoloração de 100% após 24h (PRIGIONE et al., 2008).

Devido ao reconhecido aparato enzimático, outra forma de analisar a eficiência do fungo de descolorir o efluente é investigar a produção das enzimas lignolíticas pelo fungo e para isto diversas metodologias vêm sendo utilizadas. Yamanaka et al. (2008) investigando a presença de duas enzimas lignolíticas, lacase e MnP além da atividade de peroxidases total, pelo fungo *Trametes villosa* constataram uma excelente produção da enzima lacase estimulada pela presença de cobre no meio de cultivo nos primeiros dias do crescimento do fungo, enfatizando assim a importância de melhorar a constituição do meio e as condições de cultivo para a produção das enzimas do complexo ligninolítico.

Outros fungos do grupo dos basidiomicetos possuem capacidade de produção dessas enzimas durante seu metabolismo. Regina et al. (2008), estudou a capacidade do fungo *Lentinula edodes* de produzir as enzimas do aparato lignolítico sob condições estáticas e agitadas, em biorreator. Os autores verificaram uma boa atividade das enzimas peroxidase e MnP sob condição de cultivo estática a 25°C. Embora a agitação seja uma excelente condição para produção enzimática, alguns fungos apresentam melhores resultados quando submetidos a condições estáticas. Niebisch et al. (2010) relataram a capacidade do fungo basidiomiceto *Lentinus crinitus* de degradar o corante têxtil azul reativo 220. As condições ótimas de descoloração foram obtidas em meio contendo glicose e oxalato de amônia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Além disso, os autores constataram a produção da enzima lacase, sugerindo a biodegradação do corante pelo fungo.

Além dos fungos do grupo dos basidiomicetos, outros grupos de fungos não lignolíticos vêm sendo estudado quanto a sua capacidade de descolorir efluentes e degradar corantes.

Alguns autores sugerem que estes fungos possuem a capacidade de descolorir o efluente através do mecanismo de adsorção, onde o fungo retira o corante do meio aquoso na medida em que aumenta sua biomassa por atração. Porém alguns trabalhos sugerem a produção de enzimas que atuam na degradação desses compostos como o realizado por Shedbalkar, Dhanve e Jadhav (2008), onde estudando o mecanismo de degradação do corante azul de algodão, amplamente utilizado na indústria de tecido, constatou que o fungo *Penicillium ochrochloron* possui a capacidade de degradar o corante em sulfonamida e trifenilmetano na presença das enzimas envolvidas no processo de descoloração, bem como a ação de enzima extracelular lacase. Parshetti et al. (2007) relata a descoloração do corante azul reativo 25 em vinte dias de processo em condições agitadas, demonstrando que com a

presença da glicose o fungo começa a descoloração em quatro horas através do mecanismo de adsorção do corante pela biomassa.

Alguns escalonamentos já estão sendo relatados utilizando fungos em processos de tratamento de efluentes. Anastasi et al. (2010), obtiveram bons resultados de tratamento de efluente têxtil utilizando o fungo *Bjerkandera adusta* em reator de leito fixo. Após otimização do processo e da produção das enzimas peroxidase dependente e independente do manganês, a total descoloração do efluente foi obtida após dez ciclos do efluente e com o fungo imobilizado.

2.3 PROBLEMAS TOXICOLÓGICOS ASSOCIADOS AOS CORANTES

Embora seja bastante expressiva a quantidade de efluente gerado pelas indústrias ao redor do mundo, ainda são escassas as informações disponíveis sobre o impacto ambiental causado por esses rejeitos em ambientes aquáticos. Sabe-se que a poluição dos corpos hídricos com esses compostos causa alterações nos ciclos biológicos, levando a um desequilíbrio, podendo causar toxicidade aguda e crônica nas comunidades ali presentes (BANAT et al., 1996). É importante ressaltar que os riscos crônicos dos corantes a saúde do homem e do ambiente estão relacionados às etapas de biotransformação, ou seja, a rota metabólica que é empregada para degradar essas substâncias. Metabolizadas por enzimas específicas, os corantes podem gerar compostos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, como por exemplo, aminas aromáticas, toluidinas, benzidinas e radicais ativos (ZANONI; CARNEIRO, 2001). Os principais riscos toxicológicos dos corantes sintéticos ligados a saúde estão intrinsecamente relacionados à forma de aplicação e tempo de exposição, ou seja, ingestão oral, sensibilidade da pele e das vias respiratórias, entre outros fatores (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Em todo o mundo, órgãos controladores de poluição como o “European Environmental Agency” (EEA) e programas das nações unidas como o “United Nations Environment Programme” (UNEP) ressaltam que para a maioria dos mais de mil produtos químicos manufaturados e usados não estão disponibilizados dados de toxicidade e ecotoxicidade que avaliem seus riscos (PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004).

Dentre as diversas classes de corantes, os azos são aqueles que apresentam uma maior toxicidade aguda, onde a dose letal (LD₅₀) seria menor que 5g/Kg. Apenas os corantes catiônicos teriam esta mesma toxicidade (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Estudos biocinéticos têm mostrado evidências de que corantes azo solúveis em água, se oralmente administrados, são metabolizados pela microbiota intestinal e excretados mais rapidamente do que os compostos menos solúveis. Por outro lado, os corantes insolúveis em água poderiam ser biodegradados no fígado, formando conjugados solúveis em água que seriam então transportados para o intestino onde ficariam sujeitos a redução por bactérias da microbiota normal. Assim, existe grande possibilidade de que nem o corante ou seus metabólitos mostrem potencial para bioacumulação. Entretanto, os riscos crônicos destes tipos de corantes e de seus intermediários levam em consideração suas propriedades carcinogênicas e mutagênicas (CLARKE; STEINLE, 1995).

Nesta classe de corantes, tem atraído maior atenção os corantes contendo a função azo-aromático como cromóforo, os quais constituem o maior grupo de corantes orgânicos produzidos mundialmente. A biotransformação destes corantes pode ser responsável pela formação de aminas, benzidinas e outros intermediários com potencialidade carcinogênica. Destes, pelo menos 3.000 corantes do tipo azo comerciais foram catalogados como cancerígenos e não têm sido mais produzidos. Entretanto, a literatura especializada mostra que devido a problemas econômicos, países menos desenvolvidos como Brasil, México, Índia e Argentina, não têm cessado completamente a produção de alguns corantes à base de benzidinas (e.g. Congo Red 14) de grande potencialidade econômica (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os quatro principais mecanismos de biotransformação envolvendo este tipo de corante são baseados principalmente em modificações da molécula devido à processos de oxidação, hidrólise, conjugação e redução, cuja velocidade de degradação é acelerada através de processos catalíticos enzimáticos (ZBAIDA, 1995).

Reações tais como clivagem da ligação azo e formação de aminas nos processos de redução, hidroxilação da molécula ou parte dela em processos de oxidação, podem ocasionar o aparecimento de substâncias tóxicas rapidamente, uma vez que estas enzimas contribuem na degradação, sendo incapazes de diferenciar se os produtos gerados são nocivos ou não ao organismo (HUNGER, 1994).

Embora, no Brasil, exista uma gama de normas e regulamentações para controlar o descarte e tratamento de rejeito colorido, efluentes provenientes da indústria de corantes ou de processos envolvendo tingimento têxtil, não tratados convenientemente antes de serem lançados em águas naturais, capazes de atingir reservatórios e estações de tratamento de água é a preocupação ecológica mais emergente. A abundância de normas e regulamentações desenvolvidas ao longo dos anos nos Estados Unidos da América (EUA) para controle de

rejeitos coloridos tem criado um grande impacto econômico na indústria de corantes e seus correlatos.

Relativamente, encontra-se na literatura muito pouca informação sobre o impacto desses rejeitos na qualidade da água e em ecossistemas aquáticos. Alguns autores têm afirmado que devido a alta diluição, poucos corantes solúveis poderiam causar efeitos ecológicos agudos em concentrações em que não sejam visíveis à olho nu. No entanto, dependendo do tipo de corante e do seu modo de aplicação, a etapa final da tintura pode contribuir significativamente para o lançamento de rejeitos contendo misturas de substâncias químicas, com composição variável (corante, umectante, anti-espumante, eletrólitos, dispersantes, etc.), utilizadas nas etapas de montagem e fixação (BECKMANN; SEWKOW, 1991).

Adicionalmente, alguns problemas envolvendo a classe de corantes reativos são preocupantes, principalmente se considerarmos que este grupo de corantes constitui-se em um dos mais utilizados no Brasil para a tintura de algodão. Esta classe de corantes caracteriza-se por apresentar grupos quimicamente ativos capazes de reagir covalentemente com a celulose na fibra têxtil. Esta reação é estendida na bioquímica para purificação de proteínas pela sua comprovada reação com moléculas biologicamente importantes. Deste modo, resíduos deste corante poderiam ser altamente nocivos quando presentes em qualquer organismo vivo. A inativação destes rejeitos normalmente é realizada através de reações de hidrólise de seus grupos funcionais, que torna o corante quimicamente inerte. Alguns autores têm demonstrado (ABETA; YOSHIDA; IMADA, 1984) que estes compostos, na forma não hidrolisada, apresentam alta estabilidade hidrolítica em meio neutro, permitindo um tempo de vida de cinquenta anos em ambientes aquáticos, causando expressiva preocupação quanto aos aspectos ecológicos (MATSUI; SHIBATA; TAKASE, 1984).

A aplicação e manufaturamento de outros corantes têxteis à base de enxofre, de complexantes metálicos, do tipo disperso e outros com elevada insolubilidade, embora produzam rejeitos mais facilmente removíveis, muitas vezes envolvem substâncias secundárias que demonstram consideráveis problemas ambientais devido à natureza tóxica destes materiais. No entanto, uma análise geral dos estudos encontrados na literatura sobre estes efluentes coloridos tem demonstrado que é necessário aprender muito mais sobre o transporte e a transformação destes compostos (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Devido a toxicidade desses corantes, aliado a grande quantidade dessas substâncias nos efluentes oriundos de indústrias têxtil, se faz necessário um monitoramento mais efetivo quanto a qualidade do rejeito a ser lançado nos corpos hídricos.

2.3.1 Sistema de Teste com *Allium cepa*

O aumento da descarga de produtos químicos perigosos no ambiente tem afetado o balanço dos ecossistemas naturais e conseqüentemente chamado a atenção de muitos pesquisadores e agências governamentais preocupadas com a saúde dos organismos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Dentre os danos causados aos organismos pela exposição aos agentes químicos, os efeitos genotóxicos e mutagênicos são os que causam maior preocupação, devido a capacidade de induzir erros no material genético. Isto pode levar a problemas sérios na saúde do indivíduo, podendo atingir gerações futuras, haja vista que estas alterações podem ser irreversíveis (RIBEIRO, 2003). Portanto, faz-se necessário identificar compostos que reajam com o DNA e permitam o monitoramento da qualidade ambiental, através do desenvolvimento de ensaios genotóxicos e mutagênicos com uma ampla variedade de organismos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Os vegetais superiores tem características que os fazem excelentes modelos genéticos para medir poluentes ambientais, sendo frequentemente usados em estudos de monitoramento. Todavia, esses fatores não são apenas devido a sensibilidade para detectar agentes mutagênicos em diferentes ambientes, mas principalmente, a possibilidade de identificar pelo teste diversas alterações genéticas, com uma ampla faixa de pontos de mutação nas alterações cromossômicas em células de diferentes tecidos tais como raízes, folhas e pólenes. Atualmente, dentre as espécies mais utilizadas como organismos testes no biomonitoramento ambiental se destacam: *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* and *Hordeum vulgare* (GRANT, 1994).

Dentre as espécies mais utilizadas como sistemas teste, *A. Cepa* se destaca pela facilidade de se observar danos nos cromossomos e alterações nos ciclos celulares, pelo fato de que o cromossomo deste vegetal é grande e em número reduzido ($2n=16$). Por isso, este sistema teste tem se mostrado eficaz na detecção de químicos ambientais (FISKESJO, 1985).

O uso de *A. Cepa* como sistema teste foi introduzido por Levan, em 1938, demonstrando distúrbios no fuso mitótico devido ao uso da colchicina. Mais tarde, o mesmo autor demonstrou que a utilização de diferentes soluções de sais orgânicos induz diversos tipos de alterações cromossômicas em células meristemáticas de raiz de *A. cepa* (LEVAN, 1945). Desde então, diversas modificações no teste com *A. cepa* vem sendo feito para uma melhor compreensão dos resultados e utilização da técnica para monitoramento ambiental (GRANT, 1982).

A primeira adaptação foi feita por Fiskesjo em 1985, objetivando a utilização do sistema teste para monitoramento ambiental. Com este propósito, o autor propôs modificações que permitiram a avaliação de compostos solúveis e não solúveis em água para monitoramento de misturas complexas no ambiente. Desde então, inúmeros trabalhos têm sido realizados com esse organismo-teste a fim de se obter uma resposta confiável e rápida para a avaliação da contaminação ambiental (MAZZEO, 2009).

Segundo Leme e Marin-Morales (2009), são poucos os trabalhos na literatura que relatam a utilização de vegetais superiores como sistemas testes para avaliação dos perigos dos corantes que compõem os efluentes têxteis. Alguns autores, porém, relatam a utilização de *A. cepa* como sistema teste. Sudhakar, Ninge-Gowda e Venu (2001), avaliando alterações cromossômicas causadas por efluente de indústria têxtil com sistema *A. cepa*, verificou a diminuição do índice mitótico, assim como a indução de diversas anomalias mitóticas em células de raízes expostas ao efluente testado, demonstrando assim seu potencial mutagênico.

Outro relato da utilização do sistema *A. cepa* como teste foi o de Carita e Marin-Morales (2008), que avaliaram diversas concentrações de efluente lançado em um corpo hídrico. Os autores constataram que diferentes concentrações do efluente podem causar várias alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*.

Relatos recentes demonstram que sistemas-testes usando *A. cepa* estão sendo introduzidos com maior frequência nos trabalhos experimentais. Jadhav et al. (2010), utilizando o sistema *A. cepa* como teste para biomonitoramento, constatou a eficiência na utilização de um consórcio bacteriano para remoção de metais pesados e corantes em efluente têxtil. Os autores verificaram a diminuição da genotoxicidade e citotoxicidade quando utilizaram o teste no efluente não tratado e após o biotratamento. O monitoramento da qualidade da água profunda e de superfície utilizando o sistema *A. cepa* foi realizado por Radic et al. (2010). Os autores constataram um alto índice de alterações cromossômicas tanto em águas profundas como em águas superficiais de um rio na Croácia, demonstrando o seu potencial genotóxico.

A espécie *A. cepa* tem sido considerada pela “Royal Swedish Academy of Science” (FISKESJO, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982) como um material-teste padrão para detecção de possíveis danos genéticos resultantes da poluição ou do uso de químicos ambientais. A utilização desta espécie como organismo-teste também foi validada em estudos de colaboração internacional, realizados entre o “United Nations Environmental Program” (UNEP), “World Health Organization” (WHO) e “US Environmental Protection

Agency” (USEPA), que provaram a eficiência deste organismo na detecção de danos genéticos ocasionados pela ação de poluentes ambientais (GRANT, 1999).

3 CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTE DA INDÚSTRIA TÊXTIL

RESUMO

Este artigo descreve a caracterização de efluente de indústria têxtil localizada no município de Caruaru – PE, Brasil de acordo com a sua Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), pH, compostos fenólico e estrutura molecular do corante. Os valores de DBO e DQO estão de acordo com a legislação brasileira, assim como o pH se encontra em torno da neutralidade, podendo ser recomendado o tratamento biológico e físico-químico. Foi detectada a presença de compostos fenólicos no efluente total. A análise por espectrometria de Massa (ESI-MS) do efluente indicou que a cor azul era devido ao corante índigo.

INTRODUÇÃO

Corantes são importantes produtos industriais sendo amplamente utilizado nas indústrias têxtil, gráfica, fotográfica e como aditivo na indústria do petróleo (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002). Sua classificação é baseada na estrutura química e no campo de aplicação. Em geral, são compostos orgânicos hidrossolúveis capazes de penetrar em determinados objetos fornecendo cor aos mesmos (HOLCAPEK; VOLNA; VANERKOVA, 2007). Devido ao desenvolvimento de novos corantes com maior compatibilidade ambiental, tem sido desenvolvidas metodologias para a identificação e caracterização, tanto dos corantes, como dos efluentes têxteis gerados nos setores produtivos ligados à indústria têxtil (RAFOLS; BARCELO, 1997). Estes compostos e seus derivados, uma vez identificados, são particularmente susceptíveis de serem separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), especialmente em fase reversa, e de serem detectados na região ultravioleta e/ou regiões visíveis do espectro (SACHIN; NAYAR, 2008). Embora a maioria dos corantes tenha a propriedade de absorver luz na região ultravioleta do espectro sendo detectado em um único comprimento de onda, a introdução e utilização de detectores de arranjo de diodos (DAD) para análise de corantes é uma alternativa para a detecção em diversos comprimentos de onda. Como resultado, as moléculas de corantes podem ser caracterizadas em termos de tempo de retenção da coluna de HPLC, bem como suas características espectrais (HE et al., 2006). Apesar de a Ressonância Magnética Nuclear (MNR) ser a técnica mais utilizada para caracterizar compostos orgânicos, quase nunca é aplicada na análise de corantes têxteis, por

não ser sensível a pequenas quantidades de material disponível para análise. A segunda ferramenta mais valiosa de análise, a espectrometria de massa (MS), só se tornou realmente útil para análise de corantes têxteis com a introdução de técnicas de ionização *electrospray* (ESI) será partir de espectrômetros de massas acoplados a sistemas de HPLC. A técnica ESI em MS, desenvolvida em 1985, é um processo de ionização suave que produz íons em abundância com alta sensibilidade a pouca fragmentação. Na ionização por ESI, uma forte corrente elétrica é aplicada ao eluente, o qual emerge de um nebulizador, produzindo um aerosol. Compostos de alto peso molecular são tipicamente medidos como íons com cargas múltiplas. O eluente flui até 1 ml/min embora muitas vezes, é preferível na ionização *electrospray* dividir o fluxo de modo que 100-200 $\mu\text{L}/\text{min}$ de eluente para que entrem no espectrômetro de massas como íons negativos, tornando-se adequado para a análise de corantes azo- sulfonados. O sistema ESI-MS também tem interface com eletroforese capilar de zona (CZE) e HPLC de fase reversa técnicas utilizadas para analisar os corantes azóicos polissulfonados. O efluente proveniente do processo de lavagem do *jeans*, é rico em derivados dos corantes do tipo índigo, sendo necessária uma caracterização dos compostos predominantes nesse tipo de efluente para posterior quantificação e melhor avaliação da eficiência dos tratamentos que venham a ser aplicados. Além da caracterização quanto ao corante presente no efluente, é importante que se utilize parâmetros globais para medição do grau de poluição causado por estes compostos, estes parâmetros são Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), pH entre outros. O presente trabalho visa a caracterização química físico-química do corante índigo presente nos resíduos da indústria têxtil em Pernambuco, Brasil, por análises de caracterização convencionais e por técnicas de cromatografia líquida (HPLC) e espectrometria de massas.

MATERIAL E MÉTODOS

Efluente têxtil

O efluente têxtil consistiu na água de lavagem de máquinas empregadas no processo de descolorção do jeans. A coleta foi realizada diretamente de tanques de estocagem de resíduos da lavanderia *Stomp* no município de Caruaru, PE em vários pontos de um mesmo tanque e em profundidades diferentes (amostra composta). A mistura foi homogeneizada e posteriormente estocada em câmara fria.

Padrão de Corante para comparação direta

O corante índigo Carmin foi obtido comercialmente da empresa Sigma (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA Aldrich).

Caracterização Físico-química do Efluente

Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e pH do Efluente têxtil.

O efluente foi caracterizado físico-quimicamente quanto a Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e pH pela Associação Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP) por meio de metodologia recomendada pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th edition, 1998. O comprimento de onda de absorção máxima do efluente foi determinado por meio do seu espectro de absorção, obtido na faixa visível (400 a 700nm).

Concentração de Fenóis Totais no Efluente

A determinação do teor de fenóis totais presentes na amostra do efluente foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Em um tubo de ensaio contendo 50mL do efluente foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% e 2,0 mL de Na₂CO₃ 7,5%. O branco consistiu em 2,5 mL de Folin-Ciocalteu 10% e 2,0 mL de Na₂CO₃ a 7,5% com 500 µL de água destilada. O tubo de ensaio foi levado a banho-maria a 50°C por 5 min e foi analisado imediatamente após o aquecimento em um espectrofotômetro UV/visível Hewlett Packard - HP-8453E, para a leitura da absorbância a 760 nm. A concentração de fenóis totais foi avaliada através de uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL. A concentração de fenóis totais foi determinada através da equação da reta, equação 7, obtida da curva padrão do ácido gálico.

$$X=(Y-B)/A$$

Onde:

X - Concentração de compostos fenólicos em µg/mL;

Y – Absorbância das amostras a 760 nm;

B – Constante da reta e

A – Coeficiente angular da reta.

A curva padrão deve ser realizada na faixa das concentrações da sua amostra.

Análises por LC - MS/MS

O efluente foi caracterizado quanto à presença do corante em um sistema cromatográfico acoplado a espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) cromatógrafo marca WATERS® modelo 2695, espectrômetro *Micromass Quattro Micro* API. Para isto foi utilizado o corante índigo carmin (Sigma - Aldrich) como padrão para comparação das massas. Para se conhecer o perfil de fragmentação foram injetados 20µL do padrão na concentração de 80µg/L diluído em água ultra-pura, diretamente no espectrômetro de massas (infusão direta), sendo realizada uma varredura inicial na faixa de massa/carga de 440 a 445, para caracterizar a massa do principal fragmento, e a massa do segundo fragmento na faixa de 400 a 465. Posteriormente foi injetado o efluente diluído e realizadas varreduras na mesma faixa de massa/carga utilizada para o padrão, e posteriormente, duas varreduras nas faixas de massa/carga: 215 – 275m/z e 235 - 245m/z, respectivamente, para se confirmar a predominância da massa do corante presente no efluente.

Em ambas as infusões, foram realizadas ionizações no modo ESI.

RESULTADOS

Caracterização Físico-química do Efluente

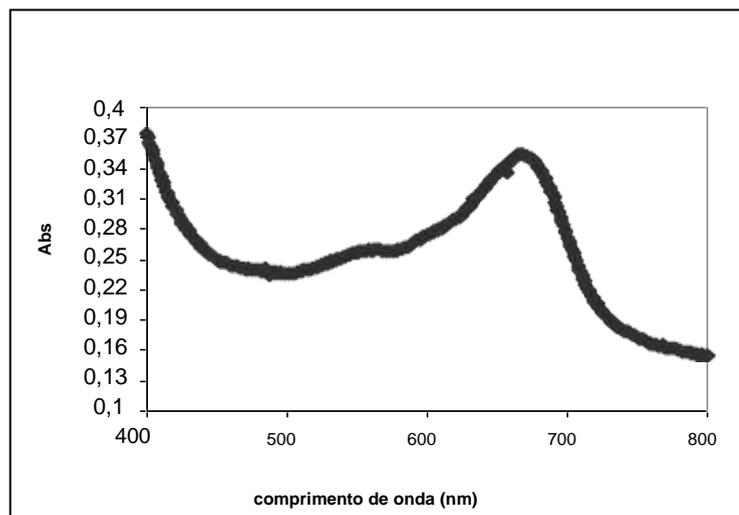
Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e pH do Efluente têxtil.

Após realização da análise físico-química do efluente observou-se valores de pH na faixa da neutralidade. Verificou-se que a relação entre a as demanda química e bioquímica de oxigênio (DQO e DBO, respectivamente) sugerem tratamento aeróbio para o efluente (tabela 1). Após realização do espectro de absorção do efluente observou-se que o comprimento de onda adequado para realização da leitura do efluente foi de 670nm Figura 1.

Tabela 1 – Caracterização físico-química do efluente têxtil coletado no tanque de estocagem de resíduos da lavanderia “Stomp” no município de Caruaru, PE.

PARÂMETROS	RESULTADOS
pH potenciométrico	6,4
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	354mg/L
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	167 mg/L

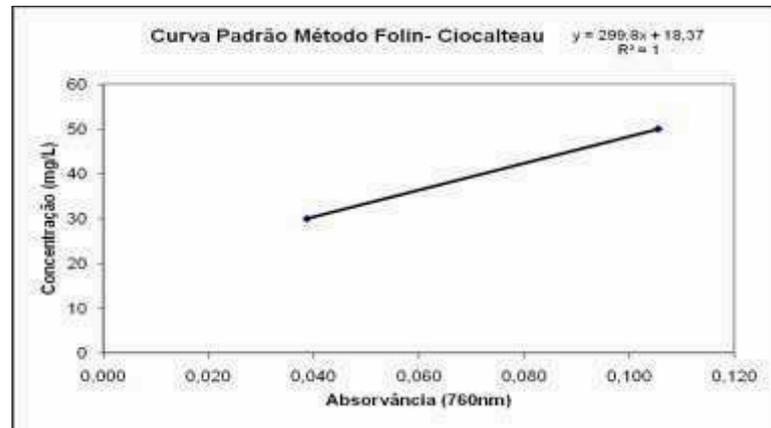
Figura 1 – Espectro de absorção do efluente têxtil coletado no tanque de estocagem de resíduos da lavanderia “Stomp” no município de Caruaru, PE.



Concentração de Fenóis Totais no Efluente

O resultado obtido na determinação de fenóis totais (FT) pelo método Folin-Ciocalteu expressos como equivalentes de ácido gálico em mg/L de efluente podem ser visualizados na figura 2, onde pode-se observar que o efluente em estudo apresenta uma quantidade significativa de compostos fenólicos. Este dado é de extrema importância devido a semelhança estrutural desses compostos com a lignina, substância alvo das enzimas lignolíticas secretadas pelos fungos.

Figura 2 – Detecção de compostos fenólicos presentes no efluente têxtil



Análises em LC - MS/MS

O corante índigo carmin possui massa molar 466.36g/mol. Apresenta em sua estrutura dois grupos de NaSO_3 ligados aos anéis indol, o que o diferencia do corante índigo, que não apresenta átomo de sódio ligado à estrutura principal. A ionização pelo modo ESI⁻ produziu um íon de m/z 442.8 evidenciando a dissociação de um átomo de sódio na ionização (23 unidades de massa) (Figura 3). De acordo ainda com o espectro gerado, o fragmento mais importante a seguir, é o de m/z 420.875, indicando a dissociação do segundo átomo de sódio (diminuição de mais 23 unidades de massa). A figura 4 mostra a pesquisa de um fragmento específico da amostra (fragmento 420,333), que é obtido quando é realizada segunda fragmentação a partir da seleção do fragmento anterior de m/z 442,8.

Figura 3 – Espectro de massa do corante Indigo Carmin após a primeira fragmentação em uma faixa de energia de 400 a 445 m/z .

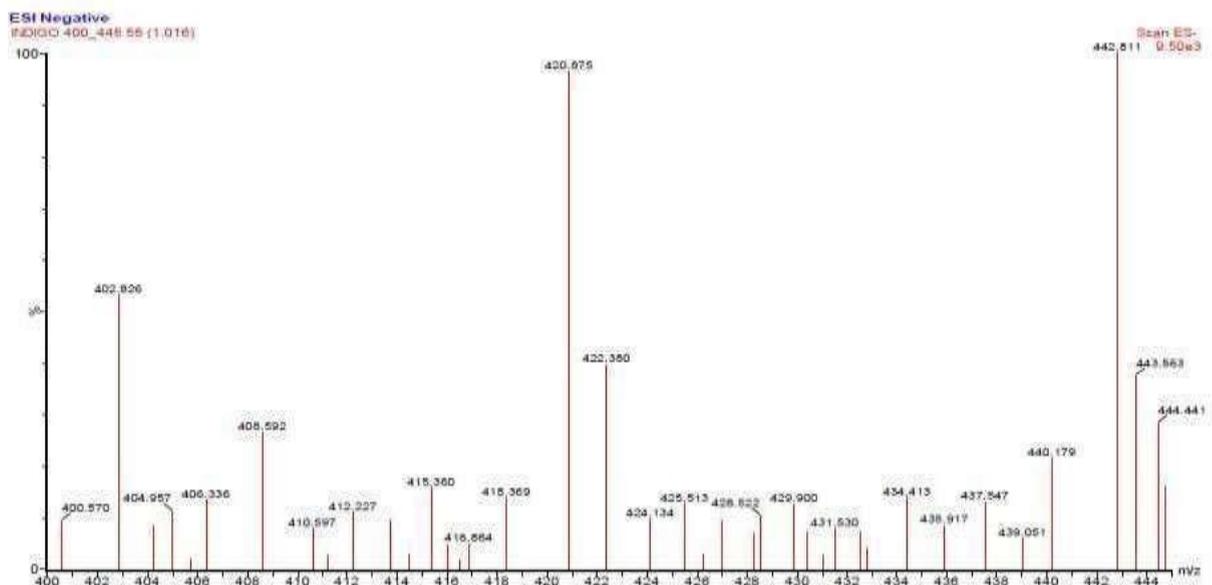
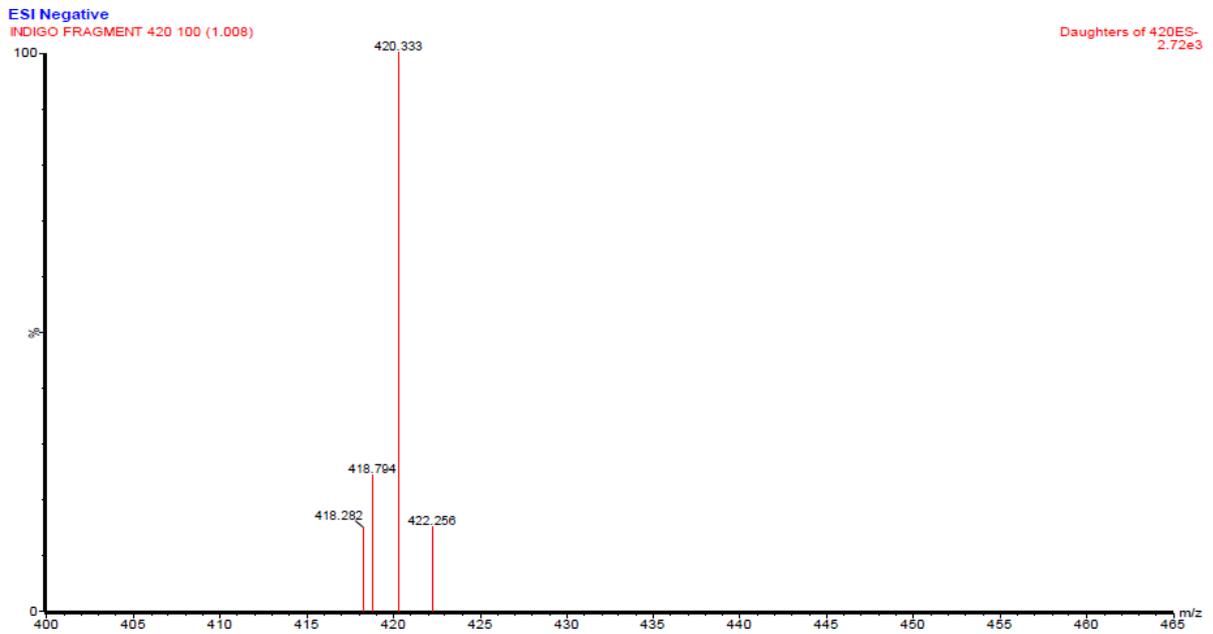


Figura 4 - Espectro de massa do corante Indigo Carmin após a segunda fragmentação em uma faixa de energia de 400 a 465 m/z.



Quando realizada a varredura do efluente têxtil observou-se a predominância do fragmento m/z 260.701, inferior a do indigo carmin o que se confirmou na segunda faixa de varredura como pode ser observado nas figuras 5 e 6.

Figura 5 – Espectro de massa do efluente têxtil após a primeira varredura em uma faixa de 215 a 275 m/z.

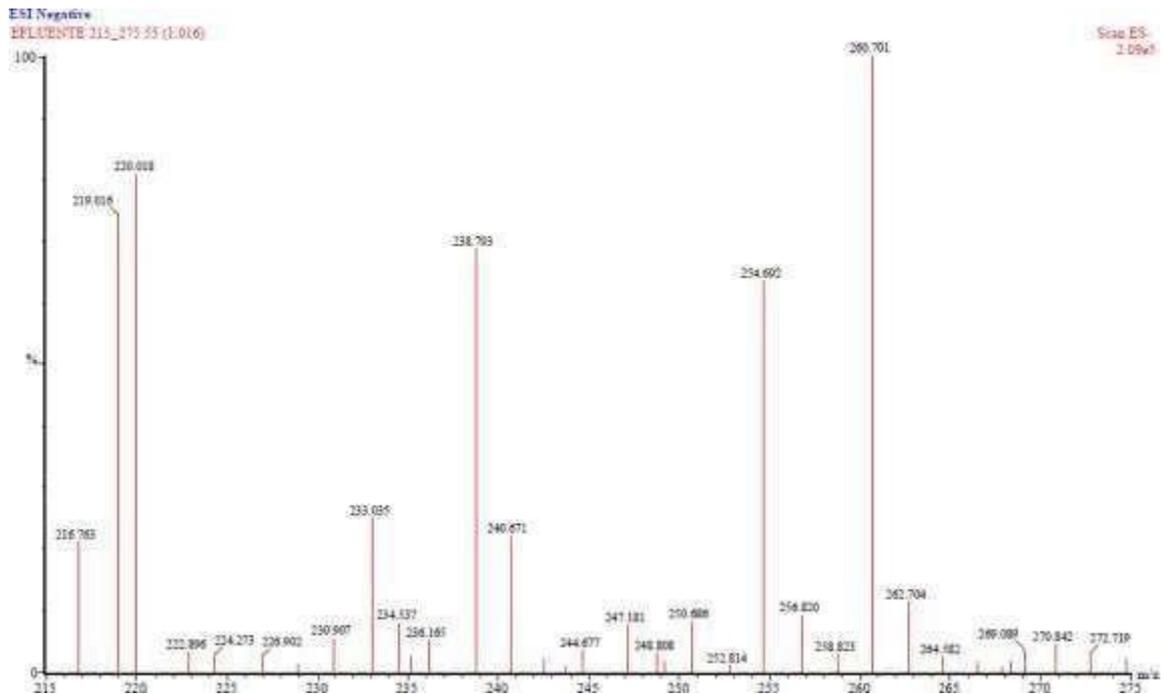
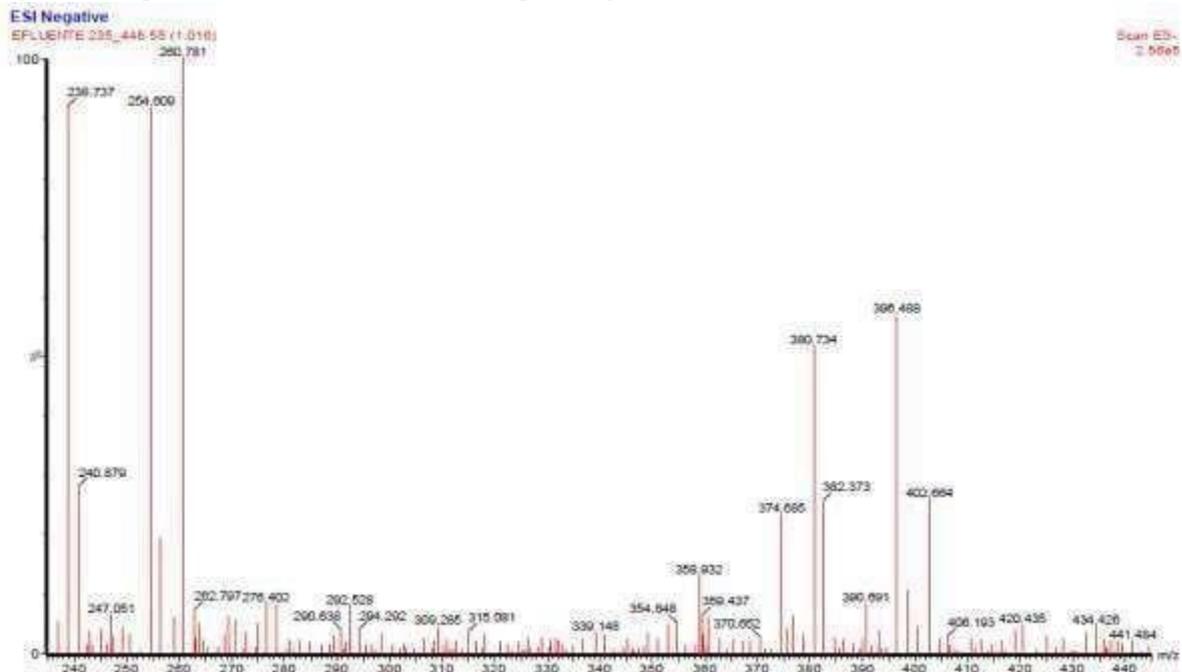


Figura 6 – Espectro de massa do efluente têxtil após a segunda varredura em uma faixa de 240 a 440 m/z.



DISCUSSÃO

De acordo com a legislação brasileira, os rejeitos industriais são regidos pela Resolução nº 357 de 17 de março de 2005, que dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (CONAMA, 2005). O Art. 34 da legislação estabelece que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis: prescritas no parágrafo 1º deste mesmo artigo, onde o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente. Alguns autores, em 2003 realizaram análise físico-química de efluente de indústria têxtil do estado de São Paulo e obtiveram 2.10×10^3 mg/L de Demanda Química de Oxigênio (DQO), 967mg/L de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e pH 11, valores bem acima dos obtidos neste trabalho (GUGLIOTTA et al., 2003). Outros autores observaram que efluente contendo corantes azo apresentava características como pH 5. Demanda Bioquímica de Oxigênio 124 ppm e λ máximo de 521nm (SEDIGHI; KARIMI; VAHABZADEH, 2009). Dois efluentes de indústrias têxtil foram caracterizados quanto a presença de compostos fenólicos. Após a degradação desses efluentes por fungos marinhos utilizaram esta mesma característica para avaliar a toxicidade do

composto (VERMA, 2009). Vários autores corroboraram com a utilização mais indicada do modo ESI para corantes com caráter polar ou iônico. A espectrometria de massas utilizando técnicas de ionização a pressão atmosférica incluindo o modo ESI, é ideal para confirmações de estruturas de corantes bem como para identificação de produtos correlatos e derivados de corantes. Esses métodos podem ser facilmente acoplados a cromatografia líquida (YINON; BETOWSKI; VOYKSNER, 2007).

Kaushik e Malik (2009) relatam a importância dos efluentes têxteis conterem corantes com estruturas fenólicas, semelhantes a da lignina, quando a degradação é feita por fungos. Esta semelhança permite a produção e secreção das enzimas lignina peroxidase Manganês peroxidase e lacases que por serem inespecíficas irão atuar na metabolização desses compostos.

A detecção do corante índigo por espectrômetro de massa tem sido relatado por alguns autores. Epolito et al. (2005) detectou a presença do corante azul reativo CI 4 em água utilizando a combinação de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com espectrometria de massa. Liao et al. (2007) estudando vinte e uma folhas frescas de plantas chinesas detectou a presença do corante índigo em todas os vegetais analisados.

4 DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTE DE LAVANDERIA DE JEANS DO MUNICÍPIO DE CARUARU-PE POR FUNGOS FILAMENTOSOS

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo selecionar fungos com potencialidade de descolorir efluente gerado por uma lavanderia de jeans localizada no município de Caruaru-PE e otimizar as condições de cultivo utilizando a metodologia do planejamento experimental. Os fungos foram inoculados em frascos de 500ml contendo 100mL de meio líquido sintético e, a cada 24h, foram retiradas alíquotas de 2mL para a leitura da absorbância (670nm), ao longo de 10 dias. Foram avaliadas as condições de cultivo estacionária e sob agitação de 130 rpm. Após a seleção das melhores linhagens foi realizado um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimizar as condições do tratamento. Os fungos *Phanerochaete chrysosporum*, *Lentinula edodes* e *Curvularia lunata* reduziram 100% a cor do efluente durante crescimento sob agitação enquanto que o fungo *Aspergillus* sp. reduziu 98% a cor do efluente, sob a mesma condição. Análise estatística confirmou diferença significativa entre as condições de cultivo avaliadas, com maior eficiência de descoloração do efluente têxtil sob agitação para a maioria dos fungos avaliados. Após realização do planejamento experimental constatou-se que dentre os 27 experimentos, o 19 se destacou por facilitar a descoloração em 99% do efluente ao final do décimo dia pelos quatro fungos selecionados. A cinética de descoloração demonstra que os fungos *P. chrysosporum* e *C. lunata* se destacam por iniciarem a descoloração antes dos outros fungos.

Palavras-chave: Efluente têxtil. Descoloração. Fungos. Condição de cultivo.

INTRODUÇÃO

O crescimento industrial tem contribuído para o desenvolvimento econômico e social, interferindo também no aumento dos problemas ambientais que tem se tornado cada vez mais crítico e freqüente (COTTA; REZENDE; PINOVAI, 2006). Segundo Oliveira e Souza (2003), o segmento têxtil agrega valor econômico e social, por outro lado são geradores de grandes volumes de efluentes complexos que apresentam intensidade de cor, concentração de matéria orgânica variada e teores de sais elevados, com isso contribuem potencialmente à degradação do meio ambiente (SANTOS et al., 2005). Na região Nordeste, a expansão das

indústrias têxteis desenvolveu no agreste pernambucano um grande pólo produtor de confecções, nas cidades de Caruaru, Toritama e Santa Cruz do Capibaribe. Dentre estes o município de Caruaru se destaca por apresentar um importante centro de lavanderias que são responsáveis pela degradação ambiental, principalmente do rio Capibaribe/PE, que recebe os resíduos químicos provenientes do beneficiamento de peças em jeans (SEBRAE/PE, 2009). Esta poluição facilmente visível causa alterações no ciclo biológico além da presença de corantes e subprodutos que são mutagênicos e ou carcinogênico (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002). A biorremediação é um conjunto de técnicas onde organismos são utilizados para degradar compostos orgânicos removendo-os do ambiente. Dentre estes se destacam as bactérias e fungos que são extremamente versáteis em degradar substâncias recalcitrantes (BARR; AUST, 1997). Entre os fungos da "podridão branca da madeira", tem demonstrado eficiência na degradação de grande variedade de compostos e de corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (KNAPP; NEWBY; RECCO, 1995; BALAN, 1999). Os fungos mitospóricos também são descritos como potencialmente degradadores de compostos orgânicos, principalmente devido a atividade da enzima lacase. Por tudo isto aqui relatado este trabalho objetiva a otimização de parâmetros de cultivo para utilização de fungos no tratamento biológico de efluente gerado por lavanderia têxtil do município de Caruaru-PE.

MATERIAL E MÉTODO

Fungos

Foram utilizados vinte fungos, sendo dez basidiomicetos e dez mitospóricos, cedidos pela Coleção de Culturas do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (Micoteca URM). Os fungos basidiomicetos foram mantidos em Batata Dextrose Ágar (BDA) a 4°C, enquanto que os fungos mitospóricos foram mantidos em Sabouraud (SAB) nas mesmas condições. Vale salientar que os fungos mitospóricos foram isolados de ambientes contaminados por derivados de Petróleo.

Amostragem e Manutenção do Efluente

O efluente utilizado ao longo de todo experimento foi obtido do tanque de estocagem de resíduo da lavanderia “Stomp”, pertencente ao Pólo Têxtil Industrial de Caruaru-PE. O efluente foi coletado em vários pontos do tanque de descarga e estocado em câmara fria.

Descoloração do Efluente pelos Fungos

Os fungos foram previamente crescidos em Meio Ágar Malte (MEA) e mantidos a 30°C durante 10 dias. Três discos do crescimento dos fungos (6mm) foram transferidos para Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio líquido sintético (YAMANAKA et al., 2008), modificado. A modificação consistiu na substituição da água destilada pelo efluente. Os frascos foram mantidos sob condições estáticas ou com agitação a 130 rpm para os basidiomicetos e estáticas ou com agitação a 150rpm para os fungos mitospóricos. A cada 24h, durante 10 dias, foram retiradas alíquotas de 2mL para a leitura da absorbância a 670nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O percentual de descoloração foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\%D = \frac{\text{AbsT}_0 - \text{AbsT}_x}{\text{AbsT}_0} \times 100$$

% D= percentual de descoloração

AbsT₀=absorbância inicial

AbsT_x= absorbância em cada tempo

Análise Estatística

Para obtenção da velocidade de descoloração foi obtida a constante de linearidade de cada amostra. A variância significativa entre as condições de tratamento para os dois grupos de fungo foi realizada através do teste *T student* utilizando o software Statistic 6.0, onde a variação significativa foi considerada quando $p \leq 0,05$.

Planejamento Experimental

Com as linhagens que apresentaram melhor resultado no ensaio anterior foi realizado um planejamento experimental a fim de obter as melhores condições operacionais. Para isto foi aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), através de um planejamento fatorial completo (2^4) com os níveis -1 e +1, oito pontos axiais (-2 e +2) e quatro pontos centrais (nível zero) em que as variáveis estudadas foram: pH, concentração de extrato de levedura, agitação e concentração de sulfato de cobre (CuSO_4) como variáveis independentes e percentual de descoloração ao final do décimo dia como variável dependente. O planejamento constou de 27 experimentos (Tabela 1) e para sua realização foi utilizado o SOFTWARE Statistic 6.0.

Tabela 1 – Valores estabelecidos no planejamento fatorial experimental

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
Extrato de Levedura	0	0.01	0.05	0.1	0.5
pH	5.0	5.5	6.5	7.5	8.0
CuSO₄	0.01	0.02	0.05	0.06	0.08
Agitação	0	30	80	130	180

Atividade de enzimas ligninolíticas em efluentes têxteis

Para determinar a produção das três principais enzimas ligninolíticas: manganês peroxidase (MGP), lignina peroxidase (LiP) e lacases, fungos selecionados foram cultivados em frascos nas condições estabelecidas no delineamento experimental (0,05 g de extrato de levedura, 0,2 g de KH_2PO_4 , MgSO_4 0,05 g, 0,02 g CuSO_4 , MnSO_4 0.016g, pH 7,5, 1L de efluente de lavanderia industrial) a 28 ° C por dez dias sem agitação. Após este tempo, o extrato enzimático foi obtido por filtração em membrana de 0,45 μm .

Ensaio Enzimáticos

Toda a atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente (HP - 8453/UV-Visible). A atividade de lacase foi determinada usando 2,2 - azino - bis - ethylbenthiazolina (ABTS), em conformidade com Buswell et al. (1995). A mistura consistiu de 0,1 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 0,8 ml de solução de ABTS em 0,03% (w / v) e 0,1 ml de extrato enzimático. A oxidação do ABTS foi medida através do monitoramento do aumento da absorbância em 420nm. atividade de MnP foi medido pelo método de oxidação

do fenol vermelho em 610nm, como determinado por Kuwahara et al. (1984). A mistura de reação foi composta por 500µL do extrato enzimático, 100µL de lactato de sódio (0,25 M), a 100 µL de vermelho de fenol (0,01% w / v), 200µ L albumina bovina (0,5% w / v), 50 (MnSO₄ (2 mM), 50 (peróxido de hidrogênio em tampão succinato de sódio (20mM, pH 4,5). A mistura foi incubada a 30 ° C por 5 min e a reação foi interrompida por 40µL de NaOH (2N). LiP atividade foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico como descrito por Buswell et al. (1995) A reação da mistura era composta por 1mL tampão tartarato de sódio 125mm pH 3,0, 500µL de álcool veratrílico 10mM;. 500µL de peróxido de hidrogênio 2mM e 500 µL do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio e o aparecimento de veratrideído foi determinada em 310 nm. Uma unidade de enzima foi definida como 1,0 mol de produto formado por minuto nas condições do ensaio.

RESULTADOS

Descoloração de Efluentes por Fungos

A Tabela 2 mostra a porcentagem de descoloração do efluente pelos 20 fungos avaliados, após 6 dias de cultivo sob ambas as condições testadas.

Basidiomicetos

Dentre os dez fungos do grupo dos basidiomicetos dois se destacaram pela sua capacidade de descolorir o efluente têxtil nas duas condições de cultivo testadas. *Phanerochaete chrysosporum* (F9) reduziu a cor do efluente em 97% e 100%, sob condições estática e agitada, respectivamente *Lentinula edodes* (F10) reduziu a cor do efluente em 95% e 100%, sob ambas as condições. Outros fungos apresentaram capacidade de descoloração nas duas condições estabelecidas, o fungo *Fomes fasciatus* (F4) e *Lentinla crinitus* (F3) demonstraram capacidade de redução de cor em 92% e 94% em condição estática enquanto que sob agitação descoloriram o efluente em 81% e 88% respectivamente. Os fungos *Fomitella supina* (F1), *Schizophyllum commune* (F7) e *Ganoderma applanalum* (F8) apresentaram um potencial de descoloração de 88% em condição estática enquanto que sob condição agitada descoloriram em até 80%, 90% e 89% respectivamente. Dentre o grupo dos basidiomicetos, os fungos que se apresentaram menos promissores quanto ao potencial de descoloração do efluente foram o *Pycnoporus sanguineus* (F2), *Coriollus caperatus* (F5) e

Trametes villosa (F6) com percentual de descoloração de 72%, 76% e 70% sob condição estática e 72%, 81% e 78% sob condição de agitação.

Mitospórico

Dentre os dez fungos mitospóricos testados apenas a *Curvularia lunata* (F885) descoloriu 100% do efluente sob condição agitada e 98% sob condição estática, seguido pelo fungo *Aspergillus* sp. (F75) que apresentou descoloração de 95% e 98% sob condições estática e agitada respectivamente. O fungo *Penicilium griseofulvum* (F880) apresentou 94% de descoloração do efluente em ambas as condições testadas enquanto que os fungos não identificados F94 e F112 descoloriram o efluente em 93% e 90% em condição estática enquanto que sob agitação ambos descoloriram 90% do efluente. Os fungos *Aspergillus tamaris* (F870), *Curvularia* sp. (F76), *Penicilium aurantiogriseus* (F884), e *Curvularia* sp. (F111) apresentaram percentual de descoloração de 83% 81%, 81% e 75% sob condição estática e 83%, 88%, 81% e 75% sob condições agitadas enquanto o fungo não identificado F48 demonstrou um percentual de 75% em ambas as condições.

Tabela 2 – Percentual de descoloração do efluente pelos 20 fungos avaliados após dez dias de cultivo sob ambas as condições testadas.

Fungo	Redução de cor (%)	
	Sem agitação	Com agitação
<i>Fomitella supina</i>	88	80
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	72	72
<i>Lentinula crinitus</i>	92	88
<i>Fomes fasciatus</i>	94	81
<i>Coriollus caperatus</i>	76	81
<i>Trametes villosa</i>	70	78
<i>Schizophyllum commune</i>	88	90
<i>Ganoderma applanalum</i>	88	89
<i>Phanerochaete chrysosporum</i>	97	100
<i>Lentinula edodes</i>	95	100
Controle abiótico *	2	3
<i>Aspergillus</i> sp.	95	98
<i>Curvularia</i> sp.	81	88
<i>Curvularia</i> sp.	75	75
<i>Aspergillus tamaris</i>	83	83
<i>Penicilium griseofulvum</i>	94	94
<i>Penicilium aurantiogriseus</i>	81	81
<i>Curvularia lunata</i>	98	100
Não Identificado	79	79
Não Identificado	93	90
Não Identificado	90	90
Controle abiótico *	2	1

Análise Estatística

Após realização do teste *T student* observou-se uma confiabilidade a um nível de 95%, diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre as médias dos valores dos percentuais de descoloração do efluente têxtil pelos tratamentos quando executados de forma estacionária e sob agitação de 130 rpm, como pode ser observado pelos resultados mostrados na tabela 4. Inúmeras metodologias estatísticas são empregadas com o intuito de validar técnicas utilizadas ao longo dos trabalhos realizados.

Tabela 3- Análise estatística entre os grupos de fungos testados

Fungos	Média dos grupos de fungos na condição de cultivo		P- valor
	Estacionário	Sob agitação	
Basidiomicetos	0,481550	0,852410	0.000000
Mitospóricos	0,415620	0,566390	0.040053

Planejamento Experimental

Após a realização do planejamento experimental, constatou-se que dentre os 27 experimentos, o tratamento 19 se destacou por descolorir 99% do efluente ao final do décimo dia para os quatro fungos utilizados (Figura 1). Apesar de todos os fungos descolorirem em 99% ao final do décimo dia quando submetidos as condições de tratamento 19, a cinética de descoloração demonstra que os fungos *Phanerochaete chrysosporum* e *Curvularia lunata* se mostraram mais promissores, onde se observa que a partir do quarto dia se observa a presença de 40% de corante no efluente, chegando a 99% de corante residual ao final do sexto dia diferentemente dos outros dois fungos que ainda encontravam corante residual no mesmo período de tempo (Figura 2). Quando o fungo utilizado foi o *P. chrysosporum*, o gráfico de Pareto (Figura 3) gerado após a execução do planejamento experimental demonstra que a interação entre as variáveis agitação e extrato de levedura é a que mais influência nos resultados com limite de confiança de 98,7%. No gráfico de superfície representado na figura 4 pode-se observar uma tendência de ótimo para ambas as condições estáticas e agitadas a 150 rpm e a concentração de extrato de levedura em torno de 0,03g/L, sendo maximizado pela interferência dos pontos centrais. No caso do fungo *C. lunata* se pode observar que apenas a agitação influência significativamente no processo, com limite de confiança de 3,8% (Figura 3) podendo constatar no gráfico de superfície o mesmo perfil demonstrado PA ao fungo *P. chrysosporum* (Figura 6).

Figura 1 – Percentual de descoloração do efluente da lavanderia de jeans nas 27 corridas executadas no planejamento experimental pelos fungos *P. chrysosporum*, *L. edodes*, *Aspergillus sp.* e *C. lunata*

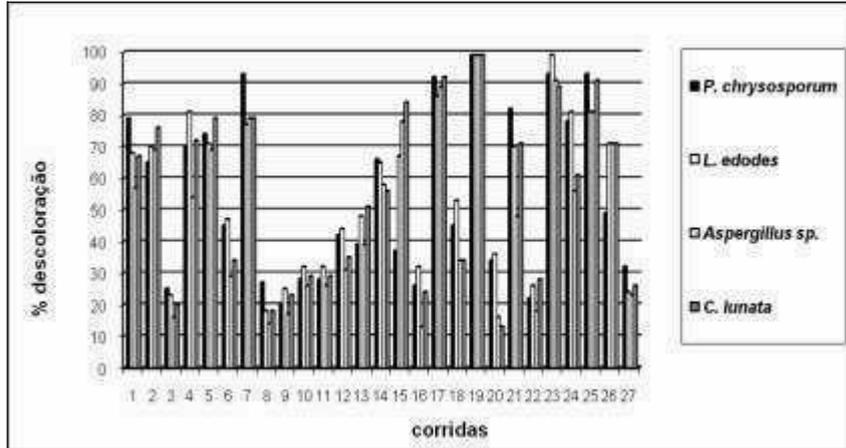


Figura 2 – Cinética de descoloração do efluente pelos fungos *P. chrysosporum*, *Aspergillus sp.*, *C. lunata* e *L. edodes* ao longo de dez dias quando submetidos ao tratamento 19 gerado pelo planejamento experimental

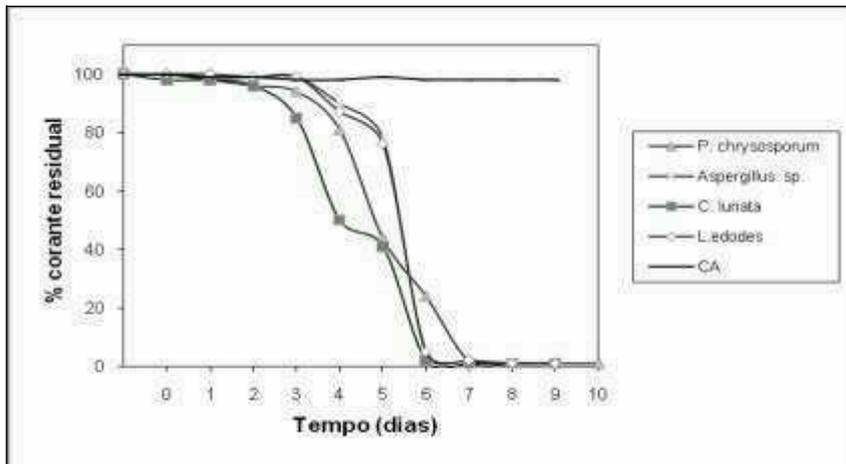


Figura 3 – Gráfico de Pareto indicando quais variáveis apresentam uma maior influência no processo de descoloração do efluente têxtil pelo fungo *P. chrysosporum*.

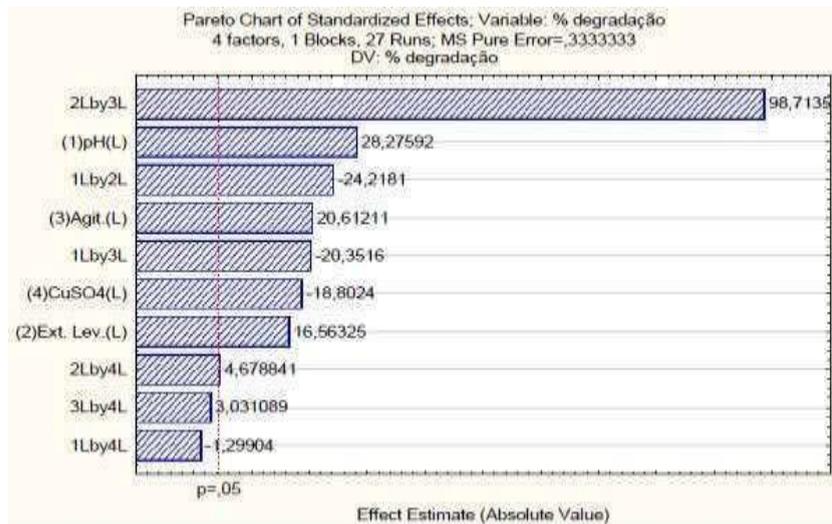


Figura 4 – Superfície resposta de agitação e concentração de extrato de levedura (g/L) com variável resposta o percentual de degradação (%) do *Phanerochaete chrysosporum*.

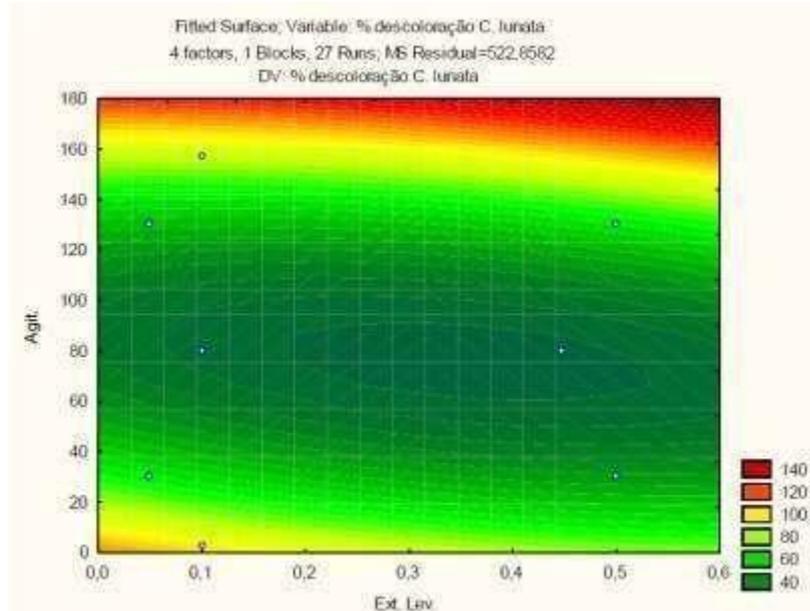


Figura 5 - Gráfico de Pareto indicando quais variáveis apresentam uma maior influência no processo de descoloração do efluente têxtil pelo fungo *C. lunata*.

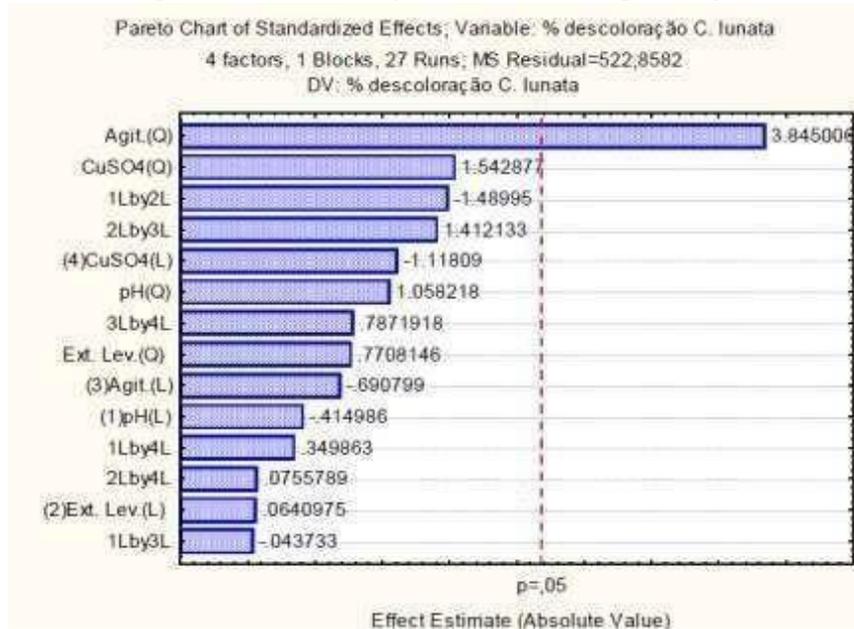
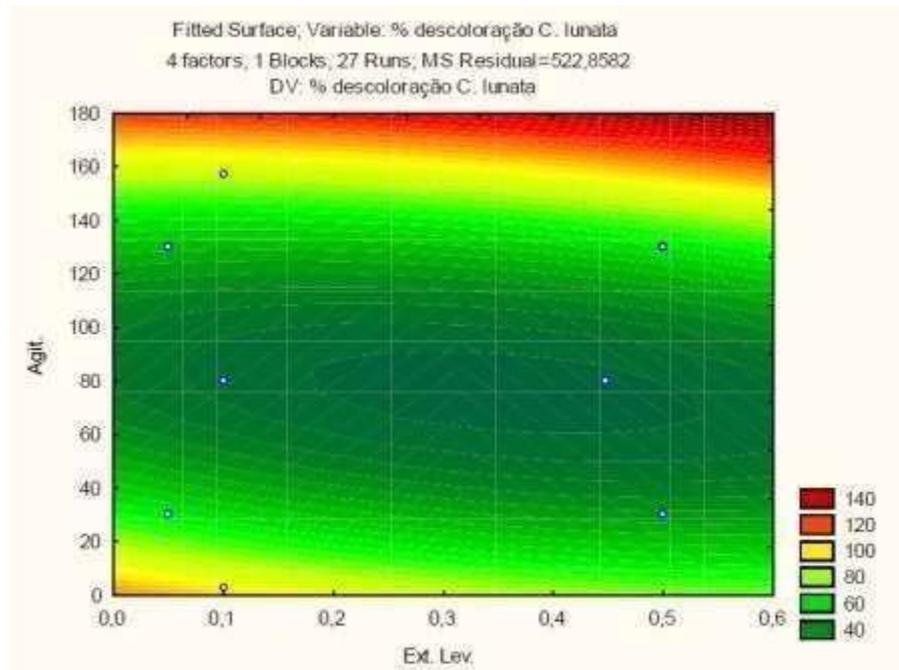


Figura 6 – Superfície resposta de agitação e concentração de extrato de levedura (g/L) com variável resposta o percentual de degradação (%) do *Curvularia lunata*.



Atividade de enzimas ligninolíticas em efluentes têxteis

Os valores de quantificação total das três principais enzimas ligninolíticas estão apresentados na Tabela 4. Nas condições de cultivo estabelecidas pelo planejamento experimental pode ser visto que os quatro fungos são produtores da enzima lacase, e o fungo *C. lunata* UFPEDA 885 apresentou o maior potencial, seguida por F75 *Aspergillus* sp. Estes resultados demonstram a importância da fonte de cobre no meio devido à dependência desta enzima neste mineral. Os fungos também demonstraram potencial na produção de manganês peroxidase-dependente. Para esta enzima o fungo que apresentou maior potencial na produção foi o *Aspergillus* sp. F75, seguida por *C. lunata* UFPEDA 885. Os quatro fungos não se mostraram bons produtores da enzima lignina peroxidase. Isto pode ser devido à ausência de uma fonte adicional de ferro em meio de cultura. Estes resultados demonstraram interesse pelo fato de que os principais produtores foram fungos mitospóricos, que apresentam o cultivo mais fácil e mais rápido crescimento.

Tabela 4 – Quantificação da atividade total das três principais enzimas do aparato lignolítico dos fungos *Aspergillus* sp. F75, *C. lunata* UFPEDA 885, *P. chrysosporium* CCT 1999 and *L. edodes* CCT 4519.

Fungos	Enzimas (U/L)		
	Mn Peroxidase	Lacase	Li Peroxidase
<i>Aspergillus</i> sp. F75	552	1950	111
<i>C. lunata</i> UFPEDA 885	474	2100	50
<i>P. chrysosporium</i> CCT 1999	466	1506	30
<i>L. edodes</i> CCT 4519	466	1835	96

DISCUSSÃO

Descoloração do Efluente têxtil pelos Fungos

Os fungos causadores da podridão branca na madeira são relatados como potenciais degradadores de corantes utilizados pela indústria têxtil devido ao seu conjunto de enzimas ligninolíticas. Martins et al. (2001) observaram que *P. chrysosporium* descoloriu uma mistura de oito corantes do grupo azo durante oito dias de crescimento em meio líquido. Utilizando o mesmo fungo Radha et al. (2005) relataram que o *P. chrysosporium* descolore 99% dos corantes “Methyl Violet”, “Orange” e “Vat Majenta” em concentrações iniciais de 0,05g/L em pH 4,5 e 35°C de temperatura. Além dos basidiomicetos, fungos mitospóricos também apresentam potencial para descolorir efluentes têxteis por apresentarem enzimas lignolíticas bem como substâncias de baixa massa molecular, como as espécies de oxigênio reativo, radical hidroxil e íons de Fe (VITALI et al., 2006). Um mecanismo eficiente na remoção de corantes em efluentes têxteis por fungos mitospóricos é a biosorção. Alguns relatos na literatura demonstram a eficiência deste mecanismo. Fahl et al. (2004), relataram que *Aspergillus oryzae* em sua forma paramorfogênica apresentou a capacidade de adsorver o corante “acid yellow 25”, em diferentes condições de pH. *Aspergillus niger* demonstrou potencialidade em descolorir ambientes aquáticos contaminados com o corante reativo sinazol por adsorção, após 18h de exposição da sua biomassa (KHALAF, 2008). Outros gêneros mitospóricos também demonstram capacidade na remoção da cor de efluentes têxteis. Shedbalkar et al. (2008) relataram que *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 demonstrou capacidade em descolorir 93% de corante trifenilmetano sob condição de cultivo estacionária, pH 6,5, a 25°C, em duas horas e meia de contato. Ambrósio e Campos-Takaki (2004) relataram que *Cunninghamella elegans* descoloriu 83% do corante “orange II” em meio contendo sacarose e peptona, após 96 horas de tratamento. Omissão da sacarose reduziu a descoloração do corante para 48%, no mesmo intervalo de tempo. As condições de cultivo são

essenciais para um desempenho satisfatório dos organismos. *Aspergillus ochraceus* se mostrou promissor na degradação do corante “Reactive blue 25” em meio contendo apenas água destilada e glicose Parshetti et al. (2007). Neste trabalho, os autores relacionaram a presença das enzimas lacase, lignina peroxidase e tirosinase com a degradação deste corante e os dados foram corroborados com análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CGMS) que apresentaram picos dos compostos fitalimidina e di-iso-butilfitalato, metabólitos intermediários do corante.

Análise Estatística

Inúmeras metodologias estatísticas são empregadas com o intuito de validar técnicas utilizadas ao longo dos trabalhos realizados. Evangelista-Barreto et al. (2009) comparou três bioensaios para observar qual seria o mais eficiente, sendo I (cultura simples) e II e III (consórcios) com a finalidade de otimizar o processo de descoloração do Azo Corante Alaranjado II. Os autores utilizaram o teste de *Turkey* para demonstrar a existência de diferenças significativas entre as médias dos três processos empregados e observou maior eficiência de descoloração nos bioensaios utilizando culturas em consórcio.

Planejamento Experimental

Alguns autores têm utilizado a metodologia de planejamento fatorial para aperfeiçoar as condições utilizadas na degradação de corantes ou efluentes por microrganismos. Srinivan e Murthy (2009) realizaram um planejamento experimental completo do tipo central composto para otimizar as concentrações iniciais de glicose, corante e cloreto de amônio em meio de cultivo no qual é utilizado para testar a capacidade do fungo *Trametes versicolor* em descolorir corantes azo. O corante Reactive-orange 16 (RO-16) foi degradado em 94,5% quando as concentrações ótimas de glicose, corante e cloreto de amônio foram de 17,50g/L, 0,66g/L e 2,69g/L enquanto que para o corante Reactive-red 35 (RR-35) estas concentrações foram de 16,67g/L, 0,68g/L e 2,13g/L. Estes valores foram estudados e otimizados após a observação do gráfico de superfície resposta. Evangelista-Barreto et al. 2009 após realizarem um planejamento fatorial completo com dois níveis e quatro variáveis relataram a degradação de 96-98% do corante azo Orange II por *Geobacillus stearothermophilus*, quando cultivado no meio Luria Bertani sob condição de agitação a 150rpm, fenômeno atribuído a necessidade

do co metabolismo por bactérias. Após observação do gráfico de Pareto pode-se afirmar que a agitação é a variável que influencia positivamente no processo.

5 TRATAMENTO DE EFLUENTE TÊXTIL EM REATOR ESTÁTICO PELOS FUNGOS *CURVULARIA LUNATA* URM 6179 AND *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* URM 6181

RESUMO

Este trabalho objetiva demonstrar o potencial dos fungos *Curvularia lunata* URM 6179 e *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181 no tratamento de efluente têxtil gerado por uma lavanderia de jeans do município de Caruaru – PE, Brasil, em reator estático com e sem aeração. Setenta e cinco blocos de gelose dos fungos previamente crescidos em extrato de malte agar (MEA), foram inoculados em dois conjuntos de três reatores com e sem aeração e avaliados o potencial de descoloração em espectrofotômetro, degradação em HPLC e a formação de produtos de degradação por espectrometria de massa (MS/MS). A produção das enzimas lacase, lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) também foi quantificada ao final do décimo dia de tratamento. Ambos os fungos apresentam capacidade de descolorir quase 100% o efluente, tendo uma pequena quantidade de corante residual ao final do décimo dia de tratamento. Os fungos *C. lunata* URM 6179 e *P. chrysosporium* URM 6181 demonstraram uma maior capacidade de degradar o corante quando o efluente foi tratado em reator aerado por serem produtores de enzima lacase. Após dez dias de tratamento, observou-se que a degradação do corante indigo presente no efluente pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 gera um novo composto.

Palavras-chave: Efluente textile. Degradação. Fungos.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento significativo dos problemas ambientais, principalmente devido ao crescimento contínuo da população e das atividades industriais. Dentre as indústrias, se destaca as do setor têxtil por gerarem rejeitos com grande quantidade de água, corantes e outros produtos químicos utilizados ao longo de uma complexa cadeia produtiva (COTTA; REZENDE; PINOVAI, 2006). No estado de Pernambuco um dos grandes problemas ambientais é a poluição hídrica provocada pelo lançamento de efluentes das lavanderias industriais de jeans, em especial as localizadas na Região Agreste, especificamente no Pólo de confecções nos municípios de Caruaru, Santa

Cruz do Capibaribe e Toritama. Os efluentes dessas lavanderias são descartados em corpos hídricos responsáveis pelo abastecimento de água dos municípios citados, o que vem acarretando problemas na qualidade de água para o abastecimento público. Uma das alternativas para estas empresas seria a reutilização da água após o tratamento. Dentre as diversas formas de tratamento de rejeitos industriais, destacam-se os biológicos, onde microrganismos são utilizados com a finalidade de remover compostos tóxicos do ambiente. As pesquisas sobre degradação de compostos químicos têm mostrado que bactérias e fungos são extremamente versáteis em degradar substâncias recalcitrantes (BARR; AUST, 1997). Entre os fungos, os basidiomicetos, tem demonstrado eficiência na degradação de grande variedade de compostos e de corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados por serem grandes produtores de enzimas lacase, lignina peroxidase e peroxidase dependente do manganês (BANAT et al., 1996). Essas enzimas funcionam junto com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzindo oxidases e metabólitos secundários e por serem inespecíficas e pouco seletivas, possuem a capacidade de reconhecer e degradar uma diversidade de compostos orgânicos como pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos poliaromáticos, fenóis e explosivos (SUE; SEUNG-HYEON; MAN, 2000). Em se tratando de corantes, as enzimas oxidativas de fungos utilizam o mesmo mecanismos que na natureza, resultando na total descoloração dos efluentes (ADOSINDA et al., 2003). Outros fungos que não pertencem ao grupo dos basidiomicetos tem demonstrado capacidade de degradar corantes, apesar dos mecanismos utilizados por estes fungos ainda não estarem completamente elucidados. Relatos demonstram que o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC36112 foi capaz de metabolizar o corante verde malaquita em 24h (AMBRÓSIO; CAMPOS-TAKAKI, 2004). Poucos relatos sobre a produção de enzimas lignolíticas por esses fungos são encontrados na literatura, demonstrando a necessidade de maiores estudos.

Muitos estudos tem demonstrado a capacidade destes organismos de degradar corantes, porém pouco tem se estudado quanto a capacidade desses fungos nos tratamentos de efluentes. Blaquez, Sarra e Vicent (2008) relataram a necessidade de se escalonar os processos de tratamentos de efluentes de ensaios em frascos para biorreator, em condições não esterilizadas e utilizando o próprio eluente. Algumas propostas de tratamento são relatadas, Anastasi et al. (2010) descreveram que o fungo *Bjerkandera adusta* descoloriu o efluente em reator de leito fixo após dez ciclos. Diante do exposto, este trabalho objetiva a utilização de fungos para tratamentos de efluente textil em reator de estático.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Os fungos *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181 e *Curvularia lunata* URM 6179 foram adquiridos da coleção de cultura URM pertencente ao Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, e mantidos em meio batata dextrose ágar (BDA) a 4°C.

Efluente Têxtil

O efluente têxtil foi coletado diretamente no tanque de armazenamento de uma lavanderia de jeans do município de Caruaru PE, Brasil e armazenado em câmara fria. Para se obter uma amostra composta coletou-se em diversos pontos e diferentes profundidades do tanque.

Condições de operação dos bioreatores

A fim de avaliar a influência da aeração no processo de degradação do corante índigo presente no efluente têxtil, os ensaios foram realizados em dois conjuntos de três reatores onde um foi utilizado como controle abiótico e em dois foram inoculados, para cada reator, setenta e cinco discos de gelose dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181 e *Curvularia lunata* URM 6179 previamente crescidos em extrato de malte ágar (MEA). Cada reator continha 5L de efluente têxtil acrescido de extrato de levedura 0.25g, KH₂PO₄ 1.0g, MgSO₄ 0.25g, CuSO₄ 0.01g, MnSO₄ 0.08g, pH 7.5 e incubados a 28°C em câmara escura. Um conjunto de três reatores operou sem aeração enquanto que o outro operou com aeração constante de 1vvm.

Condições analíticas

Avaliação da descoloração do efluente têxtil

Para observação da descoloração do efluente têxtil foram retiradas alíquotas de 2mL a cada 24 horas durante 10 dias para leitura da absorbância a 670nm (espectrofotômetro

SCHIMADZU – 1240/UV-MINI). O percentual de corante índigo residual foi calculado indiretamente através do cálculo do percentual de descoloração através da fórmula abaixo.

$$\%D = \frac{\text{AbsT}_0 - \text{AbsT}_x \times 100}{\text{AbsT}_0}$$

% D= percentual de descoloração

AbsT₀=absorbância inicial

AbsT_x= absorbância em cada tempo

Avaliação da degradação do corante índigo presente no efluente têxtil

A degradação do corante índigo presente no efluente têxtil por cada fungo foi acompanhada a cada 24 horas ao longo de dez dias através de análise em sistema cromatográfico composto por cromatógrafo líquido da marca WATERS® modelo 2487 contendo sistema de bombas WATERS 600, com detector dual λ absorbance. A coluna utilizada foi C₁₈ em fase reversa com 150mm X 2mm e λ partícula 5micro. As amostras foram analisadas nos comprimentos de onda 316nm e 256nm. A fase móvel foi composta de MeOH/H₂O na proporção 85:15 e vazão de 0,2mL/min. A taxa de degradação foi calculada pela redução percentual da área dos picos cromatográficos de cada amostra em relação a amostra inicial.

Avaliação dos produtos de degradação em reator aerado

A formação de produtos de degradação ao final do tratamento foi verificada em um sistema cromatográfico acoplado a espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) cromatógrafo marca WATERS® modelo 2695, espectrômetro *Micromass Quattro Micro* API. Para se conhecer a massa dos principais fragmentos foram injetados 20 μ L da amostra biotratada por dez dias pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 diretamente no espectrômetro de massa (infusão direta) e realizada uma varredura na faixa de massa/carga 235 a 300. O espectro padrão do efluente puro já era conhecido.

Produção das enzimas fenoloxidasas

A quantificação das enzimas lacase, lignina peroxidase e peroxidase dependente do manganês foi realizada após dez dias de tratamento do efluente têxtil em reator estático pelos fungos *C. lunata* e *P. chrysosporium*. Toda a atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente (SCHIMADZU-1240 UV/MINI). A atividade da lacase foi determinada usando 2,2-azino-bis- etilbentiazolina (ABTS) de acordo com a metodologia determinada por Buswell et al. (1995). A mistura consistiu de 0.1mL de tampão acetato de sódio a 0.1M (pH 5.0), 0.8mL de uma solução de ABTS a 0.03% (m/v) e 0.1mL do extrato enzimático. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento no aumento da absorbância a 420nm. A atividade da peroxidase dependente do manganês foi medida pelo método de oxidação do vermelho de fenol a 610nm como determinado por Kuwahara et al. (1984). A mistura reativa foi composta por 500µL de extrato enzimático, 100 µL de vermelho de fenol (0,01% m/v), 100 µL de lactato de sódio (0.25M), 200 µL de albumina bovina (0.5% m/v), 50 µL (MnSO₄ (2 mM), 50 µL peróxido de hidrogênio em tampão succinato de sódio (20mM, pH 4.5). A mistura foi incubada a 30°C por 5min e a reação foi interrompida pela adição de 40 µL de NaOH (2N). A atividade da LiP foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico como descrito por Buswell, Cai e Chang (1995). A mistura reativa foi composta por 1mL de tampão tartarato de sódio 125mM pH3.0, 500 µL de álcool veratrílico 10mM, 500 µL de peróxido de hidrogênio 2mM e 500 µL de extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio e a absorbância foi determinada a 310nm. Uma unidade de enzima foi definida como 1.0 µmol de produto formado por minuto sob as condições do ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da descoloração do efluente ao longo do tratamento

Na figura 1 observou-se o percentual de descoloração do efluente têxtil contendo corante índigo ao longo de dez dias de tratamento no conjunto de reatores sem aeração. O perfil de descoloração do efluente pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 foi semelhante ao longo dos dez dias de tratamento. Nos dois primeiros dias ocorreu uma permanência de 28% e 30% de corante índigo no efluente enquanto que no terceiro dia pode-se observar que o fungo *P. chrysosporium* URM 6181 demonstrou uma

maior eficiência pois apenas 18% de corante índigo permaneceu no efluente enquanto que no efluente biotratado por *C. lunata* URM 6179 encontra-se 24% de corante índigo. Ao final do décimo dia pode-se observar que em torno de 3% de corante índigo permaneceu no efluente biotratado por ambos os fungos.

O perfil de descoloração do efluente quando tratado em reator aerado pode ser observado na figura 2. O fungo *P. chrysosporium* URM 6181 demonstrou potencial para retirar o corante do meio já no primeiro dia de processo, observando-se 48% de corante residual no efluente, enquanto que o fungo *C. lunata* URM 6179 não demonstrou a mesma eficiência nas primeiras 24 horas de tratamento com um resíduo de corante de 92% no efluente. Ao longo dos nove dias do tratamento o fungo *P. chrysosporium* URM 6181 retirou gradativamente o corante índigo do meio permanecendo 3% do corante ao final do tratamento. Apesar do fungo *C. lunata* URM 6179 também apresentar eficiência ao final do tratamento o processo de descoloração foi mais lento nos seis primeiros dias, sendo intensificado a partir do sétimo dia.

Niebisch et al. (2010) relataram 95% de descoloração em nove dias do corante textil azul reativo 220 pelo fungo *Lentinus crinitus* cultivado em um meio contendo oxalato de amonio e glicose como fontes de nitrogênio e glicose respectivamente. Relatos da eficiência de descoloração por fungos não basidiomicetos são encontrados na literatura como observado no trabalho de Min et al. (2009). Estes autores isolaram um fungo do gênero *Penicillium* sp. de lodo contaminado com capacidade para descolorir o corante vermelho reativo brilhante 3-XB. Os autores relataram ainda que a capacidade de descoloração foi resultado do processo de adsorção por estar associado ao crescimento do pellet formado pelo micélio do fungo.

Figura 1 – Corante índigo residual no efluente tratado pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181 e *Curvularia lunata* URM 6179 após dez dias em reator sem aeração.

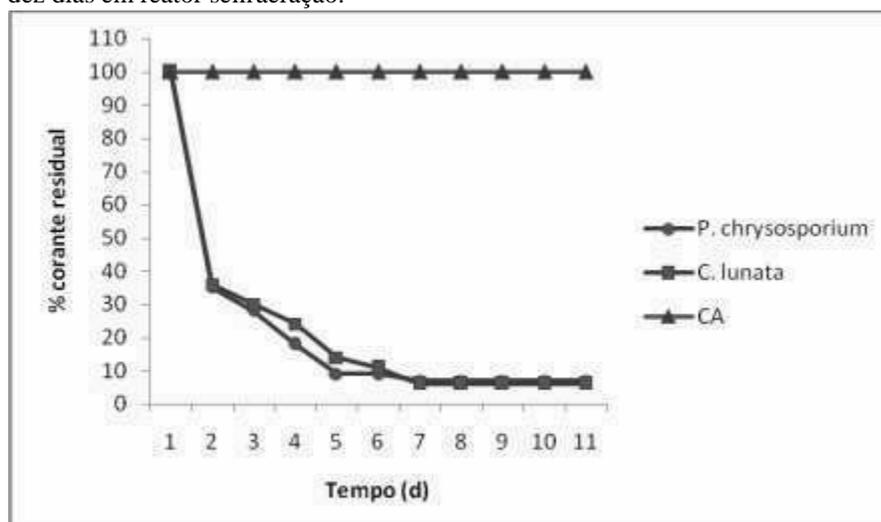
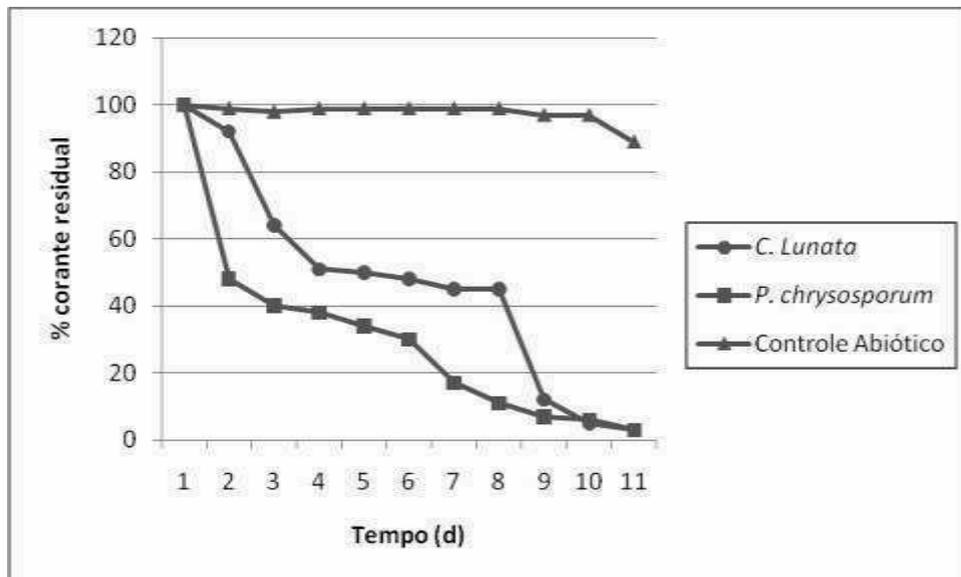


Figura 2 – Corante índigo residual no efluente tratado pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181 e *Curvularia lunata* URM 6179 após dez dias em reator aerado.



Avaliação da degradação do corante índigo presente no efluente têxtil

A degradação do corante índigo presente no efluente foi avaliada em sistema cromatográfico HPLC com detector UV em um comprimento de onda de 316nm nos dois conjuntos de reatores. Na figura 3 observa-se que os fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 apresentam potencial degradador do corante índigo em reator sem aeração ao longo dos dez dias de tratamento embora apresentem perfis cinéticos diferentes. *P. chrysosporium* URM 6181 demonstra um potencial degradador constante a partir do primeiro dia de tratamento, mantendo crescente a degradação até o décimo dia, enquanto que o *C. lunata* URM 6179 apresenta um potencial degradador no primeiro dia, se mantendo constante do segundo ao sexto dia, aumentando a degradação do sétimo ao décimo dia. Este comportamento do fungo *C. lunata* pode ser justificado por uma necessidade de adsorção do corante para estimular a produção das enzimas responsáveis pela degradação. Em reator sem aeração a degradação do corante índigo pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6181 é de 63% e 67% respectivamente ao final do décimo dia de tratamento. Embora os perfis cinéticos dos fungos tenham sido semelhantes ao do tratamento sem aeração, na figura 4 observa-se que a capacidade de degradação do corante índigo é potencializada para ambos os fungos quando a aeração está presente. O fungo *P. chrysosporium* URM 6181 apresenta uma degradação constante ao longo dos dez dias de tratamento iniciando com 29% de degradação no primeiro dia e finalizando o décimo dia com

95% de degradação do corante índigo presente no efluente. O fungo *C. lunata* URM 6179 mostrou capacidade de degradar 58% do corante índigo no primeiro dia de processo, se mantendo constante do segundo ao quarto dia, aumentando a degradação a partir do quinto dia, para no décimo dia de tratamento apresentar 96% de degradação do corante índigo presente no efluente textil. Alguns autores relatam a degradação de corantes por fungos como Zhao e Hardin (2007) que investigaram a degradação de dois corantes comerciais do tipo Azo pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. A análise em HPLC determinou 95% de degradação dos corantes “Disperse orange 3” e “Disperse Yellow” em cinco dias de cultivo em frascos agitados a 30°C e pH 5.0. Fungos não basidiomicetos também são relatados na literatura como degradadores de corantes. Shedbalkar, Dhanve e Jadhav (2008) após análise em HPLC relataram que *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 demonstrou capacidade de degradar o corante trifenilmetano sob condição de cultivo estacionária, pH 6,5, a 25°C, em duas horas e meia de contato produzindo metabólitos que foram observados após análise em TLC. Outros autores que também observaram esta habilidade dos fungos foram Saratele et al. (2009) que demonstraram a degradação do corante “Navy blue HER” pelo fungo *Trichosporon beigelii* NCIM-3326 em 24 horas sob condições estáticas após extração e análise em HPLC dos produtos originados da degradação do corante “Navy blue HER”.

Figura 3 - Percentual de degradação do corante índigo presente no efluente textil após dez dias de tratamento pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181 e *Curvularia lunata* URM 6179 em reator sem aeração.

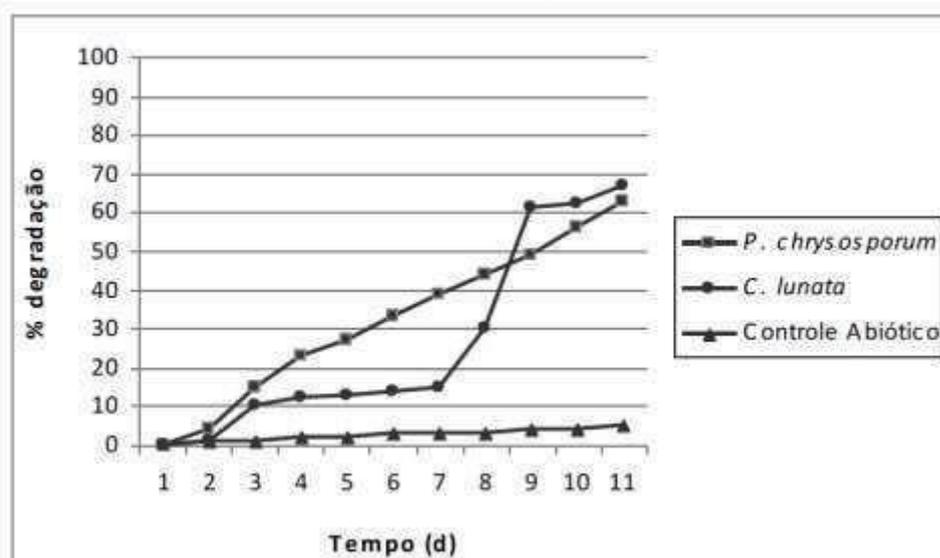
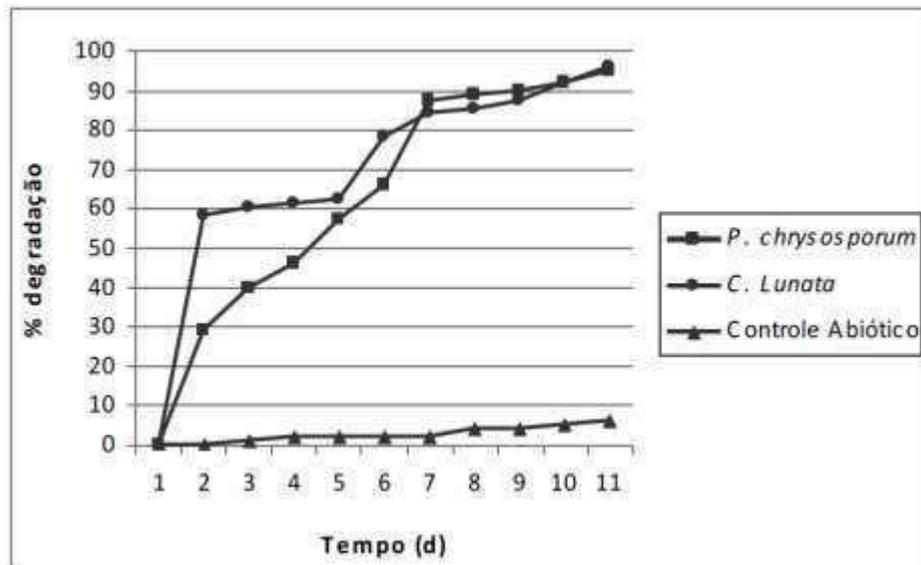


Figura 4 - Percentual de degradação do corante índigo presente no efluente textil após dez dias de tratamento pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* URM 6179 e *Curvularia lunata* URM 6181 em reator aerado.



Avaliação dos metabólitos secundários produzidos ao longo do tratamento

A investigação dos produtos de degradação foi realizada através da análise da amostra dos efluentes biotratados pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 após o décimo dia do processo. Quando a amostra analisada foi aquela biotratada pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 observou-se que ao final do processo permanece o fragmento de m/z 260.701 como o predominante indicando que o corante índigo ainda estava na amostra. Este fragmento é seguido de um de massa m/z 276.504, que não era visualizado quando realizada a varredura no efluente puro antes de ser submetido ao biotratamento, indicando a formação de um novo composto (Figura 5). Por apresentar uma massa maior que a do corante índigo sugere-se que este novo composto seja fruto de uma complexação de algum elemento presente no efluente com o corante índigo ou de uma quebra nos oxigênios constituintes da estrutura química do corante índigo e nova ligação com uma outra molécula do corante. A varredura na amostra biotratada pelo fungo *C. lunata* URM 6179 não demonstrou a formação de novos compostos, permanecendo o fragmento m/z 260.701 característico do corante índigo como predominante como pode ser visualizado na figura 6. Uma possível rota de degradação do corante índigo foi proposta por Campos et al. (2001) quando estudou a atividade da enzima lacase isolada de *Trametes hirsuta* (THL1) frente ao corante índigo. Os autores propõem que inicialmente o corante índigo perca os dois hidrogênios e posteriormente seja quebrado em

dois anéis indóis formando a isantina. Este composto seria atacado pela água, formando o ácido antranílico.

Figura 5 – Espectro de massa da amostra do efluente tratado pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181 após 10 dias de tratamento.

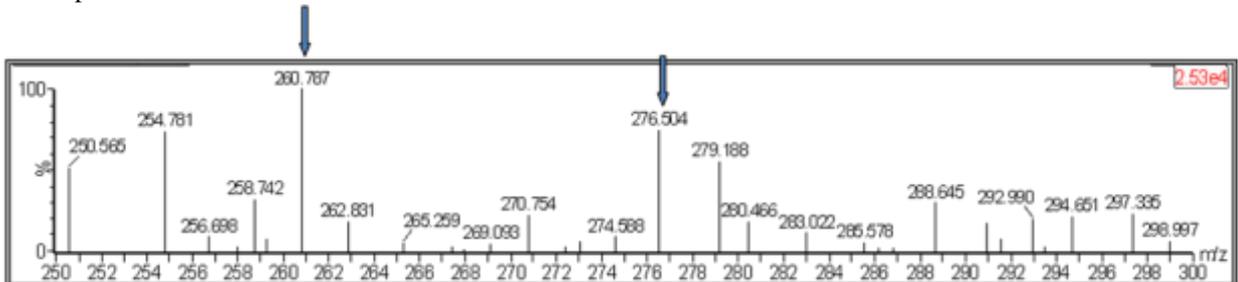
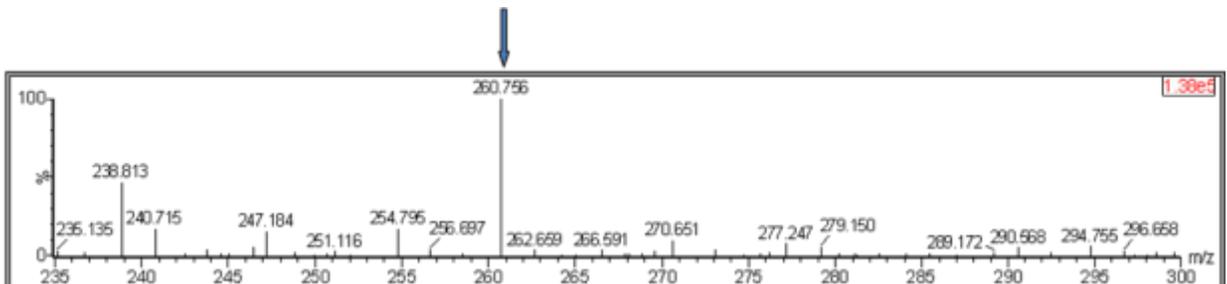


Figura 6 – Espectro de massa da amostra do efluente tratado pelo fungo *Curvularia lunata* URM 6179 após dez dias de tratamento.



Produção das enzimas fenoloxidasas

Na tabela 1 pode-se visualizar os valores de produção das enzimas lacase, lignina peroxidase e peroxidase dependente do manganês pelo fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 ao final do tratamento do efluente têxtil em reatores com e sem aeração. Ambos os fungos apresentaram alta produção da enzima lacase porém em condições diferentes. O fungo *P. chrysosporium* URM 6181 demonstrou uma alta produção da enzima lacase em reator com aeração enquanto que a produção pelo fungo *C. lunata* URM 6179 foi mais alta em reator sem aeração. Para a enzima Mn peroxidase o que se observa é uma boa produção pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 em reator sem aeração, enquanto que o fungo *C. lunata* URM 6179 produziu uma quantidade maior da enzima sob condições aeradas. A quantificação da enzima LiPeroxidase foi baixa para ambos os fungos. Vários autores relatam a produção dessas enzimas por fungos com potencial degradador. Ao contrário dos valores obtidos no trabalho, Gomes et al. (2009) relatam a produção de 8000U/L da enzima Li Peroxidase e 7000U/L da enzima Mn Peroxidase pelo fungo *Lentinus* sp., enquanto que o fungo *Coriopsis byrsina* produz 2000U/L da enzima lacase. Os autores atribuem esta alta produção enzimática a adição do nitrogênio no meio. Por outro lado, Bonugli-Santos et al.

(2010) demonstraram a produção de lacase e MnPeroxidase em meio de cultivo contendo glicose e farelo de trigo. O fungo *Mucor racemosus* CBMAI 847 produz 898.15 U/L de lacase em meio contendo 23 % de salinidade e 4.5mg/mL de farelo de trigo enquanto que o fungo *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 produz 4.63U/L. Estes resultados são inferiores ao encontrado no corrente trabalho.

Tabela 1 – Quantificação das enzimas lacase, LiPeroxidase e MnPeroxidase produzidas pelos fungos *P. Chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 ao final de dez dias de tratamento de efluente textil em reatores com e sem aeração.

Enzimas (U/L)	<i>P. chrysosporium</i>		<i>C. lunata</i>	
	com aeração	sem aeração	com aeração	sem aeração
Lacase	2020	1506	1693	2100
LiPeroxidase	39	30	45	50
MnPeroxidase	392	466	484	474

6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTE TÊXTIL BIOTRATADOS EM REATOR AERADO PELOS FUNGOS *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181 e *Curvularia lunata* URM 6179 PELO SISTEMA BIOLÓGICO *Allium cepa*

RESUMO

Os processos têxteis são grandes consumidores de água e de corantes sintéticos, geradores de efluentes volumosos e complexos com elevada carga orgânica, aliada ao elevado teor de sais inorgânicos. Os vegetais superiores apresentam características que os tornam excelentes modelos genéticos para avaliação de poluentes ambientais, por isso têm sido utilizados com muita frequência em estudos de monitoramento. Este trabalho objetiva a utilização de sementes de *Allium cepa* como bioindicador da eficiência na utilização de fungos filamentosos em tratamento de efluente têxtil em reator. Para isto sementes de *Allium cepa* foram crescidas em placas de Petri embebidas com as amostras de efluente não tratado e tratados pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *Curvularia lunata* 6179 ao longo de 15 dias de tratamento em reator agitado. Após cinco dias foram analisados os meristemas das sementes e observados e fases mitóticas bem como as alterações presentes nas mesmas. Após as análises observou-se que o efluente, após serem submetidos a um tratamento com fungos, ainda apresentavam potencial genotóxico, citotóxico e mutagênico, mesmo estando com a cor e os parâmetros físico-químicos de acordo com legislação.

Palavras-chave: Toxicidade. Biotratamento. Efluente Têxtil. *Allium cepa*.

INTRODUÇÃO

Os processos têxteis são grandes consumidores de água e de corantes sintéticos, geradores de efluentes volumosos e complexos com elevada carga orgânica, aliada ao elevado teor de sais inorgânicos (CEGARRA, 2000). Quando lançadas num curso d'água, os corantes sintéticos provocam graves danos ambientais. A presença de apenas um miligrama de corante por litro de água é suficiente para colorir, pelo menos, parcialmente um manancial. Como resultado, a luz solar deixa de atingir as plantas aquáticas, impedindo a fotossíntese e adequada reprodução. Como consequência, os peixes têm a oferta de alimentos e oxigênio reduzida (DURRANT, 2003).

Os vegetais superiores apresentam características que os tornam excelentes modelos genéticos para avaliação de poluentes ambientais, por isso têm sido utilizados com muita frequência em estudos de monitoramento. Contudo, este destaque não se deve, apenas, à sensibilidade de detecção de mutágenos em diferentes ambientes, mas também à possibilidade de utilização de diferentes células e órgãos como biomarcadores genéticos, capazes de detectar desde mutações pontuais até as aberrações cromossômicas (GRANT, 1994).

Segundo Leme e Marin-Morales (2009), existem poucos estudos na literatura para verificar o perigo dos corantes presentes no efluente têxtil utilizando vegetais superiores como organismos testes. Todavia, os poucos relatos encontrados na literatura relatam a sensibilidade de testes utilizando *Allium cepa* para medir essa classe de poluentes (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; VENTURA, 2009).

Apesar dos poucos relatos na literatura, alguns trabalhos relatam que os teste utilizando as espécies de *Allium cepa* tem sido considerado um bioensaio eficiente na detecção de agentes mutagênicos (FISKESJSO, 1985; MATSUMOTO et al., 2006). Esta característica é devido à cinética de proliferação e disposição dos cromossomos para este tipo de estudo. Chauhan, Saxena e Gupta (1999) descrevem que testes com *Allium cepa* podem ser rotineiramente utilizados para avaliar o potencial genotóxico de químicos no ambiente, devido à sua sensibilidade e boa correlação com testes realizados com mamíferos.

Devido a isto, este trabalho objetiva avaliar a toxicidade de efluente têxtil não tratado e biotratado pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181 e *Curvularia lunata* URM 6179, utilizando o sistema *Allium cepa* como bioindicador.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Para a investigação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foram analisadas amostras de efluente não tratado, coletado em tanque de armazenamento de uma lavanderia de jeans lotada no município de Caruaru-PE, e tratado em reator aerado por batelada simples, pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179, com 5, 10 e 15 dias de processamento. Para o controle positivo, foi utilizado o herbicida trifluralina na concentração de 0,84 ppm e como controle negativo água ultra pura.

METODOLOGIA

Os ensaios foram conduzido com sementes de *Allium cepa* (variedade Baia Periforme) submetidas, continuamente, à germinação em placas de Petri contendo amostras do efluente não tratado, efluente tratado por cinco, dez e quinze dias pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181, efluente tratado por cinco, dez e quinze dias pelo fungo *Curvularia lunata* 6179 e aos controles positivo e negativo.

Após cinco dias de exposição das sementes às amostras de efluente não tratado, tratados pelos fungos nos diferentes tempos e aos controles positivo e negativo, foram coletadas raízes com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, sendo as mesmas fixadas, em Carnoy 3:1. O meristema da raiz foi utilizado para confecção das lâminas e avaliação do potencial tóxico das amostras, pelos testes de aberração cromossômica e aberração nuclear.

As lâminas foram cuidadosamente preparadas, após uma lavagem cuidadosa do material, como descrito por Matsumoto et al. (2006) e coradas pela reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978), conforme descrito a seguir: os meristemas previamente fixados em Carnoy (3:1) foram lavados com água destilada, em três baterias de cinco minutos cada. O material foi então hidrolizado em HCl 1N a 60°C por 10 minuto, seguidos de novos banhos de cinco minutos em água destilada. O excesso de água foi removido das raízes com papel de filtro, As raízes foram transferidas para uma câmara escura em frascos contendo reativo de Schiff, por aproximadamente 2h.

Após este período, as sementes foram novamente lavadas, até a total retirada do reagente. As lâminas foram então preparadas com uma gota de ácido acético (45%) e com carmin acético (2%) e posteriormente, recoberta com uma lâmínula. As lâmínulas foram cuidadosamente removidas em nitrogênio líquido e as lâminas foram montadas em Entelan e examinadas em microscópio de luz.

Índice de Germinação

O índice de germinação foi calculado atarvés da fórmula descrita abaixo, para verificação da toxicidade das amostras de efluente não tratado e do efluente biotratado. Os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo, por meio do teste estatístico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

$$\text{Índice de Germinação} = \frac{\text{Número Total de Células que Germinaram} \times 100}{\text{Total de Sementes Expostas ao Tratamento}}$$

Potencial Citotóxico, Genotóxico e Mutagênico

A citotoxicidade foi avaliada por meio do índice mitótico, que indica a quantidade de células em divisão. A inibição dessas células, em geral, não leva o organismo a morte, mas pode interferir no seu desenvolvimento, caracterizando assim um efeito citotóxico. Esses efeitos foram observados nas células meristemáticas e expressos em percentual calculado de acordo com a equação:

$$\text{Índice Mitótico} = \frac{\text{Número Total de Células em Divisão}}{\text{Total de Células Observadas}} \times 100$$

(IM)

Para a avaliação do potencial genotóxico, foram observados e quantificados todos os tipos de aberrações cromossômicas e nucleares encontradas nas células meristemáticas de todas as lâminas em todos os tratamentos. Estas alterações podem não ser definitivas, porém indica que a substância tem ação sobre o material genético. Os valores em percentual foram calculados de acordo com a fórmula abaixo descrita.

$$\text{Índices de Alterações Cromossômica} = \frac{\text{Número Total de Células Alteradas} \times 100}{\text{Total de Células Observadas}}$$

(IAC)

A análise dos efeitos mutagênicos foi feita por meio da observação e contagem de células com quebras cromossômicas, da região meristemática. As quebras cromossômicas também devem ser classificadas como aberrações cromossômicas (AC) mutagênicas, pois evidenciam uma ação direta de um dado agente sobre a molécula de DNA, promovendo assim a fragmentação do mesmo, porção esta que não mais terá função transcritiva na célula. Essas alterações foram registradas para todas as lâminas de todos os tratamentos e os valores calculados através da fórmula descrita abaixo.

$$\text{Índice de Mutagenicidade} = \frac{\text{Número total de células alterada} \times 100}{\text{Total de células observadas}}$$

(IMt)

Todos os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo, por meio do teste estatístico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Índice de Germinação

Na tabela 1 pode se observar o índice de germinação das amostras estudadas em relação ao controle negativo. Quando comparado ao controle negativo, as amostras de efluente tratadas pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 por dez dias, demonstraram uma diminuição da germinação das sementes de *Allium cepa*, diferença esta estatisticamente significativa, indicando uma toxicidade, provavelmente, devido à presença de substâncias formadas ao longo do tratamento do efluente têxtil pelos fungos.

Tabela 1 – Percentual (%) do Índice de Germinação das sementes de *Allium cepa* expostas a amostras do efluente puro e biotratadas pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 ao longo de 15 dias em reator aerado.

Experimentos	CN	CP	Efluentes não tratados	Efluentes não tratados <i>P. chrysosporium</i>			Efluentes tratados por <i>C. lunata</i>		
				T5	T10	T15	T5	T10	T15
1	74	45	73	71	42*	76	72	43*	65
2	88	43	61	69	36*	66	73	36*	65

*Amostras com $P < 0,05$.

Potencial Citotóxico, Genotóxico e Mutagênico

Para se obter o índice mitótico, foram contadas 5000 células (500 células para cada uma das dez lâminas). A tabela 2 mostra o Índice Mitótico (IM) para células examinadas das repetições 1 e 2 de cada amostra. O efluente não tratado se mostrou um agente citotóxico pois apresenta um índice mitótico (7,3% e 7,4%) estatisticamente superior ao controle negativo (5,5% e 6,5%), nos dois experimentos. O efluente tratado pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181, após dez dias de processo, também demonstrou potencial citotóxico estatisticamente significativo em relação ao controle negativo, para o experimento dois (7,3%).

Tabela 2 – Índices Mitóticos de células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a amostras de efluente puro e do efluente biotratado pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* URM 6179 ao longo de 15 dias em reator aerado.

Experimentos	CN	CP	Efluentes não tratados	Efluentes não tratados			Efluentes tratados por		
				<i>P. chrysosporium</i>			<i>C. lunata</i>		
				T5	T10	T15	T5	T10	T15
1	5,5±0,6	5,3±0,7	7,3*±0,9	5±0,6	4,4±0,4	4,9±0,6	5,1±0,4	5±0,6	5,2±0,5
2	6,5±0,7	5,4±0,7	7,4*±0,9	7,3*±0,5	6,3±0,8	4,6±0,5	5,6±0,5	6,7±0,7	4,9±0,4

*Amostras com $P < 0,05$.

Os Índices de Alteração Cromossômica (IAC), que indicam o potencial genotóxico das amostras do efluente não tratado e do efluente biotratado, pode ser visualizada na tabela 3. Todas as amostras estudadas, com exceção do efluente tratado pelo fungo *C. lunata* URM 6179 com 15 dias de processo, apresentaram potencial genotóxico, estatisticamente significativo em relação ao controle negativo. Pode-se destacar o efluente não tratado e o efluente tratado pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 após dez dias, que apresentaram valores bem acima do controle negativo.

Tabela 3 – Índices de Alterações Cromossômicas das células meristemáticas de *Allium cepa* expostas em amostras do efluente puro e do efluente biotratado pelos fungos *P. chrysosporium* URM 6181 e *C. lunata* 6179 ao longo de 15 dias em reator aerado.

Experimentos	CN	CP	Efluentes não tratados	Efluentes não tratados			Efluentes tratados por		
				<i>P. chrysosporium</i>			<i>C. lunata</i>		
				T5	T10	T15	T5	T10	T15
1	0	1,7*±0,1	1,16*±0,6	0,36*±0,01	1*±0,2	0,22*±0,01	0,38*±0,01	0,08*±0,01	0
2	0	4,02*±0,3	0,88±0,02	0,18±0,01	0,94*±0,1	0,20*±0,01	0,28*±0,02	0,14*±0,02	0,2±0,05

*Amostra com $p < 0,05$.

Na tabela 4 pode-se observar o Índice de Mutagenicidade (Imt) das amostras estudadas. Os dados mostram que o efluente após dez dias de tratamento com o fungo *P. chrysosporium* URM 6181 e o controle positivo apresentam potencial mutagênico, enquanto o efluente puro e o efluente tratado pelo fungo *C. lunata* URM 6179 não apresentaram potencial mutagênico. Embora a legislação brasileira determine que o efluente de indústria têxtil está pronto para ser lançado em corpos hídrico quando este estiver sem cor, desde que esteja dentro dos parâmetros previstos de Demanda Química de Oxigênio, Demanda Bioquímica de Oxigênio e Carbono Orgânico Total, os estudos de alteração cromossômica demonstram a necessidade de uma maior investigação dos efeitos dessas substâncias no ambiente, mesmo obedecendo a esses parâmetros da legislação atual.

Tabela 4 – Índices de Mutagenicidade das células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a amostras do efluente puro e do efluente biotratado pelos fungos *P. chrysosporium* e pelo *C. lunata* ao longo de 15 dias em reator aerado.

Experimentos	CN	CP	Efluentes não tratados	Efluentes não tratados			Efluentes tratados por		
				<i>P. chrysosporium</i>			<i>C. lunata</i>		
				T5	T10	T15	T5	T10	T15
1	0	0,16*±0,03	0,08±0,01	0,04±0,01	0,3*±0,04	0,02±0,01	0	0	0
2	0	0,3*0,01	0	0	0,16*±0,01	0	0	0	0

*Amostra com $p < 0,05$.

Tabela 5 – Número de aberrações cromossômicas obtidas nos testes com *Allium cepa* nas amostras estudadas

Aberrações	Repetições	CN	CP	Efluente não tratado	Efluente tratado pelo fungo <i>P. chrysosporium</i> URM 6181			Efluente tratado pelo fungo <i>C. lunata</i> URM 6179		
					T5	T10	T15	T5	T10	T15
					AP	1	0	10	12	1
	2	0	10	7	1	7	3	1	1	0
MP	1	0	26	36	11	31	6	7	1	0
	2	0	28	29	2	25	1	6	3	0
MA	1	0	28	0	0	2	0	0	0	0
	2	0	8	0	0	0	0	0	0	0
MQ	1	0	8	4	2	15	0	0	0	0
	2	0	15	0	0	9	0	1	0	0
TA	1	0	14	6	4	10	3	4	2	0
	2	0	13	6	4	9	7	5	0	0
TP	1	0	9	2	2	5	1	6	0	0
	2	0	18	1	2	5	0	1	3	1
Total de células	1	273	281	367	248	219	244	245	254	255
mitóticas observadas	2	331	282	281	215	272	231	306	333	243
Total de células com alteração (TCA)	1	0	95	60	20	69	12	19	3	0
	2	0	92	43	9	55	11	14	7	1

AN, anáfase com ponte; MP, metáfase com perda; MA, metáfase com aderência; TA, telófase com atraso; MQ, metáfase com quebra; TA, telófase com atraso; TP, telófase com ponte.

Na tabela 5 pode-se observar que a amostra do efluente não tratado e do efluente tratado pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 com dez dias apresentam mais alterações do tipo metáfase com perda que o controle positivo. Além disso, o efluente tratado com o fungo *P. chrysosporium* URM 6181 também apresentou um maior número de alterações do tipo metáfase com quebra que o controle positivo.

DISCUSSÃO

O potencial citotóxico de uma substância pode ser determinada de acordo com o aumento ou a diminuição do índice mitótico (IM), no qual deverá ser utilizado como parâmetro de citotoxicidade em estudos de biomonitoramento de tratamentos empregados em

efluentes industriais (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). O percentual de Índice mitótico mais baixo que o controle negativo, indica que o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto estão sendo alterados pelo composto em estudo. Por outro lado, um percentual de índice mitótico maior que o do controle negativo, pode indicar um aumento na divisão celular, o que sugere a proliferação desorganizada e possível formação de um tumor (HOSHINA, 2002).

Neste estudo, os ensaios foram conduzidos a fim de verificar anormalidades no processo de divisão celular e com isso estimar o potencial de indução de aberrações cromossômicas para amostras de efluente textil não tratado e biotratado por fungos. O herbicida trifuralina foi utilizado como controle positivo, devido a sua conhecida eficiência em causar alterações cromossômicas.

As alterações mais comuns encontradas neste trabalho foram metáfases com perda, seguida de anáfases com ponte, indicando que as amostras estudadas possuem efeitos aneugênicos e clastogênicos. C-metáfases são evidências da ação aneugênica de uma substância, uma vez que proporcionam a completa inativação do fuso mitótico das células (FISKESJO, 1993). Segundo Brinkley e Humphrey (1969), as pontes cromossômicas que aparecem na anáfase podem ser decorrentes de trocas estruturais ocorridas, anteriormente, entre cromátides de um mesmo cromossomo ou entre as cromátides de dois cromossomos distintos.

Corroborando com nosso trabalho, Caritá e Marin-Morales (2008) encontram alterações da mesma natureza ao analisar a toxicidade de amostras de água de um rio da região metropolitana de São Paulo, que recebia efluente de uma indústria têxtil e cujas águas servem como fonte de abastecimento para população de Cajamar, SP, Brasil. Da mesma maneira, Jadhav et al. (2010), analisaram a toxicidade de efluente textil não tratado e após tratamento com um consórcio bacteriano, por meio do sistema *Alluim cepa*, e observaram uma diminuição da genotoxicidade do efluente.

As quebras cromossômicas também devem ser classificadas como aberrações cromossômicas (AC) mutagênicas, pois evidenciam uma ação direta de um dado agente sobre a molécula de DNA, promovendo assim a fragmentação do mesmo, porção esta que não mais terá função transcritiva na célula (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A análise da citotoxicidade e do índice de germinação também são fatores importante na valiação da qualidade de substâncias a serem lançadas no ambiente. Radic et al. (2010), monitorando a qualidade de efluente lançado em um rio na Croácia, também verificaram uma alta toxicidade da substância, após constatar um alto índice de alterações cromossômica em

células de *Allium cepa*, em comparação com o controle negativo. Os autores verificaram uma diminuição de 50% no índice de germinação das sementes, assim como um aumento de 40% no índice mitótico, confirmando a toxicidade do efluente testado.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, observou-se que o efluente, após serem submetidos a um tratamento com fungos, ainda apresentavam potencial genotóxico, citotóxico e mutagênico, mesmo estando com a cor e os parâmetros físico-químicos de acordo com legislação. As alterações cromossômicas observadas nas amostras tratadas pelos fungos demonstram a necessidade de se utilizar técnicas de bioensaio para o monitoramento de efluentes industriais, após passar por estações de tratamento.

7 CONCLUSÕES

- a) O efluente pode ser degradado em condições aeróbias, apresenta compostos fenólicos e corante índigo em sua constituição,
- b) Os fungos *P. chrysosporium* CCT 1999, *L. edodes* CCT 4519, *C. lunata* UFPEDA 885 e *Aspergillus* sp. F75 apresentaram capacidade de descolorir o efluente nas condições estática e agitada,
- c) Após otimização das condições do processo os fungos *P. chrysosporium* CCT 1999 e *C. lunata* UFPEDA 885 se apresentaram como mais promissores no tratamento de efluente têxtil,
- d) Foi observado perfil de fragmentação semelhantes ao índigo nas amostras biotratadas por *P. chrysosporum* e *C. lunata* após 10 dias,
- e) Foi gerado um fragmento diferenciado na amostra biotratada pelo *P.chrysosporum* o qual está sendo investigado,
- f) Ambos os fungos selecionados apresentam um potencial de produção maior para a enzima lacase,
- g) A amostra *P. chrysosporium* T10 apresenta maior mutagenicidade que o efluente puro, não sendo ambientalmente compatível,
- h) O fungo *C. lunata* demosntrou maior eficiência no biotratamento de efluente têxtil por não gerar amostras tóxicas ao degradar o corante presente no efluente.

8 PERSPECTIVAS

- a) Realizar ensaios de biotratamento de efluente têxtil com os microrganismos em consórcio,
- b) Otimizar as condições para a produção das enzimas lignolíticas,
- c) Investigar a produção de outras enzimas envolvidas no processo como a Peroxidase independente do manganês e oxigenases,
- d) Escalonar o biotratamento de efluente têxtil para escala piloto,
- e) Investigar quais metabólitos secundários que estão sendo formados na degradação de efluente têxtil pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181,
- f) Investigar a influência do efluente na estrutura celular dos fungos.

REFERÊNCIAS

- ABETA, S.; YOSHIDA, T.E.; IMADA, K. Textile Dyes. **Am. Dyest. Rep.**, v. 20, p. 73, 1984.
- ADOSINDA, M. et al. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bio-accessible reactive azo dyes. **Chemosphere**, v. 52, p. 967-973. 2003.
- ALCANTARA, M. R.; DALTIM, D. A Química do Processamento Têxtil **Química Nova**, v. 19, p. 320, 1996.
- AMBRÓSIO, S.T.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.C. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 69-75, 2004.
- ANASTASI, A. et al. Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3067-3075, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA - ABIQUIM. **Corantes e pigmentos**. 2005. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br>>. Acesso em: 15 nov. 2008.
- BALAN, D.S.L. A Indústria e o meio ambiente, tecnologia limpa e controle ambiental. **Química Têxtil**, v. 66, p. 26-31, 2002.
- BALAN, D.S.L. Biodegradabilidade e toxicidade de efluentes têxteis. **Revista Brasileira de Química Têxtil**, v. 26, p. 54, 1999.
- BALAN, D.S.L.; MONTEIRO, O.R.T.R. Descolorization of Textile Indigo dye by ligninolytic Fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 141-145, 2001.
- BALFOUR-PAUL. **Journal of Indigo**. British Museum Press: London. 1998.
- BANAT, M.B. et al. Microbial Descolorization of Textile-Dye- Containig Effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.
- BARBIERI, S.M. Biodegradação de compostos aromáticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds). **Microbiologia ambiental**. São Paulo: Embrapa-CNPMA, 1997. p. 211-242.
- BARR, D. P.; AUST, S.D. Mechanism White Rot Fungi Use to Degrade Polluants. **Environmental Science Technology**, v. 28, p. 78-87, 1997.
- BECKMANN, W. E.; SEWKOW, U. Textile Waste Dye **Textil Praxis**, v. 4, p. 346, 1991.
- BLANQUEZ, P.; SARRA, A.; VICENT, T. Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions. **Process Biochem**, v. 43, p.1-7, 2008.

- BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p. 32-37, 2010.
- BRINKLEY, B. R.; HUMPHREY, R. M. Evidence for subchromatid organization in marsupial chromossomes. I. Light and electron microscopy of X ray-induced sidearm bridges. **Journal of Cell Biology**, v. 43, p. 827-831, 1969.
- BROWN, M. A.; DEVITO, S. C. Critical Review. **Environmental Science Technology**, v. 23, p. 249, 1993.
- BUSWELL, J. K.; CAI, Y. J.; CHANG, S.T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 128, p. 81-88, 1995.
- CAMPOS, R et al. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 131-139, 2001.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p.722-725, 2008.
- CEGARRA, J. Biotecnologia aplicada aos processos de química têxtil. **Química Têxtil**, v. 5, p. 58, 2000.
- CHANDRAN, C. B.; SINGH, D.; NIGAM, P. Remediation of Textille Effluent Using Agricultural Residues. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 102, p. 207-212, 2002.
- CHAUHAN, L.K.S.; SAXENA, P.M.; GUPTA, S. K. Cytogenetics effects of cypermethrinand fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental. Exponential. Botanic**, v. 42, p.181-189, 1999.
- CHEN, H.; WANG, R. F.; CERNIGLIA, C. E. Molecular cloning over expression, purification and characterization of an aerobic FMN- dependent azoreduction from *Enterococcus faecalis*. **Protein Experience of Purification**, v. 34:, p. 302-310, 2004.
- CHULHWAN, P. et al. Decolorization of three cid dyes by enzymes from fungal strains. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 14, p. 1190-1195, 2004.
- CLARKE, E. A.; STEINLE, D. Health and environmental safety aspects of organic colorants. **Journal of Society Dyes Colors**, v. 25, p. 5, 1995.
- COLOUR INDEX. **Product from this Manufacturer**. 2009. Disponível em: <<http://www.colour-index.org/default.aspx?page=newusr4>>. Acesso em: 15 jan. 2009.
- CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **DOU**, Brasília, n. 53, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-6.
- CONDEPE. FIDEM. Agência Estadual de Planejamento e Pesquisa de Pernambuco. Disponível em: <www.condepefidem.pe.gov.br>. Acesso em: 15 nov. 2008.

COTTA, J.A.; REZENDE, M.O.O.; PINOVAI, M.R. Avaliação do teor de metais em sedimento do rio Betari no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira – PETAR. **Química Nova**, v. 29, p. 40-45, 2006.

DANESHVAR, N.; ASHASSI-SORKHABI, H.; TIZPAR, A.R. Decolorization of Orange II by Eletrocoagulation Methods. **Separation Purification Technology**, v. 31, p. 153-162, 2003.

DAWKAR, V.V. et al. Efficient industrial dye decolorization by *Bacillus* sp. VUS with its enzyme system. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2010.
doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.002.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R.; BALAN, D. S. L. Biodegradação de Corantes Têxteis. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa, 2008. p. 321-338.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoxidase-like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: a Review. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 28, p. 83-99, 2000.

DURRANT, L. R. Fungos e bactérias degradam corantes poluidores. **Jornal da Unicamp**, n. 3, 2003.

EPOLITO, W. J. et al. Characterization of the Textile Anthraquinone Dye Reactive Blue 4. **Dye and Pigment**, v.67, p. 35-46, 2005.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S. et al. Cometabolic Decolorization of the Reactive Azo Dye Orange II by *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. **Textile Research**, v. 79, p. 1266-1273, 2009.

FAHL, P. et al. Biosorção do Corante Azóico “Acid Yellpw 25” por *Aspergillus oryzae* Paramorfogênico. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 71, p. 132-134, 2004.

FALZONI, J. Relationship between grain colour and preharvest sprouting-resistance in wheat. **Review Program Coloration**, v. 25, p. 64, 1995.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FERREIRA, O. P. **Desenvolvimento de materiais porosos biodimensionais, à base de Al³⁺ e M²⁺ (Zn, Mg), para uso na remediação de efluentes de indústrias têxteis**. 2001. 132 p. Dissertação (Mestrado) – Laboratório de Química do Estado Sólido – LQES, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

FISKESJO, G. Technical Methods section. *Allium* test I: A 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology And Water Quality**, v. 8, p. 461-470, 1993.

- FISKESJO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.
- FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of Synthetic Dyes from Wasterwaters: a Review. **Environmental International**, v. 30, p. 953-971, 2004.
- GILLAM, E.M.J. et al. Stereospecific Inhibition of CETP by Chiral *N,N*-Disubstituted Trifluoro-3-amino-2-propanols **Biochemistry**, v. 39, p.13870, 2000.
- GOMES, E. et al. Ligninases Production by Basidiomycetes Strains on Lignocellulosics Agricultural Residues and their Application in the Decolorization of Synthetic Dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 31- 39, 2009.
- GOMES, J. R. **Estrutura e propriedade dos corantes**. Braga: Universidade do Minho, 2001.
- GORINI, A.P.F. Panorama do setor têxtil no Brasil e no mundo: reestruturação e perspectivas. **BNDS Setorial** Rio de Janeiro, 2000.
- GOU, M. et al. Azo dye decolorization by a new fungal isolate, *Penicillium* sp. QQ and fungal-bacterial cocultures. **Journal of Harzard Material**, v.170, p. 314-319, 2009.
- GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in Allium. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.
- GRANT, W.F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and genemutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, v.426, p.107-112, 1999.
- GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p.175-185, 1994.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes Têxteis. **Quimica Nova**, v. 23, p. 71-78, 2000.
- GUGLIOTTA, A. M. et al. **Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium**. Orlando, USA. 2003.
- HASSEMER, M.E.N. et al. Resíduos: Soluções à Vista?. **Saneamento Ambiental**, v. 28, p. 81, 2001.
- HE, F.; HU, W.; LI, Y. Biodegradation Mechanisms and Kinetics of Azo Dye 4BS by a Microbial Consortium. **Chemosphere**, v. 57, p. 293-301, 2004.
- HE, Z. et al. Res. Phosphorus Sequestration by Chemical Amendments to Reduce Leaching from Wastewater Applications **Journal of Environmenatl. Quality**, v. 35, p. 4, 2006.
- HOLCAPEK, M.; VOLNA, K.; VANERKOVA, D Dye adsorption on biosolid adsorbents and commercially activated carbon. **Dyes and Pigments**, 75, p. 56-165, 2007.

HOSHINA, M. M. **Evaluation of a Possible Contamination of the Waters of the Claro River – Municipality of Rio Claro, Part of the Corumbataí River Basin, with the Mutagenicity Tests Using *Allium cepa***. 2002. 52f. Monograph (Bachelor's and Teaching degrees) – State University of São Paulo, Rio Claro, SP (in Portuguese). 2002.

HUNGER, K. Effluent Dye. **Chimia**, v. 48, p. 520, 1994.

IBANEZ, J.G.; SING, M.M.; SZAFRAN, Z. Laboratory Experiments on the Electrochemical Remediation of Environment. Part 4: Color Removal of Simulated Wastewater by Electrocoagulation-Electroflotation. **Journal of Chemical Education**, v. 75, p. 1040, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Perfil dos municípios brasileiros**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/perfil do municípios brasileiros](http://www.ibge.gov.br/perfil%20dos%20munic%C3%ADpios%20brasileiros)>. Acesso em: 3 fev. 2009.

JADHAV, J. P. et al. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 165-173, 2010.

JADHAV, J. P. et al. Decolorization of azo dye, methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**, v. 68, p. 394-400, 2007.

JAROSZ-WILKOLAZKA, A. et al. Fungi and their Ability to Decolourize Azo and Anthraquinonic Dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 566-572, 2002.

JORNAL DO COMÉRCIO. Pólo de Lavanderia de Jeans no Agreste de Pernambuco, Caderno Cidades, p. 8, 2007.

KANDELBAUER, A.; GUBITZ, G.M.. Current Strategies for Enzymatic and Microbial Treatments of Textile Effluents. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA TÊXTIL, 2001, Blumenau. **Anais...** Santa Catarina: Seminário Internacional de Aplicação da Biotecnologia na Indústria Têxtil, 2001. p.83-99.

KARGI, F.; OZMIHCI, S. Biosorption Performance of Powdered Activated Sludge for Removal of Different Dyestuffs. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 267-271, 2004.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential **Environmental International**, v. 35, p. 127-141, 2009.

KEHARIA, H.; MADAMWAR, D. Bioremediation concepts for treatment of dye containing wastewater: a review. **Indian Journal of Exploration Biological**, v. 41, p.1068-1075, 2003.

KHALAF, M.A. Biosorption of Reactive Dye from Textile Wastewater by non-viable biomass of *Aspergillus niger* and *Spirogyra* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6631-6634, 2008.

KHOUNI, I.; MARROT, B.; AMAR, R. B. Decolourization of the Reconstituted Dye Bath Effluente by Commercial Laccase Treatment: Optimization through Responde Surface Methodology. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 121-133, 2010.

KIM, T. H. et al. Decolorization of Dye Solutions by a Membrane Bioreactor (MBR) Using White-Rot Fungi. **Desalination**, v. 168, p. 287-293, 2004.

KNAPP, J.; NEWBY, P. S.; RECCO, L. P. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 17, p. 664, 1995.

KODAM, K.M. et al. Microbial Decolorization of Reactive Azo Dyes Under Aerobic Conditions. **Word Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 21, p. 367-370, 2005.

KUDLICH, M. et al. Localization of the Enzyme System Involved in Anaerobic Reduction of Azo Dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and Effect of Artificial Redox Mediators on the Rate of Azo Dye Reduction. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3691-3694, 1997.

KUMAR, K. et al. Decolorization, biodegradation and detoxification of benzidine based azo dye. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 407-413, 2006.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências no tratamento de Efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, p. 78-82, 2002.

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letter**, v. 169, p. 247-250, 1984.

LANGE, C.R.; SOUZA, A.A.U.; SOUZA, S.M.A.U. Estudo das Condições Operacionais do Processo de Tingimento de Fibra Mista Acrílico/Algodão em Bobina Cruzada. **Química Têxtil**, v. 73, p. 12-17, 2005.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A.M. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.

LEVAN, A. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. **Nature**, v. 156, p. 751-752, 1945.

LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.

LIAU, B.C. et al. Short communication LC-APCI-MS method for detection and analysis of tryptanthrin, indigo, and indirubin in Daqingye and Banlangen **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analls**, v. 43, p. 346-351, 2007.

LIBRA, J. A. et al. Two stage biological treatment of a diazo reactive textile dye and the fate of the dye metabolites. **Chemosphere**, v.56, p.167-180, 2004.

LIN, S.H.; CHEN, M.L. Treatment of Textile Wastewater by Chemical Methods for Reuse. **Water Resourse**, v.31, p. 868-876, 1997.

LONGHINOTTI, E. et al. Adsorption of Anionic Dyes on the Biopolymer Chitin. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 435-440, 1998.

LUBS, H. A. **The Chemistry of Synthetic Dyes and Pigments**. Monograph Series Krieger: Malabar, 1995. p. 555.

MAAS, R.; CHAUDHARI, S. Adsorption and Biological Decolorization of Azo Dye Reactive Red 2 in Semicontinuous Anaerobic Reactors. **Process Biochemical**, v. 40, p. 699-705, 2005.

MACEDO, J.C.; SILVA, E.P. Inovações na Estamparia com Pigmentos. **Química Têxtil**, v. 69, p. 28-38, 2002.

MACHADO, K. M.G.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Ligninolytic Enzymes Productions and Remazol Brilliant Blue R decolorization by Tropical Brazilian Basidiomycetes Fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252, 2005.

MACHUCA, A.; AOYAMA, H.; DURAN, N. Isolation and Partial Characterization of an Extracellular Low-Molecular Mass Component with High Phenoloxidase Activity from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 256, p. 20-26, 1999.

MAHAMOUED, E. K. Cement Kiln Dust and Coal Filters Treatment of Textile Industrial Effluents. **Desalination**, v. 225, p.175-178, 2010.

MANGOLD, J. Effluent Dyes Review. **Calquim**, v. 34, 1995.

MANIMEKALAI, R.; SWAMINATHAN, T. Removal of hazardous compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 29-33, 2000.

MANU, B.; CHAUDHARI, S. Anaerobic Descolorization of Simulated Textile Wastewater Containing Azo dyes. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 225-231, 2002.

MARTINS, M. A.M. et al. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 91-98, 2001.

MATSUI, M.; SHIBATA, K. E.; TAKASE, Y. Effluent Dyes and Environmental Safety. **Dyes and Pigment** 5:321. 1984.

MATSUMOTO, S.T. et al. Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in *Allium cepa*. **Genetic Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MAZZEO, D. E. C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, Rio Claro, 2009.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. The feulgen reaction. **Ciencia Cultura**, v. 30, p. 665-676, 1978.

- MENDEZ-PAZ, D.; OMIL, F., LEMA, J.M. Anaerobic Treatment of Azo Dye Acid Orange 7 Under Batch Conditions. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 36, p. 264-272, 2005.
- MEYER, U. Biodegradation of Synthetic Organic Colorants. In: BROWN, A.W. A. (Ed). **Ecology of Pesticides**. New York; John Willey & Sons, 1978. 525p.
- MIN, G. et al. Azo dye decolorization by a new fungal isolate, *Penicillium* sp. QQ and fungal-bacterial cocultures. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 314-319, 2009.
- MONTEIRO, D. C. F.; SANTOS, A. M. M. M. Cadeia têxtil: estruturas e estratégias no comércio exterior. **BNDS setorial**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 113-136, 2002.
- NEAMTU, M. et al. Kinetic of Decolorization and Mineralization of Reactive Azo Dyes in Aqueous Solution by UV/H₂O. **Dyes and Pigments**, v. 53, p. 93-99, 2002.
- NIEBISCH, C. H. et al. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazard Material**, v. 180, p. 316-322, 2010.
- O'NEILL, C. et al. Anaerobic-aerobic Biotreatment of Simulated Textile Effluent Containing Varied Ratios of Starch and Azo Dye. **Water Resource**, v. 34, p. 2355-2361, 2000.
- O'NEILL, C. et al. Colour in Textile Effluents-Source, Measurement, Discharge Consents and Simulation: a review. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 74, p. 1009-1018, 1999.
- OLIVEIRA, J. R.; SOUZA, R. R. Biodegradação de efluentes contendo corantes utilizados na indústria têxtil. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA. 2003. **Anais...** Aracajú, SE, 2003.
- OSSES, R. et al. **Conference Biotechnology Pulp Paper Industrial. Proc. 7th Interational**. 1998. p. 227.
- PARALES, R.E.; HADDOCK, J. D. **Biocatalytic degradation of pollutants**. 2004.
Disponível em:
<<http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=20043179808>>. Acesso em: 15 nov. 2008.
- PARSHETTI, G. K. et al. Decolorization and Detoxification of Sulfonated Azo Dye Methyl Orange by *Kocuria rosea* MTCC 1532. **Journal of Hazardous Material**, v. 176, p. 503-509, 2010.
- PARSHETTI, G.K. et al. Biodegradation of Reactive Blue – 25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM- 1146. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3638-3642, 2007.
- PEARCE, C.I.; LLOYD, J.R.; GUTHRIE, J.T. The Removal of Colour from Textile Wastewater Using Whole Bacterial Cells: a Review. **Dyes and Pigments**, v. 58, p. 179-196, 2003.

PINHEIRO, H. M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatics Amines from Azo Dye Reduction: Status Review with Emphasis on Direct UV Spectrophotometric Detection in Textile Industry wastewater. **Dyes and Pigment**, v. 61, p.121-139, 2004.

PRIGIONE, V. et al. Biosorption of Simulated Dyed Effluents by Inactivated Fungal Biomasses. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3559-3567, 2008.

QMCWEB. **Corantes**: A química nas cores. 2004. Disponível em: <<http://quark.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html>>. Acesso em: 15 nov. 2008.

RADHA, K.V. et al. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. **Process Biochemical**, v. 40, p. 3337-3345, 2005.

RADIC, S. et al. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1228-1233, 2010.

RAFOLS, C.; BARCELO, D.. **Journal of Chromatographic**, v. 777, p.177 – 192, 1997.

RANZANI, M. R. T. C.. 2002. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002

REGINA, M., et al. Influence of Stationary and Bioreactor Cultivation on *Lentinula edodes* (Berk) Pegler Lignocellulolytic Activity. **Brazilian Archives and Biology and Technology**, v. 51, p. 223- 233, 2008.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores “in vivo”. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Eds.). **Mutagênese ambiental**. Ulbra, Canoas, 2003. p. 201-219.

ROBINSON, T. et al. Remediation of Dye in Textile Effluent: a Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. **Current Microbiology**, v. 38, p. 27-32. 1999.

ROSA, J.M. Determinação da Cinética de um Tingimento em Poliamida: Um exemplo de como tomar ações preventivas. **Química Têxtil**, v.72, p. 26-34, 2003.

ROSOLEN, L.A. et al. Biodegradação de Efluentes Têxteis e Nove Corantes Técnicos Utilizando Fungos Basidiomicetos. **Química Têxtil**, v. 76, p. 44-52, 2004.

SACHIN, B.; NAYAR, H. S.. **Dyes and Pigments**, v. 79, p. 89-100, 2008.

SALIBA, R. et al. The Use of Eucalyptus Barks for the Adsorption of Heavy Metal Ions and Dyes. **Adsorption Science Technology**, v. 20, p. 119-129, 2002.

- SANTOS, A. B. et al. Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, p. 42-52, 2005.
- SANTOS, W.V. Tingimento com corantes polifuncionais de nova geração em lavanderias. **Química Têxtil**, v. 72, p. 5-6, 2003.
- SEBRAE/PE. **Confecção em Pernambuco**. Disponível em: < <http://www.sebraepe.com.br>>. Acesso em: 13 jun. 2009.
- SEDIGHI, M.; KARIMI, A.; VAHABZADEH, F. **Journal of Hazardous Materials**, v. 30, p. 1-3, 2009.
- SELCUK, H. Decolorization and Detoxification of Textile Wastewater by Ozonation and Coagulation Process. **Dye and Pigments**, v. 64, p. 217-222, 2005.
- SEMAN, R. C. et al. Aerobic Degradation of a Mixture of Azo Dye in a Packed Bed Reactor Having bacteria-coated Laterite Pebbles. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 647-651, 2003.
- SHARMA, D. K. et al. Biological treatment of textile dye acid violet-17 by bacterial consortium in an up-flow immobilized cell bioreactor. **Letters Applied Microbiology**, v. 38, p. 345-350, 2004.
- SHEDBALKAR, U.; DHANVE, R.; JADHAV, J. Biodegradation of Triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, p. 472-479, 2008.
- SILVA, M.F. **Descoloração de Efluentes Têxteis por Bactérias Isoladas de Ambientes Contaminados por Petroderivados**. 2008. Monografia de conclusão de curso.
- SLOKAR, Y. M.; LE MARECHAL, M. Methods of Decoloration of Textile Wasterwater. **Dye and Pigments**, v. 37, p.335-356, 1998.
- SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2397, 1992.
- SRINIVASAN, S. V.; MURTHY, D.V.S. Statistical Optimization for Decolorization of Textile Dyes Using. **Trametes versicolor**. v. 165, p. 909-914, 2009.
- STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied and Microbial Biotechnology**, v. 56, p. 69-80, 2001.
- SUDHAKAR, R.; NINGE-GOWDA, K.N.; VENU, G. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 66, p. 235-239, 2001.
- SUE, H. C.; SEUNG-HYEON, M.; MAN, B.G. Biodegradation of chlorophenols using the cell-free culture broth of *Phanerochaete chrysosporium* immobilized in polyurethane foam. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 999-1004, 2000.

- SUN, G.; XU, X. Sunflower stalks as adsorbents for Colour Removal. **Industrial Engineer Chemical Resource**, v. 36, p. 808-812, 1997.
- UZUN, I. Kinetics of the Adsorption of Reactive Dyes by Chitosan. **Dyes and Pigments**, v. 70, p. 76-83, 2006.
- VAN der ZEE, F. P. **Anaerobic Azo Dye Reduction**. Tese de Doutorado, Holanda, 2002.
- VANDEVIVERE, P.V.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W.. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 72, p. 289, 1998.
- VENTURA, B. C. **Investigação da mutagenicidade do azocorante comercial BDCP (black dye commercial product), antes e após tratamento microbiano, utilizando o sistema teste de Allium cepa**. 2009. 196f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.
- VERMA, A.. **New Biotechn**, p. 25S, S86, 2009.
- VIEIRA, D. P. **Facilitadores no processo de inovação tecnológica**. 1995. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.
- VITALI, V.M.V. et al. Screening Mitosporic Fungi for Organochlorides Degradation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 256-226, 2006.
- WANG, C. et al. Ozonation of Azo Dye C.1 Remazol Black 5 and Toxicological Assessment of Its Oxidation products. **Chemosphere**, v. 52, p.1225-1232, 2003.
- WEBER, E.J.; STICHNEY, V.C. **Water Resource**, v. 27, p. 63, 1993.
- YAMANAKA, R. et al. Lignolytic Enzymes Produced by Trametes Villosa CCB176 Under Different Culture Conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 78-84, 2008.
- YINON, J.; BETOWSKI, L.D.; VOYKSNER, R. D. **LC MS techniques for the analysis of dyes**. Amsterdam: Elsevier Science, 2007.
- YUZHU, F.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal Descolorization of Dye Wastewaters: a Review. **Bioresource Technology**, v.79, p.251-262, 2001.
- ZAMORA, P. P. et al. Degradação enzimática de corantes têxteis. **Química Têxtil**, v. 68, p. 32-38, 2002.
- ZANONI, M.V.B.; CARNEIRO, P.A. O Descarte dos Corantes Têxteis. **Ciência Hoje**, v. 29, p. 61-64, 2001.
- ZBAIDA, S. The Mechanism of Microsomal Azoreduction: Predictions Based on Electronic Aspects of Structure-activity Relationships. **Drug Metabolism Review**, v. 27, p. 497-516, 1995.

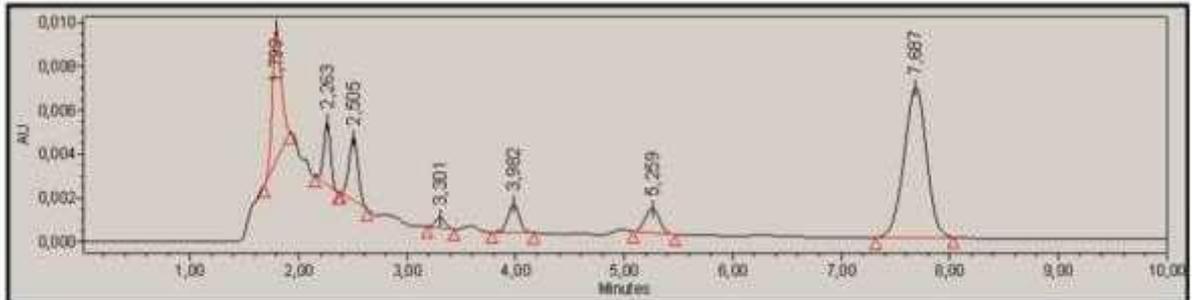
ZHAO, X.; HARDIN, I. R. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. **Dyes and Pigments**, v. 73, p. 322-325, 2007.

ZHOU, W.; ZIMMERMANN, W. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. **FEMS Microbiology Letter**, v. 107, p.157-162,1993.

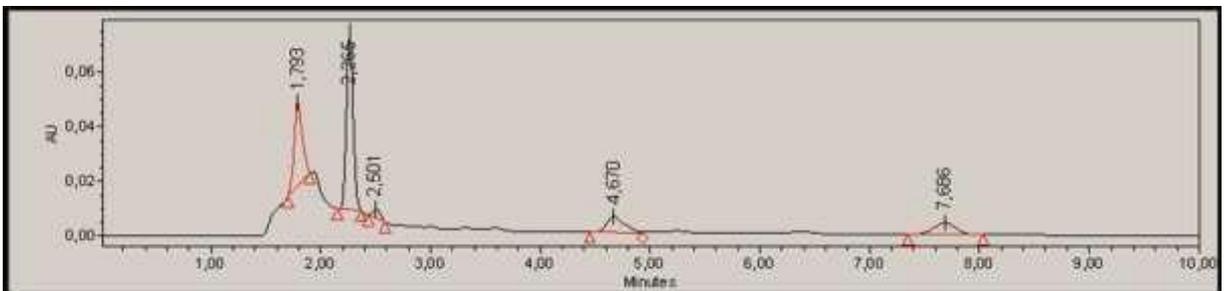
ZISSI, U.; LYBERATUS, G.; PAVLOU, S. Biodegradation of p-aminoazobenzene by *Bacillus subtilis* under aerobic conditions. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 19, p. 49-55, 1997.

APÊNDICE A

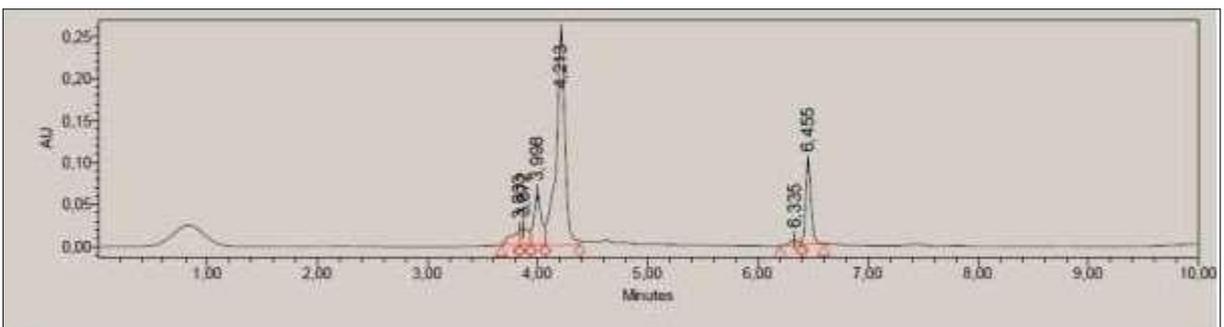
SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA NO SISTEMA CLAE-UV



Espectro do efluente puro no comprimento de onda de 316nm

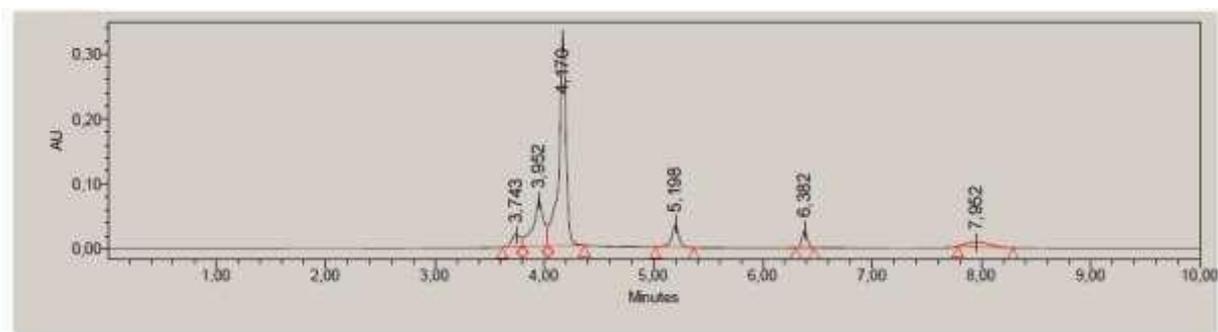


Espectro do efluente puro no comprimento de onda de 254nm

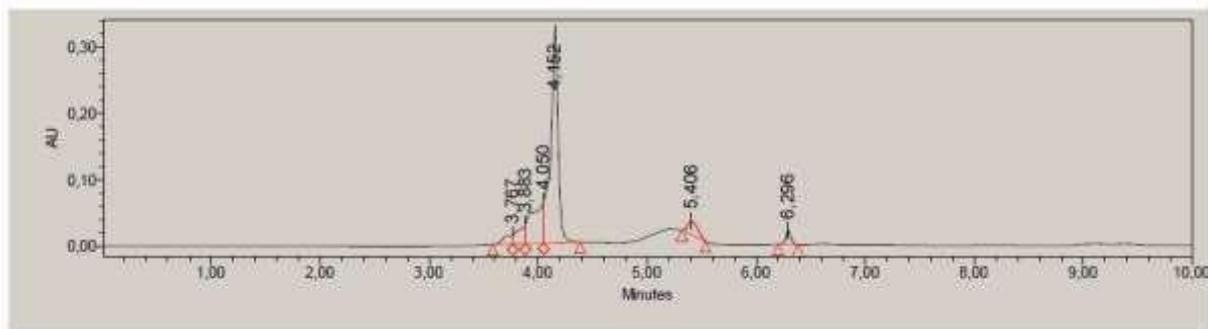


Espectro do efluente puro no comprimento de onda de 316nm otimizado

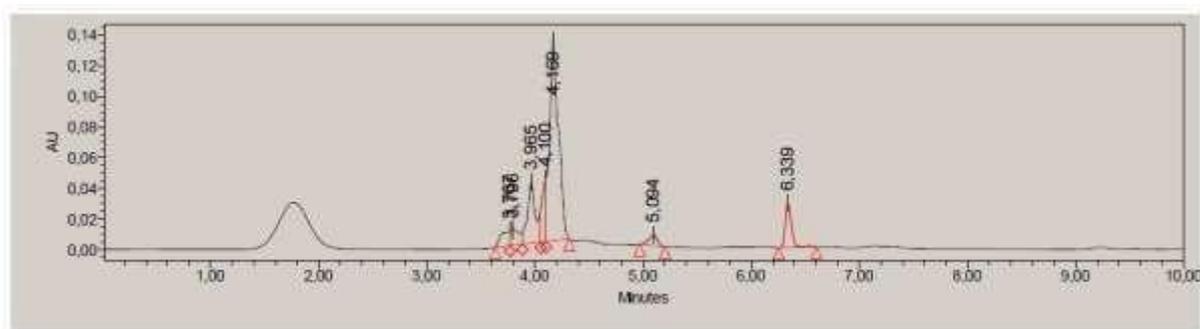
Cromatogramas de Degradação do Corante Índigo após dez dias de tratamento pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 em reator não aerado



Cromatogramas do Efluente no T0 de tratamento pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 em reator não aerado.

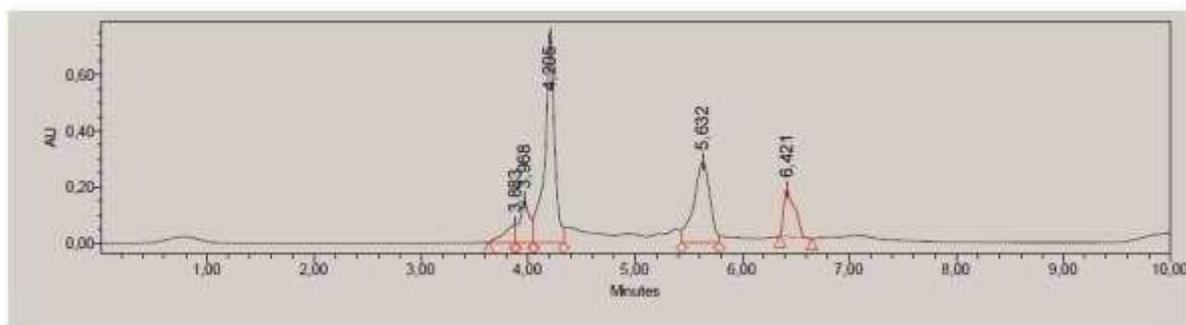


Cromatogramas do Efluente no T5 de tratamento pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 em reator não aerado.

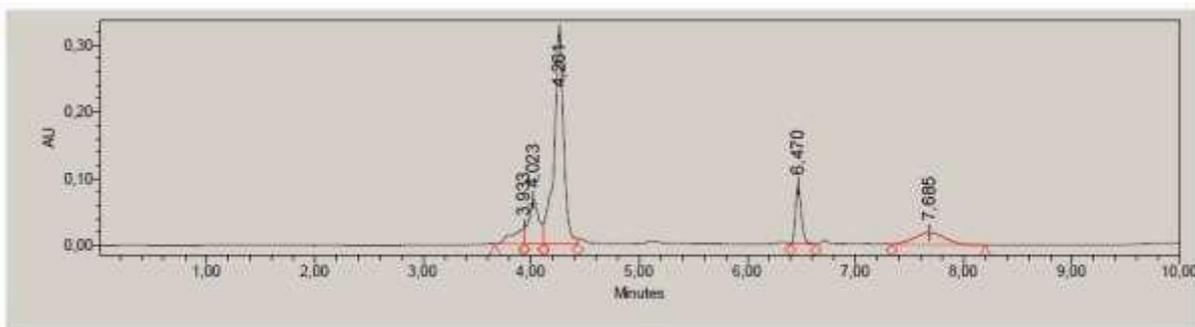


Cromatogramas do Efluente no T10 de tratamento pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 em reator não aerado.

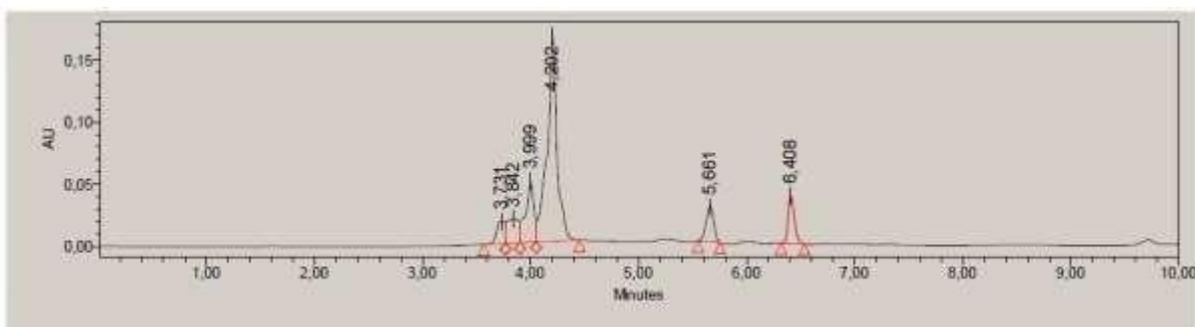
Cromatogramas de Degradação do Corante Índigo após dez dias de tratamento pelo fungo *C. lunata* URM 6179 em reator não aerado.



Cromatogramas do Efluente no T0 de tratamento pelo fungo *C. lunata* URM 6179 em reator não aerado.

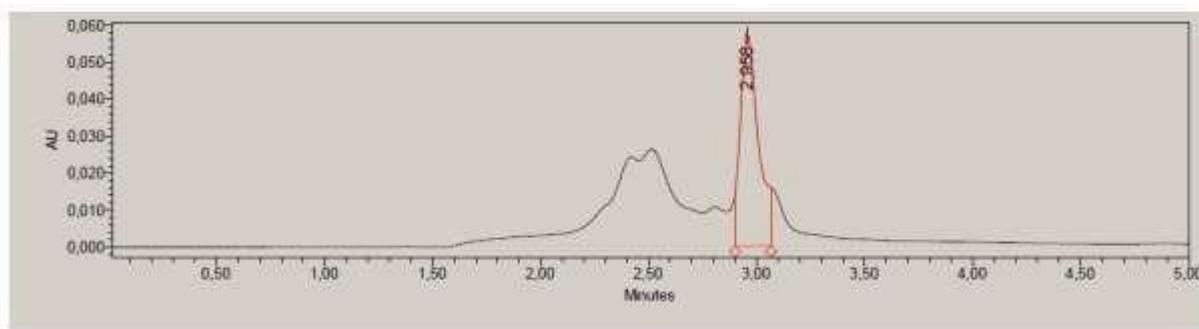


Cromatogramas do Efluente no T5 de tratamento pelo fungo *C. lunata* URM 6179 em reator não aerado.

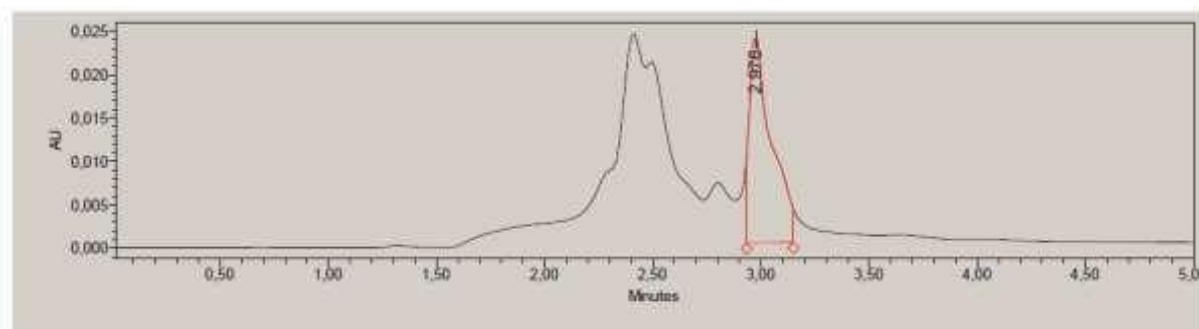


Cromatogramas do Efluente no T10 de tratamento pelo fungo *C. lunata* URM 6179 em reator não aerado.

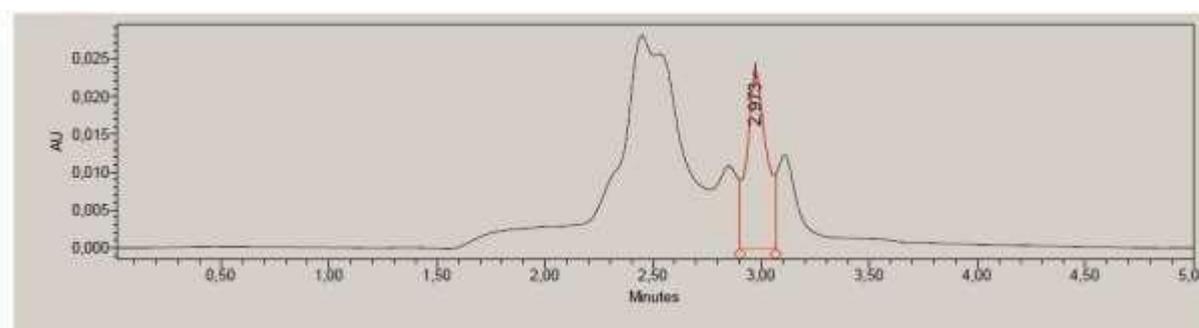
Cromatogramas de Degradação do Corante Índigo após dez dias de tratamento pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 em reator aerado.



Cromatogramas do Efluente no T0 de tratamento pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 em reator aerado.

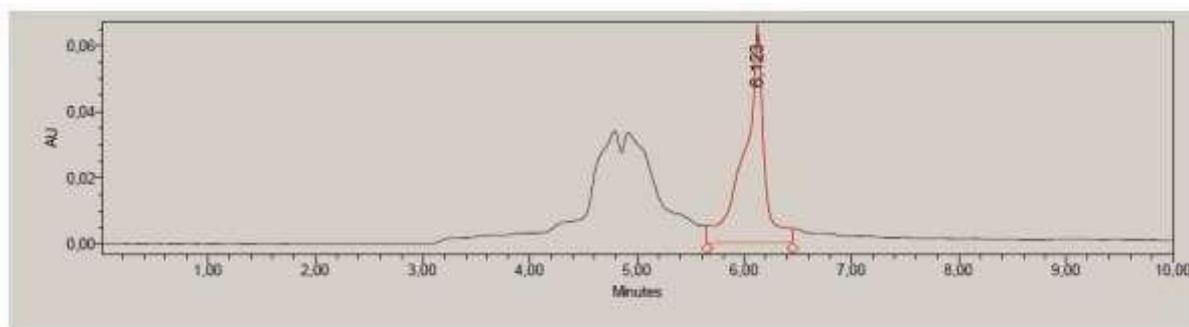


Cromatogramas do Efluente no T5 de tratamento pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 em reator aerado.

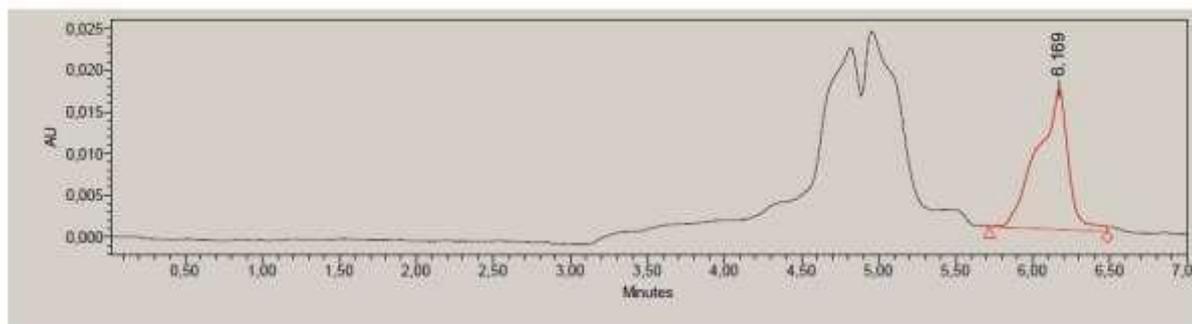


Cromatogramas do Efluente no T5 de tratamento pelo fungo *P. chrysosporium* URM 6181 em reator aerado.

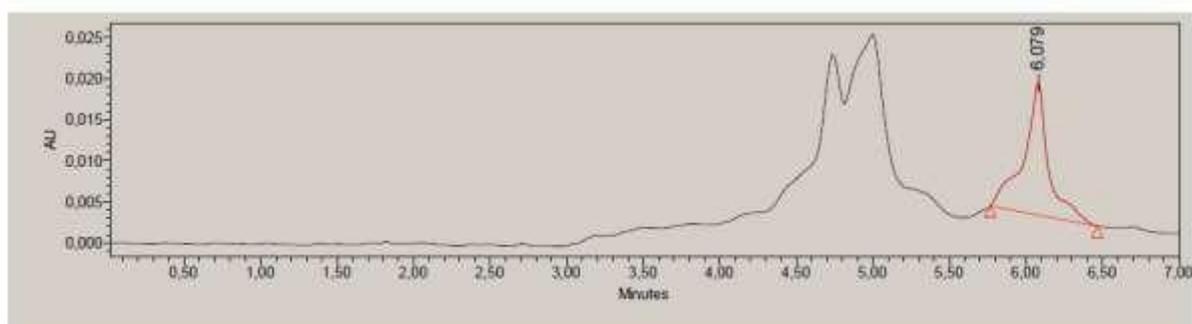
Cromatogramas de Degradação do Corante Índigo após dez dias de tratamento pelo fungo *C. lunata* URM 6179 em reator aerado.



Cromatogramas do Efluente no T0 de tratamento pelo fungo *C. lunata* URM 6179 em reator aerado.



Cromatogramas do Efluente no T5 de tratamento pelo fungo *C. lunata* URM 6179 em reator aerado.



Cromatogramas do Efluente no T5 de tratamento pelo fungo *C. lunata* URM 6179 em reator aerado.

ANEXO A

TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA AFRICAN
JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY.

Decolorization of Laundry effluent by Filamentous Fungi

Rita de Cássia M. Miranda^{1,2*}, Edelvio de Barros Gomes³, Ester Ribeiro Gouveia², Kátia Maria G. Machado⁴
and Norma Buarque de Gusmão^{1,2}

- (1) Post-Graduation in Biology of Fungi, Federal University of Pernambuco, Center of Biological Sciences, Recife,
PE
*
- (2) Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Center of Biological Sciences, Recife, PE.
(3) Federal University of Rio de Janeiro, Department of Chemical Engineering, Laboratory of Bioprocess
Development, Rio de Janeiro, RJ.
(4) Catholic University of Santos, Center for Educational Sciences, Course of Biological Sciences, Santos, SP.

Address: Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, CEP: 50.670-901, Recife-PE, Brazil, *
e-mail: ritamend@hotmail.com, Phone: (81) 2126 8866 / Fax (81) 2126 8346.

ABSTRACT

This study aimed to select fungi with the potential to decolorize effluent and optimize the culture conditions using the methodology of experimental design. Twenty fungi were inoculated in flasks containing the liquid synthetic medium, and every 24 hours, aliquots were over 10 days. We evaluated the culture conditions and stationary stirring of 130 rpm. After selecting the best fungi were subjected to an experimental design and evaluation of the production of the ligninolytics enzymes. Fungi *Phanerochaete chrysosporum* CCT 1999, *Lentinula edodes* CCT 4519 and *Curvularia lunata* UFPEDA 885 reduced 100% the color of the effluent during growth under agitation while the fungus *Aspergillus* sp. F 75 reduced 98% the color of the effluent under the same condition. Statistical analysis confirmed a significant difference between the culture conditions evaluated, with greater efficiency of decolorization of textile effluent under agitation for most fungi evaluated. The experiment 19 was noted for facilitating discoloration in 99% of the effluent. The kinetics of discoloration shows that the fungus *P. chrysosporum* CCT 1999 and *C. lunata* UFPEDA 885 stand out for discoloration before starting the other fungi. The four selected fungi proved to be good producers of the enzyme laccase.

Key Words: effluent, decolorization, fungi.

INTRODUCTION

Industrial growth has contributed to the economic and social development, interfering in the increase of environmental problems has become increasingly critical and frequent (Cotter et al., 2006). According to Oliveira e Souza (2003), the textile industry adds value to economic and social, on the other hand are generating large volumes of complex effluents which have color intensity, concentration of organic matter varied and high levels of salts, thus potentially contributing to environmental degradation (Santos et al., 2005). In the Northeast, the expansion of textile industries developed in Pernambuco a great center of production of clothing in the cities of Caruaru, Toritama and Santa Cruz of Capibaribe. Among these the city of Caruaru is an important center of laundry that are responsible for environmental degradation, especially the river Capibaribe PE, which receives the waste chemicals from the processing of parts in jeans (SEBRAE PE, 2009). This pollution easily visible cause changes in the biological cycle and the presence of dyes and by-products that are mutagenic and carcinogenic or (KUNZ et al., 2002). Bioremediation is a set of techniques where organisms are used to degrade organic compounds by removing them from the environment. Among these stand out bacteria and fungi that are extremely versatile in degrading recalcitrant substances (Barr & Aust, 1997). Among the fungi of the "white rot of wood", has been implicated in the degradation of a large variety of compounds and dyes, with high action potential in the recovery of contaminated environments (Knapp et al, 1995; BALAN, 1999). Fungi mitosporic are also described as potentially degrading organic compounds, mainly due to activity of the enzyme laccase. For these reasons we report this work aims to optimize parameters for cultivation of fungi in the biological treatment of effluent generated by laundry textile at Caruaru - PE.

MATERIAL AND METHODS

Fungi

In this work were using twenty, ten basidiomycetous and ten mitosporic, assigned by the Culture Collection of the Department of Mycology, Federal University of Pernambuco (URM Culture Collection), Culture Tropical Collection, Andre Toselo Foundation (CCT Culture Colletion) and Microorganisms Culture Collection (Antibiotics Department). Basidiomycete fungi were maintained on potato dextrose agar (PDA) at 4°C, while the Fungi were maintained on Sabouraud (SAB) under the same conditions. It is worth noting that the Fungi were isolated from environments contaminated with petroleum derivatives.

Sampling and maintenance of effluent

The effluent used throughout the experiment was obtained from the storage tank of waste laundry "Stomp", belonging to the Textile Complex Industrial Caruaru - PE. The effluent was collected in various parts of the dump tank and stored in cold chamber.

Decolorization of effluent by fungi.

The fungi were first grown on malt agar (MEA) and incubated at 30°C for 10 days. Three discs of fungal growth (6mm) were transferred to a 500mL flask containing 200mL of liquid synthetic medium (Yamanaka et al., 2008), modified. The modification consisted of replacing the distilled water by the effluent. The vials were kept under static conditions or with shaking at 130 rpm for basidiomycetes and static or shaking at 150 rpm for mitosporic fungi. Every 24 hours for 10 days, aliquots were 2 ml for reading the absorbance at 670 nm in spectrometry HP – 8453/UV-Visible. All experiments were performed in triplicate. The percentage of discoloration was calculated according to the formula below:

$$\%D = \frac{\text{AbsT}_0 - \text{AbsT}_x}{\text{AbsT}_0} \times 100$$

% D = percentage of discoloration
 AbsT₀ = initial absorbance
 AbsT_x = absorbance at each time

Statistical Analysis

To obtain the rate of discoloration was obtained constant linearity of each sample. The significant variance between the treatment conditions for both groups of fungi was performed using the Student t test using the Statistic Software™ 6.0, where the change was considered significant when $p \leq 0.05$.

Experimental Design

Using the strains which have reported discoloration of the effluent of more than 97% was carried out experimental design in order to obtain the best operating conditions. For this were applied a central composite rotational design (DCCR) through a complete factorial design (24) with levels -1 and +1, eight axial points (-2 and +2) and four central points (zero) in the variables studied were pH, concentration of yeast extract, agitation and concentration of copper sulphate (CuSO₄) as independent variables and percentage of discoloration at the end of the tenth day as the dependent variable. The plan consisted of 27 experiments (Table 1) and its implementation was used Statistic™ 6.0 SOFTWARE.

Table 1 - Values set out in factorial design experiment.

Variables	Levels				
	- α	-1	0	+1	+ α
Yeast Extract	0	0.01	0.05	0.1	0.5
pH	5.0	5.5	6.5	7.5	8.0
CuSO₄	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08
With agitation	0	30	80	130	180

Activity of ligninolytic enzymes in textile effluent

To determine the production of the three major ligninolytic enzymes: manganese peroxidase (MgP), lignin peroxidase (LiP) and Laccase, selected fungi were cultured in flasks under the conditions established in the experimental design (0.05g yeast extract, KH₂PO₄ 0.2g, MgSO₄ 0.05g, CuSO₄ 0.02g, MnSO₄ 0.016g, pH 7.5, 1L of laundry effluent) at 28°C for ten days without agitation. After this time, the enzyme extract was obtained by membrane filtration of 0.45 μ m.

Enzymes Assays

All enzymatic activity was measured spectrophotometrically (HP - 8453/UV-Visible). The Laccase activity was determined using 2,2 - azino - bis - ethylbenzothiazolone (ABTS) in accordance with Buswell et al. (1995). The mixture consisted of 0.1 ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0), 0.8 ml ABTS solution in a 0.03% (w/v) and 0.1ml of enzyme extract. The oxidation of ABTS was measured by monitoring the increase in absorbance at 420nm. MnP activity was measured by phenol red oxidation method at 610nm like determined for Kuwahara et al. (1984). The reaction mixture was composed by 500 μ L enzymatic extract, 100 μ L phenol red (0.01%, w/v), 100 μ L sodium lactate (0.25 M), 200 μ L albumin bovine (0.5%, w/v), 50 (MnSO₄ (2 mM), 50 (hydrogen peroxide in sodium succinate buffer (20mM, pH 4.5). The mixture was incubated at 30°C for 5 min and the reaction was interrupted by the addition of 40 μ L NaOH (2N). LiP activity was determined by the oxidation of veratryl alcohol as described by Buswell et al. (1995). The mixture reaction was composed by 1mL sodium tartrate buffer 125mM pH 3.0, 500 μ L veratryl alcohol 10mM; 500 μ L hydrogen peroxide 2mM and 500 μ L enzyme extract. The reaction was started

by adding hydrogen peroxide and the appearance of veratraldehyde was determined at 310 nm. One enzyme unit was defined as 1.0 μmol product formed per minute under the assay conditions.

RESULTS

Decolorization Wastewater by Fungi

The table 2 shows the percentage of discoloration effluent the 20 fungi evaluated after 6 days of cultivation under both conditions tested.

Basidiomycetes

Among the ten fungi group of basidiomycetes two stood out for its ability to decolorize textile effluent in the two culture conditions tested. *Phanerochaete chrysosporum* CCT 1999 reduced the color of the effluent by 97% and 100%, under static and stirred conditions, respectively *Lentinula edodes* CCT 4519 reduced the color of the effluent by 95% and 100% under both conditions. Other fungi showed the ability of discoloration in the two conditions of the fungus *Fomes fasciatus* URM 2676 and *Lentinula crinitus* URM 2672 demonstrated ability to reduce color in 92% and 94% in static condition while stirring decolorized the effluent by 81% and 88% respective. Fungi *Fomitella supine* URM 2675, *Schizophyllum commune* and *Ganoderma applanatum* presented a potential discoloration of 88% in static condition while the condition agitated decolorized up to 80%, 90% and 89% respectively. Among the group of basidiomycetes, fungi which were less promising as the potential for discoloration of the effluent were *Pycnoporus sanguineus* URM 2540, *Coriollus caperatus* URM 2673 and *Trametes villosa* CCT 5567 to the percentage of discoloration of 72%, 76% and 70% under static condition and 72%, 81% and 78% under condition of agitation.

Mitosporic

Among the ten fungi tested only mitosporic *Curvularia lunata* UFPEDA 885 bleached 100% of the effluent provided agitated and 98% under static condition, followed by the fungus *Aspergillus* sp. F75 that showed discoloration of 95% and 98% under static and agitated

conditions respectively. The fungus *Penicillium griseofulvum* UFPEDA 880 showed 94% of bleaching effluent in both conditions tested while the unidentified fungi F94 and F112 decolorized the effluent by 93% and 90% in static condition while stirring both decolorized 90% of the effluent. The *Aspergillus tamari* UFPEDA 870, *Curvularia* sp. F45, *Penicillium aurantiogriseus* UFPEDA 884 and *Curvularia clavata* F111 showed the percentage of decolorization of 83% 81% 81% and 75% under static condition and 83%, 88%, 81% and 75% under rough conditions while the unidentified fungus F48 showed a percentage of discoloration of 75% in both conditions.

Table 2 - Percentage of decolorization of the effluent by fungi evaluated after ten days of cultivation under both conditions tested.

Fungi	Reduction of color (%)	
	without agitation	with agitation
<i>Fomitella supina</i>	88	80
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	72	72
<i>Lentinula critinus</i>	92	88
<i>Fomes fasciatus</i>	94	81
<i>Coriollus caperatus</i>	76	81
<i>Trametes villosa</i>	70	78
<i>Schizophyllum commune</i>	88	90
<i>Ganoderma applanalum</i>	88	89
<i>Phanerochaete chrysosporum</i>	97	100
<i>Lentinula edodes</i>	95	100
Abiotic control *	2	3
<i>Aspergillus</i> sp.	95	98
<i>Curvularia clavata</i>	81	88
<i>Curvularia</i> sp.	75	75
<i>Aspergillus tamarii</i>	83	83
<i>Penicilium griseofulvum</i>	94	94
<i>Penicilium aurantiogriseus</i>	81	81

<i>Curvularia lunata</i>	98	100
F45	79	79
F48	93	90
F112	90	90
Abiotic control *	2	1

Statistical Analysis

After completion of the student *t test* showed a reliability level of 95%, statistically significant ($P < 0.05$) between the mean values of percentage of discoloration of differences the textile effluent treatment when performed in a stationary and agitated of 130 rpm, as shown by the results shown in Table 3. Several statistical methodologies are employed in order to validate the techniques used during the work performed.

Table 3 - Statistical analysis within groups of fungi tested

Fungi	Average groups of fungi in culture condition		P- valor
	Without agitation	With agitation	
Basidiomycets	0,481550	0,852410	0.000000
Mitosporics	0,415620	0,566390	0.040053

Experimental Design

After completion of the experimental design, found that among the 27 experiments, the treatment was noted for 19 discolor 99% of the effluent at the end of the tenth day of the four fungi used (Figure 1). Despite all of fungi decolorized in 99% at the end of the tenth day when subjected to 19 treatment conditions, the kinetics of discoloration shows that the fungi *Phanerochaete chrysosporum* CCT 1999 and *Curvularia lunata* UFPEDA 885 were more promising, from the fourth day where there is presence 40% of dye in the effluent, reaching 1% of residual dye at the end of the sixth day unlike the other two fungi that were still residual dye in the same period of time (Figure 2). When the fungus used was *P. chrysosporum* CCT 1999, the Pareto chart (Figure 3) generated after the execution of the experimental design shows that the interaction between the variables agitation and yeast extract is the most influence on the results with a confidence level of 98.7%. The surface chart in Figure 4

can be observed a trend of excellent conditions for both static and shaken at 150 rpm and the concentration of yeast extract about 0.03 g / L, is maximized by the interference of the central points. In the case of the fungus *C. lunata* UFPEDA 885 can be seen that only the agitation significantly influence the process, with a confidence level of 3.8% (Figure 5) can be seen from the surface chart the same profile shown to the fungus *P. chrysosporum* CCT 1999 (Figure 6).

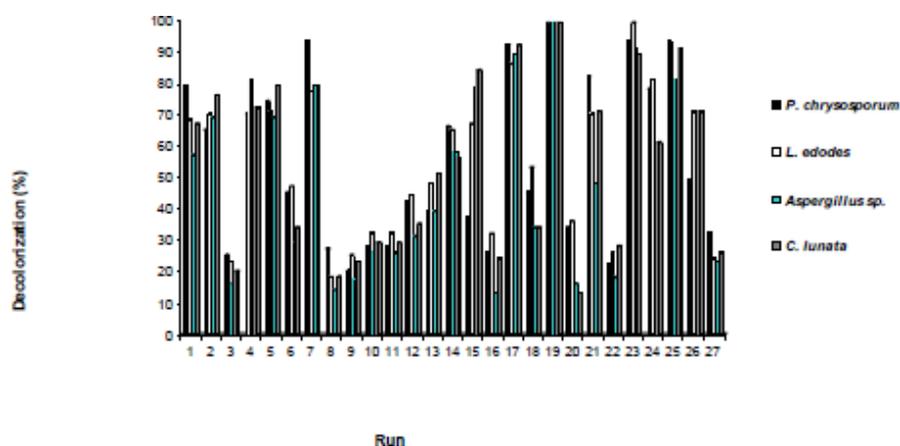


Figure 1 - Percentage of decolorization of effluent from the laundry of jeans in the experimental design by the fungi *P. chrysosporum* CCT 1999, *L. edodes* CCT 4519, *Aspergillus sp.* F75 and *C. lunata*. UFPEDA 885

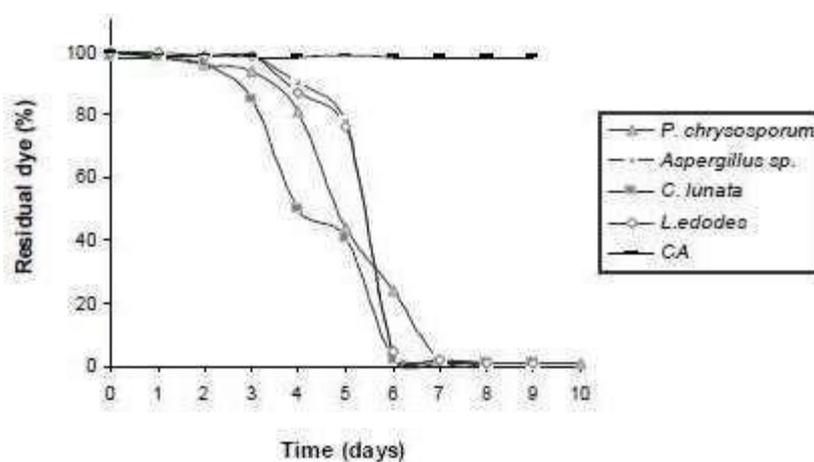


Figure 2 - Kinetics of bleaching effluent by fungi *P. chrysosporum* CCT 1999, *Aspergillus sp.* F75, *C. lunata* UFPEDA 885 and *L. edodes* CCT 4519 over ten days in the treatment of experimental design 19.

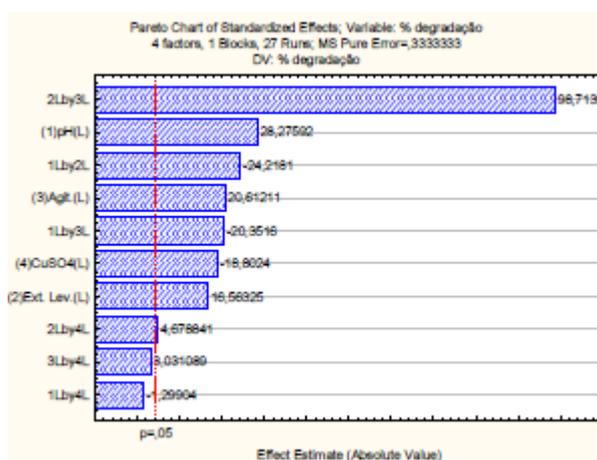


Figure 3 - Pareto Chart in the process of textile effluent decolorization by the fungus *P. chrysosporum* CCT

1999.

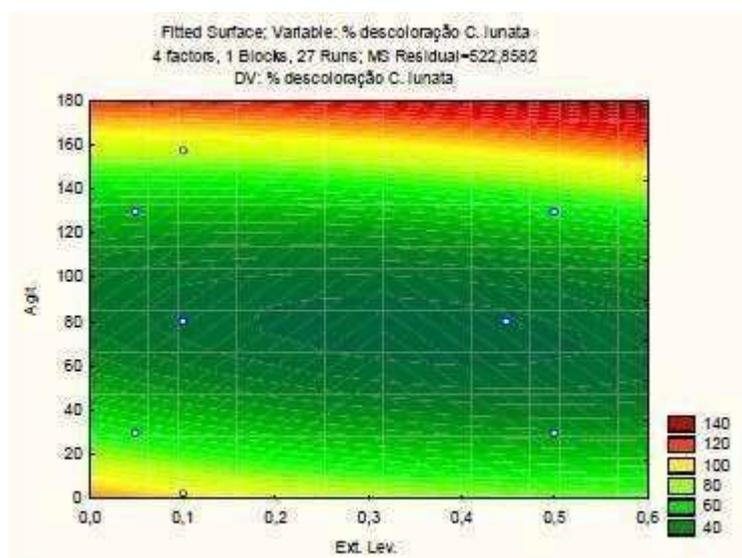


Figure 4 - Response surface of agitation and concentration of yeast extract (g / L) with dependent variable the percentage of degradation (%) of *P. chrysosporum* CCT 1999.

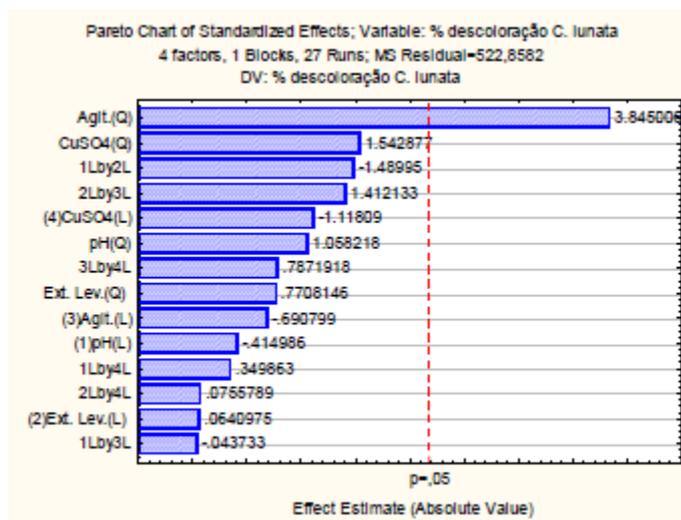


Figure 5 - Pareto Chart in the process of textile effluent decolorization by the fungus *C. lunata* UFPEDA 885.

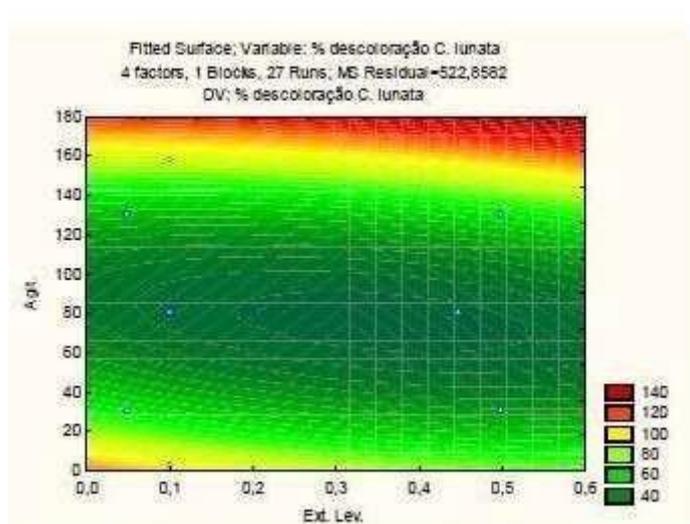


Figure 6 - Response surface of agitation and concentration of yeast extract (g / L) with dependent variable the percentage of degradation (%) of *C. lunata* UFPEDA 885.

Activity of ligninolytic enzymes in textile effluent

The quantification total values of the three major ligninolytic enzymes are shown in Table 4. In the culture conditions established by the experimental design can be seen that the four fungi are producers of the enzyme laccase, and the fungus *C. lunata* UFPEDA 885 presented the greatest potential, followed by *Aspergillus* sp F75. These results demonstrated the importance of the source of copper in the medium due to the dependence of this enzyme in this mineral. Fungi also demonstrated potential in the production of manganese-dependent peroxidase.

For this enzyme that the fungus had a greater potential in the production was *Aspergillus* sp. F75, followed by *C. lunata* UFPEDA 885. The four fungi did not prove to be good producers of the enzyme lignin peroxidase. This may be due to the absence of an additional source of iron in the culture medium. These results demonstrated interesting by the fact that the major producers were fungi mitosporic easier cultivation and rapid growth.

Table 4 – Quantification of total activity of three major enzymes ligninolytics by fungi *Aspergillus* sp. F75, *C. lunata* UFPEDA 885, *P. chrysosporium* CCT 1999 and *L. edodes* CCT 4519.

FUNGI	ENZYMES (U/L)		
	Mn Peroxidase	Laccase	Li Peroxidase
<i>Aspergillus</i> sp. F75	552	1950	111
<i>C. lunata</i> UFPEDA 885	474	2100	50
<i>P. chrysosporium</i> CCT 1999	466	1506	30
<i>L. edodes</i> CCT 4519	466	1835	96

DISCUSSION

Decolorization of textile effluent by fungi

The fungi causing white rot in wood are reported as potential degraders of dyes used by the textile industry due to its set of ligninolytic enzymes. Martins et al. (2001) observed that *P. chrysosporum* bleached a mixture of eight azo dyes during eight days of growth in liquid medium. Using the same fungus Radha et al., 2005 reported that *P. chrysosporum* discolors 99% of color "Methyl Violet", "Orange" and "Vat Majenta" in initial concentrations of 0.05 g / L at pH 4.5 and 35°C temperature. The mitosporic fungi also have the potential to decolorize textile effluents by enzymes lignolytics and substances of low molecular weight, such as reactive oxygen species, hydroxyl radical and Fe ions (Vitali et al., 2006). An efficient mechanism for removal of dyes in textile effluents by fungi mitosporic is biosorption. Some reports in the literature show the efficiency of this mechanism. Fahl et al. In 2004, reported that *Aspergillus oryzae* in form

paramorphogenic had the capacity to adsorb the dye "acid yellow 25" in different pH conditions. *Aspergillus niger* showed potential in discoloring aquatic environments contaminated with reactive dye sinazol by adsorption, after 18h of exposure of their biomass (Khalaf, 2008). Other mitosporic fungi also demonstrate the ability to remove color from textile effluents. Shedbalkar et al. (2008) reported that *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 has demonstrated its ability to decolorize 93% of triphenylmethane dye on condition of stationary cultivation, pH 6.5 at 25°C in two and a half hours of contact. Ambrosio and Campos- Takaki (2004) reported that *Cunninghamella elegans* bleached 83% of the color "orange II in medium containing sucrose and peptone after 96 hours of treatment. Omission of sucrose reduced the discoloration of dye to 48% over the same period of time. Growing conditions are essential for satisfactory performance of organisms. *Aspergillus ochraceus* has shown promise in the degradation of the dye "Reactive blue 25" in medium containing only distilled water and glucose Parshetti et al. (2007). In this paper, the authors related the presence of enzymes laccase, lignin peroxidase and tyrosinase in the degradation of this dye and the data were corroborated by analysis on high performance liquid chromatography (HPLC) and chromatography gas accolade mass spectrometric (CGMS) that had peaks of the compounds phitalimidin and di-iso-butylphthalate intermediate metabolites of the dye.

Statistical Analysis

Several statistical methodologies are employed in order to validate the techniques used during the work performed. Evangelista-Barreto et al. (2009) compared three bioassays to see what would be the most efficient, and I (single crop), II and III (consortia) in order to optimize the process of discoloration of the azo dye Orange II. The authors used the test of Turkey to establish the existence of significant differences between the means of three processes employed and observed greater efficiency of clearing in bioassays using cultures in the consortium.

Experimental Design

Some authors have used a factorial design to optimize the conditions used in the degradation of dyes and effluents by microorganisms. Srinivan & Murthy (2009), conducted a complete experimental design of central-type compound to optimize the initial concentrations of glucose, dye and ammonium chloride in culture medium in which it is used to test the ability of the fungus *Trametes versicolor* to decolorize azo dyes. The dye-Reactive orange 16 (RO-16) was downgraded to 94.5% when the optimal concentrations of glucose, dye and ammonium chloride were 17.50 g / L, 0.66g/L and 2.69 g/L while for the dye-Reactive red 35 (RR-35) these concentrations were 16.67 g/L, 0.68 g/L and 2.13 g/L. These values were studied and optimized after the observation of the surface chart response. Evangelista-Barreto et al. (2009), after performing a complete factorial design with two levels and four variables reported the degradation of 96-98% of the azo dye Orange II by *Geobacillus stearothermophilus* when grown in Luria Bertani medium under condition of stirring of 150 rpm, a phenomenon attributed to the need co metabolism by bacteria. After observing the Pareto chart can be said that the turmoil is the variable that positively influence the process.

Activity of ligninolytic enzymes in textile effluent

Yamanaka R. et al (2008) observed the production of Laccase enzyme produced by the fungus *Trametes villosa* throughout their growth and under different growing conditions, we observed a higher yield when the medium was supplemented with copper. The same authors also observed that the enzyme activity of manganese dependent peroxidase was induced when the medium was supplemented with vegetable oil emulsifying with surfactant. Bonugli-Santos et al. (2010) studied the production of enzymes ligninolytics in fungi isolated from saline environment and observed the production of three key enzymes laccase, manganese-dependent peroxidase and lignin peroxidase when the *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, 857 *Cladosporium cladosporioides* CBMAI and *Mucor racemosus* CBMAI 847 were cultured in malt extract. When the same fungus was cultivated in basal medium containing glucose and wheat bran showed an inhibition in the production of lignin peroxidase, while the enzymes laccase and manganese-dependent peroxidase production had increased.

REFERENCES

- Ambrósio ST, Takaki GMC, (2004). Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bior Techn.* 91: 69-75.
- Balan, DSL (1999). Biodegradabilidade e Toxicidade de Efluentes Têxteis. *Rev. Brás. de Quim. Têx.* 26: 54.
- Barr, DP, Aust S D. (1997). Mechanism White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants. *Envir. Sci. Techn.* 28(2): 78-87.
- Bonugli – Santos, RC, Durrant, LR, Silva M, Sette LD (2010). Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by brazilian marine-derived fungi. *Enz. and Microb. Techn.* 46:32-37.
- Buswell JK, Cai YJ, Chang ST. (1995). Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol Lett.* 128:81–8.
- Cotta JA, Rezende MOO, Piovani, MR. (2006). Avaliação do teor de metais em sedimento do rio Betari no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira – PETAR. *Quím. Nov.*29:40-45.
- Dos Santos AB, Traverse J, Cervantes FJ, Van Lier JB, (2005). Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. *Biotech. And Bioeng.* 89(1): 42-52.
- Evangelista Barreto NS, Albuquerque, CD, Vieira RSHF, Campos-Takaki GM, (2009) Cometabolic Decolorization of the Reactive Azo Dye Orange II by *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. *Text. Reser.* 79:1266-1273.
- Fahl P, Vitor V, de Jesus GJ, Corso CR, (2004). Biosorção do Corante Azóico “Acid Yellpw 25” por *Aspergillus oryzae* Paramorfogênico, *Arq. do Inst. de Biol.*71:132-134.
- Khalaf MA, (2008) Biosorption of Reactive Dye from Textile Wastewater by non-viable biomass of *Aspergillus niger* and *Spirogyra sp.* *Bior. Techn.* 99:6631-6634.
- Knapp J, Newby PS, Recco, LP. (1995) Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi, *Enzyme Microbiology Technology.* 17:664.
- Kunz A, Peralta-Zamora P, Moraes SG, Duran N. (2002) Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Industriais. *Quim. Nov.* 25:78-82.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett* 1984;169:247–50.
- Martins MAM, Ferreira IC, Santos IM, Queiroz MJ, Lima N, (2001) Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*, *Jour. of Biotech.* 89:91-98.
- Oliveira JR, Souza RR, (2003) Biodegradação de efluentes contendo corantes utilizados na indústria têxtil. In: *Seminário de Pesquisa, Aracajú SE.*
- Parshetti GK, Kalme SD, Gomare SS, Govindwar SP, (2007). Biodegradation of Reactive Blue – 25 by *spergillus ochraceus* NCIM- 1146. *Bior. Tech.v:98* 3638-3642.
- Radha KV, Regupathi I, Arunagiri A, Murugesan T, (2005) Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Proc. Bioch.* 40:3337-3345.
- SEBRAE/PE; Confecção em Pernambuco. Disponível em [http:// www.sebraepe.com.br](http://www.sebraepe.com.br); acesso em 13 de junho de 2009
- Vitali VMV, Machado KMG, Andrea MM, Bononi VLR, (2006) Screening Mitosporic Fungi for Organochlorides Degradation. *Braz. Jour. of Microb.*37: 256-26.

Shedbalkar U, Dhanve R, Jadhav J. (2008). Biodegradation of Triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. *Jour. of Hazard. Mater.* 157: 472-479.

Srinivasan S V, Murthy DVS, (2009) Statistical Optimization for Decolorization of Textile Dyes Using *Trametes versicolor*. 165:909-914.

Yamanaka R, Soares SF, Matheus DR, Machadp KMG, (2008) Lignolytic Enzymes Produced by *Trametes Villosa* CCB176 Under Different Culture Conditions. *Braz. Jour. of Microb.* 39:78-84.