

**ESTUDO DA INTERAÇÃO BIOSORTIVA ENTRE O
CORANTE REATIVO PROCION BLUE MXG E AS
LINHAGENS CCB 004, CCB 010 E CCB 650 DE
Pleurotus ostreatus PARAMORFOGÊNICO**

TATIANA ALVES RODRIGUES

Orientador: Prof. Dr. CARLOS RENATO CORSO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas.
(Área de Concentração : Microbiologia Aplicada)

Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro de 2003

Dedico este trabalho a meu marido Fabiano de Souza Soares, que soube entender a tantas horas de ausência do convívio familiar, sempre com muito apoio e incentivos aos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Sem Ele, tudo isto não seria possível.

A meus pais, Ariovaldo Alves Rodrigues e Darcy Vechio Rodrigues, pelo incentivo e apoio. Principalmente à minha mãe Darcy, que nunca me deixou desistir, fosse pelo meu cansaço das viagens, fosse pela dificuldade de tentar manter trabalho e estudo. Com ela, eu sempre tive uma palavra amiga para levantar e seguir adiante. Obrigada, mãe.

A meu marido, que soube entender as minhas idas e vindas e que tanto apoio me deu; e às minhas irmãs Janaína e Adriana, que acreditaram em mim.

Ao Prof. Dr. Carlos Renato Corso, por ter sido muito mais que um orientador. Foi um amigo compreensivo, ensinando a cada dúvida, paciente, que soube entender as minhas ausências. Obrigada pelo carinho e orientação e pelas frases de incentivo : “Faz parte, Professora”.

Ao amigo Dácio Roberto Matheus, que me ensinou a ver que os fungos eram muito mais do que mofos e bolores. Agradeço os ensinamentos, ao carinho e à amizade.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e Bioquímica, em especial a Dra. Dejanira Franceschi de Angelis, Dr. Edério D. Bidóia, Dr. Choiti Kiyari, Dr. Roberto D. Naves e Dra. Sandra Mara Franschetti, pelo ensinamentos, e colaboração para a confecção deste trabalho.

A todo o pessoal técnico e auxiliar do Departamento de Microbiologia e Bioquímica, em especial ao amigo Roberto José Pedro (Beto), sempre prestativo e solidário, que vai morar eternamente em meu coração.

A Ângela Scatolin, sempre tão paciente, às técnicas Inês, Luiza, e ao desenhista Ronaldo Bella, obrigada pelo apoio.

Às amigas Lílian, Vivian e Priscila, por nossas trocas de experiências em sala de aula e amizade.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, que me acolheu e expandiu meus conhecimentos, permitindo que fosse possível a realização deste trabalho.

A todos os colegas da Seção de Micologia e Liquenologia , em especial à Dra. Marina Capelari e Dra. Adriana de Mello Gugliotta, pela colaboração e dicas valiosas. À Prof. Dra. Vera Lúcia Bononi, Dra. Kátia Maria Gomes Machado, e Dra. Iracema Helena Schoenlein-Crusius, pelos ensinamentos e apoio.

A Nara Ballaminutt e Ricardo Ribeiro da Silva, que muito mais que companheiros de trabalho, tornaram-se verdadeiros amigos. Agradeço ainda aos colegas Anderson, Fábio, Michel , Carla, Vera e Josefa; obrigada pela amizade.

A Capes – Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de Pós Graduação, nível Mestrado.

A todos que direta ou indiretamente, incentivaram ajudaram, criticaram ou apoiaram de alguma forma, obrigada.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1. Corantes	06
2.2. Toxicidade.....	09
2.3. Tratamentos.....	12
2.3.1. Carvão Ativado.....	17
2.3.2. Lodo Ativado	18
2.3.3. Fotodegradação.....	19
2.3.4. Utilização de Enzimas.....	20
2.3.5. Microrganismos.....	21
2.5 Paramorfogênese e Biosorção.....	24
2.5.1. Estudo das Isotermas de Adsorção.....	26
2.6. <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
2.6.1. Biosorção e Biodegradação - Atividade Enzimática dos fungos da podridão branca	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Cultivo do Microrganismo e Paramorfogênese.....	35
3.1.1. BDA (batata-dextrose-ágar).....	36
3.1.2 ME (extrato de malte – meio líquido).....	37
3.2. Método de Pelletização com a utilização do blender	37
3.3. Material para testes biosortivos.....	39
3.4. Preparo das soluções de corante e testes biosortivos.....	39
3.4.1. Corante.....	39
3.4.1.1. Procion Blue MXG.....	39

3.5. Metodologia.....	40
3.5.1. Varredura espectral do corante Procion Blue MXG.....	40
3.5.2. Análise Quantitativa.....	40
3.5.3. Teste de Biosortividade do corante em diferentes valores de pH.....	40
3.5.4. Teste de Interação <i>Pleurotus ostreatus</i> x Procion Blue MXG.....	41
3.5.5. Aplicação das Equações das Isotermas de Adsorção no estudo da interação biosortiva entre diferentes linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> e o corante Procion Blue MXG.....	42
3.5.6. Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 do <i>Pleurotus ostreatus</i> não autoclavado e autoclavado com o corante Procion Blue MXG durante 100 horas, em diferentes valores de pH.....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Corpo de frutificação, crescimento em placa de petri e homogeneidade dos pellets de <i>Pleurotus ostreatus</i>	44
4.2. Aspectos de efluente poluído com corantes e resultados de experimentos de adsorção entre <i>Pleurotus ostreatus</i> forma paramorfogênica e o corante Procion Blue MXG.....	46
4.3. Obtenção dos espectros do corante Procion Blue MXG.....	48
4.4. Teste de biosortividade do corante em diferentes valores de pH.....	53
4.5. Estimativa de remoção total dos corantes em solução.....	63
4.6. Teste de biosortividade do corante com diversas linhagens em pH 2,50, através de varreduras espectrais.....	65
4.7. Teste de biosorção segundo as equações de Freundlich e Langmuir..	67
4.8. Demonstrativo de coeficientes de correlação obtidos pela utilização de equações de Freundlich e Langmuir na interação do corante Procion Blue MXG e diversas linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> em pH 2,50.....	74
4.9. Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 de <i>Pleurotus ostreatus</i> não autoclavado e autoclavado durante 100 horas em diferentes valores de pH.....	76

5. DISCUSSÃO.....	80
5.1. Obtenção da forma paramorfogênica de <i>Pleurotus ostreatus</i>	80
5.2. Corante utilizado.....	81
5.2.1. Corantes reativos.....	81
5.3. Obtenção dos espectros de absorção do corante.....	82
5.4. Testes de biosortividade dos corantes em diferentes valores de pH...83	
5.5. Estudo das isotermas de adsorção.....	84
5.6. Estudo da interação biosortiva através de varreduras espectrais entre <i>Pleurotus ostreatus</i> paramorfogênico e o corante Procion Blue MXG.....	85
5.7. Teste cinético realizado com aa linhagem CCB 010 de <i>Pleurotus ostreatus</i> e o corante Procion Blue MXG em diferentes valores de pH.....	86
6. CONCLUSÃO.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE FIGURAS

Fig. A e B – Blender Mixing.....	37
Fig. C - Esquema de Pelletização e Biosorção.....	38
Fig. 1 <i>Pleurotus ostreatus</i> - corpo de frutificação e crescimento em placa.....	45
Fig. 2 –Pellets não autoclavados e autoclavados de <i>Pleurotus ostreatus</i>	45
Fig 3 a) Efluente de indústria têxtil. B)Comparação entre <i>Pleurotus ostreatus</i> não autoclavado e autoclavado em teste biosortivo com o corante Procion Blue MXG.....	47
Fig. 4 – Curva de absorbância do corante Procion Blue MXG em diferentes valores de pH (2,50; 4,50; 6,50).....	49
Fig. 5 – Espectro de absorção do corante Procion Blue MXG em diferentes valores de concentração (20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL) em pH 2,50.....	50
Fig. 6 – Espectro de absorção do corante Procion Blue MXG em diferentes valores de concentração (20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL) em pH 4,50.....	51
Fig. 7 – Espectro de absorção do corante Procion Blue MXG em diferentes valores de concentração (20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL) em pH 6,50.....	52
Fig. 8. – <i>Pleurotus ostreatus</i> linhagem CCB 004 não autoclavado e autoclavado em contato com o corante Procion Blue MXG (concentração inicial de 100µg/mL) em pH 2,50.....	54
Fig. 9. – <i>Pleurotus ostreatus</i> linhagem CCB 004 não autoclavado e autoclavado em contato com o corante Procion Blue MXG (concentração inicial de 100µg/mL) em pH 4,50	55
Fig. 10. – <i>Pleurotus ostreatus</i> linhagem CCB 004 não autoclavado e autoclavado em contato com o corante Procion Blue MXG (concentração inicial de 100µg/mL) em pH 6,50	56
Fig. 11. – <i>Pleurotus ostreatus</i> linhagem CCB 010 não autoclavado e autoclavado em contato com o corante Procion Blue MXG (concentração inicial de 100µg/mL) em pH 2,50.....	57

Fig. 12. – <i>Pleurotus ostreatus</i> linhagem CCB 010 não autoclavado e autoclavado em contato com o corante Procion Blue MXG (concentração inicial de 100µg/mL) em pH 4,50	58
Fig. 13. – <i>Pleurotus ostreatus</i> linhagem CCB 010 não autoclavado e autoclavado em contato com o corante Procion Blue MXG (concentração inicial de 100µg/mL) em pH 6,50	59
Fig. 14. – <i>Pleurotus ostreatus</i> linhagem CCB 650 não autoclavado e autoclavado em contato com o corante Procion Blue MXG (concentração inicial de 100µg/mL) em pH 2,50	60
Fig. 15. – <i>Pleurotus ostreatus</i> linhagem CCB 650 não autoclavado e autoclavado em contato com o corante Procion Blue MXG (concentração inicial de 100µg/mL) em pH 4,50	61
Fig. 16. – <i>Pleurotus ostreatus</i> linhagem CCB 650 não autoclavado e autoclavado em contato com o corante Procion Blue MXG (concentração inicial de 100µg/mL) em pH 6,50	62
Fig. 17. – Varreduras espectrais com o corante Procion Blue MXG em sua maior concentração (100µg/mL) e as três linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> não autoclavados, pH 2,50, após 120 minutos de contato a 30° C.....	66
Fig. 18. – Varreduras espectrais com o corante Procion Blue MXG em sua maior concentração (100µg/mL) e as três linhagens de <i>Pleurotus ostreatus</i> autoclavados, pH 2,50, após 120 minutos de contato a 30° C	66
Fig 19. – Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de <i>Pleurotus ostreatus</i> CCB 004 não autoclavada realizado através das Isotermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50, após 120 minutos de contato, 30° C. Concentração inicial do corante 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,39 e 2,70 mg/mL.....	68
Fig 20. – Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de <i>Pleurotus ostreatus</i> CCB 004 autoclavada realizado através das Isotermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50, após 120	

minutos de contato, 30° C. Concentração inicial do corante 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,38 e 1,90 mg/mL.....	69
Fig 21. – Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de <i>Pleurotus ostreatus</i> CCB 010 não autoclavada realizado através das Isotermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50, após 120 minutos de contato, 30° C. Concentração inicial do corante 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,26 e 2,08 mg/mL.....	70
Fig 22. – Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de <i>Pleurotus ostreatus</i> CCB 010 autoclavada realizado através das Isotermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50, após 120 minutos de contato, 30° C. Concentração inicial do corante 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,46 e 1,84 mg/mL.....	71
Fig 23. – Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de <i>Pleurotus ostreatus</i> CCB 650 não autoclavada realizado através das Isotermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50, após 120 minutos de contato, 30° C. Concentração inicial do corante 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,14 e 1,12 mg/mL.....	72
Fig 24. – Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de <i>Pleurotus ostreatus</i> CCB 650 autoclavada realizado através das Isotermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50, após 120 minutos de contato, 30° C. Concentração inicial do corante 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,22 e 1,76 mg/mL.....	73
Fig. 25 – Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 de <i>Pleurotus ostreatus</i> não autoclavada (concentração 0,12 mg/mL) e autoclavada (concentração 0,17 mg/mL) com o corante azóico Procion Blue MXG (concentração inicial 100 µg/mL). Incubação em todo o experimento a 30° C pH 2,50.....	77
Fig. 26 – Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 de <i>Pleurotus ostreatus</i> não autoclavada (concentração 0,12 mg/mL) e autoclavada	

(concentração 0,17 mg/mL) com o corante azóico Procion Blue MXG (concentração inicial 100 µg/mL). Incubação em todo o experimento a 30° C, pH 4,50.....78

Fig. 27 – Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 de *Pleurotus ostreatus* não autoclavada (concentração 0,12 mg/mL) e autoclavada (concentração 0,17 mg/mL) com o corante azóico Procion Blue MXG (concentração inicial 100 µg/mL). Incubação em todo o experimento a 30° C, pH 6,50.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela A retirada de RICHARDSON, M.L. Dyes - the aquatic environment and the mess made by metabolites. ISDC, 1983, v.99, p.198-200.....15

Tabela 1 – Estimativa de remoção total do corante Procion Blue MXG na Concentração inicial de 100 µg/mL, pelas linhagens CCB 004, CCB 010 e CCB 650, na forma paramorofogênica do *Pleurotus ostreatus*, expresso em mg/mL de biomassa em diferentes valores de pH.....64

Tabela 2 – Demonstrativo dos coeficientes de correlação obtidos pela utilização das equações isotermas de Freundlich e Langmuir na interação do corante Procion Blue MXG (conc. Inicial de 100µg/mL) e as linhagens CCB 004, 010 e 650 de *Pleurotus ostreatus* (pH 2,50, temp. 30°C).....75

RESUMO

A presente pesquisa enfoca a utilização de formas paramorfogênicas de diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus* para remover o corante reativo Procion Blue MXG de soluções aquosas.

O fungo induzido fisicamente em sua forma paramorfogênica (pellets) foi usado no estudo da biosorção do corante em diferentes valores de pH e em comparação entre as hifas autoclavadas e não autoclavadas, visando a remoção do mesmo em solução aquosa.

O corante reativo Procion Blue MXG foi analisado em sua estabilidade espectral em diferentes valores de pH. Este corante se mostrou instável em termos de estabilidade espectral. O pH que melhor se enquadrou quanto à capacidade de remoção das biomassas pelletizadas foi o 2,50, tanto para amostras autoclavadas como não autoclavadas. Em praticamente todos os experimentos de interação entre a biomassa e o corante, as autoclavadas apresentaram maior capacidade biosortiva do que as não autoclavadas. Foram também efetuados estudos comparativos a respeito das equações Isotermas de adsorção de Freundlich e Langmuir.

A comparação entre os coeficientes de correlação de ambas, nas condições de 30° C e pH 2,50 indicam que a equação de Langmuir explica melhor a interação entre a biomassa fúngica e o corante estudado em todas as linhagens, quando não autoclavadas, admitindo-se tratar de um processo biosortivo em monocamada.

Para as amostras autoclavadas, a equação de Langmuir também é válida para a linhagem CCB 010, sendo que para as linhagens CCB 004 e CCB 650, a equação de Freundlich prevaleceu.

Os testes de biosortividade em termos de varredura espectral indicam que as linhagens CCB 010 e CCB 650 apresentam tendência de ter potencial enzimático para degradar o corante, principalmente em pH 2,50.

Pelos dados apresentados, podemos afirmar que, do ponto de vista de biosorção, o *Pleurotus ostreatus* e suas linhagens paramorfogênicas oferecem condições de vir a ser utilizado como substrato biosorvente no tratamento de efluentes industriais que contenham estes azo compostos.

ABSTRACT

The present research focuses the use of paramorphic forms of different strains of *Pleurotus ostreatus*, to remove the reactive dye Procion Blue MXG from aqueous solutions.

This fungi induced physically in its paramorphic form (pellets), was used in the dye's biosorption study, in different values of pH and in comparison between alive and dead fungi micelia, aiming at its removal in watery solution.

The reactive dye Procion Blue MXG was analyzed in its spectral stability in different values of pH. This dye was showed as unstable in terms of spectral stability. The pH that has better fits in the capacity of removal of biomass was the 2,50, as much for dead samples as for alive samples. In practically all the experiments of interaction between the biomass and the dye, the deceased samples had presented greater biosorptive capacity than the alive ones. Also comparative studies regarding the isothermal equations of adsorption of Freundlich and Langmuir had been effected.

The comparison between the coefficients of correlation of both, in the conditions of 30°C and pH 2,50 indicates that the equation of Langmuir explains better the interaction between the fungic biomass and the dye in all the strains, when deceased, admitting itself to deal with a biosorptive process in monolayer.

For the dead samples, the equation of Langmuir also is valid for strain CCB 010, being that for strains CCB 004 and CCB 650, the equation of Freundlich has prevailed.

The tests of biosorptivity in terms of spectral sweepings indicate mainly that strains CCB 004, CCB 010 and CCB 650 present trend to have enzymatic potential to degrade the dye, in pH 2,50.

For the presented data, we can affirm that, of the point of view of the biosorption., paramorphic *Pleurotus ostreatus* and its strains offers conditions to

come to be used as biosorbent substratum in the treatment of industrial effluent who contains these azo compounds.

1. - INTRODUÇÃO:

Desde o início dos tempos, o corante faz parte do cotidiano do homem. Até a metade do século XIX, todos os corantes disponíveis vieram de fontes naturais, como extratos vegetais e produtos animais. A quantidade de cores era limitada, assim como o seu uso. (INDIA, 2000)

- ❑ Há relatos de que, no Egito antigo, múmias foram encontradas com trajes coloridos por extratos vegetais;
- ❑ Alexandre, o Grande, enganou os Persas, fazendo-os acreditar que seus exércitos estavam feridos, com a utilização de um corante vermelho, proveniente de sucos de plantas, espirrado em seus soldados;
- ❑ Uma lenda gravada em moedas, diz que Hércules, o Deus da Força, descobriu o Tyrian púrpura, quando seu cão mordeu um caracol, o qual tingiu suas mandíbulas de púrpura;
- ❑ Cleópatra carregava em suas viagens caracóis conhecidos por sua cor azul Royal, para enfeitar-se.

O corante retirado da madeira do pau-brasil foi intensamente usado na época do Brasil colonial, assim como o índigo, extraído do *Indigofera tinctoria*, planta nativa do país.

Somente após a I Guerra Mundial é que a produção de corantes sintéticos foi introduzida no país.

A indústria têxtil mundial, atualmente, está representada por numerosas tecnologias, técnicas e materiais, naturais ou sintéticos. Os naturais, como lã, cotton, linho e outros são completamente processados em fábricas têxteis, enquanto que fibras sintéticas (poliéster, poliamida, polietileno, viscose e outros) são produzidas em fábricas químicas, restringindo para as fábricas têxteis, apenas o processo de tingimento, através de corantes, sintéticos ou não.

Os corantes sintéticos são usados extensivamente para corar têxteis, para impressão de papel e fotografias coloridas, sendo utilizados também como aditivos em produtos derivados do petróleo. Aproximadamente mais de 10.000 pigmentos e corantes diferentes são usados industrialmente, com uma produção mundial de mais ou menos 700.000 toneladas anuais. O Brasil colabora com uma produção de 2,6% deste total.

Desta quantidade, foi estimado que 10 a 15% de corantes são perdidos em efluentes, atingindo corpos de água (rios, lagos, etc.), durante o processo de tingimento.

A tecnologia atual de tingimento consiste em várias etapas, escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil, características estruturais, classificação e disponibilidade do corante para aplicação, propriedade de fixação, entre outros.

Todo o processo de tingimento envolve como operação final uma etapa de lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante original ou corante hidrolisado não fixado às fibras nas etapas precedentes.

Os efluentes têxteis são considerados de alto poder tóxico para a biota aquática, além de causarem eutrofização das águas; alterações na DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e no oxigênio dissolvido, diminuição da fotossíntese, devido à diminuição de entrada de luz na água; e diferentes graus de toxicidade, além de serem causadores potenciais de mutagênese e carcinogênese. Quando estes efluentes sofrem reações químicas com outros compostos no meio, seja pôr carvão ativado, ou por tratamentos químicos, ocorre a formação de aminas aromáticas, as quais podem ser mais tóxicas do que o próprio corante inicial, contido no efluente.

Desta forma, é necessário então a retirada dos corantes em sua forma inteira, a fim de evitar a contaminação da fauna e flora aquática, com

consequências para o próprio homem, através da cadeia alimentar, ou mesmo através da água consumida.

Várias formas de remediações têm sido pesquisadas, desde a utilização de processos químicos (cloração, uso de ozônio); métodos físico-químicos (coagulação/floculação); métodos biológicos (carvão ativado, lodo ativado e alguns microrganismos biosortivos).

Estes métodos são muito caros e têm problemas operacionais. A adsorção em vários tipos de adsorventes (carvão, lodo, microrganismos, entre outros), coloca-se como um meio eficiente em relação aos outros já testados.

A adsorção é um fenômeno de superfície que pode ser definido como o aumento da concentração de um componente particular na superfície ou interfase (entre duas fases). Em qualquer sólido ou líquido, átomos na superfície estão sujeitos a forças não balanceadas de atração normal ao plano da superfície. Ela pode ocorrer nas formas de:

- ❑ Adsorção física: somente forças intramoleculares relativamente fracas;
- ❑ Quimiossorção: formação de ligações químicas entre as moléculas adsorvidas e a superfície do adsorvente;
- ❑ Biosorção: adsorção promovida por superfície biológica, aderindo-se à parede celular do microrganismo, por afinidade à mesma, dependendo das condições do meio (pH, temperatura).



Exemplo de aderência de corante à parede de uma partícula de lodo ativado (figura acima)

Há alguns anos, vem-se testando diferentes tipos de microrganismos na remoção de corantes via adsorção, visando sua total remoção do meio aquoso (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, entre outros).

Existe na natureza uma grande variedade de microrganismos capazes de degradar a lignina, a qual tem sido utilizada com a finalidade de alguns corantes (anéis aromáticos). Estes organismos são os fungos da “podridão branca”, que estão sendo utilizados em processos biotecnológicos de biosorção e degradação de alguns corantes.

O objetivo deste trabalho é a verificação da interação biosortiva entre três linhagens do fungo *Pleurotus ostreatus* (ligninolítico) com o corante reativo azóico Procion Blue MXG.

2. - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Corantes

Desde o descobrimento do Brasil, a história segue com a produção de corantes, devido ao Pau Brasil, madeira vermelha, muito procurada por seu poder de tingimento. O Brasil também foi fonte principal do índigo natural (extraído do *Indigofera tinctoria*) (GUARANTINI e ZANONI, 2000).

Somente após a Primeira Guerra Mundial, é que os corantes sintéticos foram inseridos no Brasil.

A fixação do corante às fibras têxteis (GUARANTINI e ZANONI, 2000) pode ocorrer nas seguintes formas:

- ❑ Interações Iônicas: tingimentos baseados em interações mútuas entre o centro positivo dos grupos amina e carboxilatos presentes na fibra e a carga iônica da molécula do corante ou vice versa. Exemplos: tintura de lã, seda e poliamida.
- ❑ Interações de Van der Waals: tingimentos baseados na aproximação máxima entre orbitais π do corante e da molécula da fibra, de tal modo que as moléculas do corante são “ancoradas” firmemente sobre a fibra por um processo de afinidade, sem formar uma ligação propriamente dita. Exemplos: tintura de lã e poliéster com corantes com alta afinidade por celulose.
- ❑ Interações de Hidrogênio: tinturas provenientes da ligação de átomos de hidrogênio covalentemente ligados no corante e par de elétrons livres de átomos doadores em centros presentes na fibra. Exemplos: tintura de lã, seda e fibras sintéticas como acetato de celulose.
- ❑ Interações Covalentes: são provenientes da formação de uma ligação entre a molécula do corante contendo grupo reativo (grupo

eletrofílico) e resíduos nucleofílicos da fibra. Exemplo: tinturas de fibra de algodão.

Os corantes e pigmentos são geralmente lançados em um efluente industrial tanto na forma dispersa (diluído), como em sua forma total de solução (RICHARDSON, 1983).

Os corantes sintéticos, baseados na estrutura do grupo cromóforo, podem ser classificados como corantes azóicos, antraquinonas, triarilmetanos entre outros, sendo que os corantes azóicos constituem o maior grupo usado nas indústrias. Os corantes azóicos contêm entre uma a quatro ligações azo ($-N=N-$), ligando radicais fenil e naftil que são geralmente substituídos por alguma combinação de grupos funcionais, como amina ($-NH_2$); cloro ($-Cl$); etc; sendo os compostos fenólicos, presentes em maior quantidade e mais conhecidos por sua toxicidade (SHAUL et al., 1985).

De acordo com Kirk-Othmer (1979, apud MARCANTI-CONTATO, 1995), os corantes podem ser classificados como:

- Corantes ácidos: corantes aniônicos, solúveis em água, usados em nylon, seda, lã, papel, alimento e cosméticos. Quimicamente, consistem de compostos azo, antraquinonas e triarilmetanos.
- Corantes básicos: corantes catiônicos solúveis em água. São usados em acrílicos modificados, nylon e poliésteres. Produzem cátions coloridos em solução aquosa, e podem ser usados na medicina como anti-sépticos.
- Corantes diretos: corantes aniônicos solúveis em água, quando na presença de eletrólitos (sais que aumentam sua afinidade pela fibra). Seu principal uso é no tingimento de algodão, celulose regenerada, papel e couro. Muitos são compostos azo, com tiazol, ftalocianinas e oxazinas.
- Corantes dispersos: são não iônicos substancialmente insolúveis em água para aplicação em fibras hidrofóbicas de dispersão aquática. São usados principalmente em poliéster, nylon, diacetato de celulose e fibras acrílicas.

- Fluorescentes: são compostos sem cor que absorvem luz UV incidente e reemitem na região visível (azul) do espectro. Não são corantes, mas produzem efeito óptico pela emissão de luz no comprimento de onda maior da radiação refletida dele ou transmitida pelo substrato.
- Corantes reativos: formam ponte covalente com a fibra, normalmente algodão, lã ou nylon, com o grupo compatível hidroxila de celulose. Alto poder de fixação. Principais classes: azo, antraquinona e ftalocianina.
- Corantes sulfurosos: aplicados ao algodão, após banho alcalino com sulfato de sódio como agente redutor. Grupo pequeno e de baixo custo.
- Corantes vat: insolúveis em água e aplicados em fibras celulósicas na forma de sais leuco-solúveis após redução em banho alcalino, normalmente com hidrossulfito de sódio. Seguindo a exaustão da fibra, são reoxidados para a forma ceto-insolúvel e após o tratamento (normalmente com soda), desenvolve estrutura cristalina. As principais classes são: antraquinonas e índigo.
- Precursores de corantes: obtidos de materiais crus e simples como benzeno e naftaleno, através de várias reações químicas. Normalmente os materiais crus são compostos aromáticos cíclicos derivados de petróleo e carvão (alcatrão, breu).

Richardson (1983) em suas pesquisas relatou que, talvez a única coisa que os corantes tenham em comum seja o fato que eles podem absorver luz na região visível. Isto é devido ao cromóforo, sua maior característica estrutural. Este tem um papel na biodegradação do corante que não é conhecida e necessita ser investigada. É provável que, outras propriedades da molécula (solubilidade, caráter iônico, substituintes variáveis, etc.) sejam relevantes no caso de ataque microbiano.

2.2. Toxicidade

Os corantes azóicos são considerados possuidores de um grande potencial tóxico (MARCANTI-CONTATO, 1995), por serem degradados em compostos químicos residuais de difícil remoção no tratamento industrial de efluentes coloridos, além de promover o aparecimento de aminas aromáticas a partir de sua degradação, de alto potencial mutagênico e carcinogênico. Os métodos de tratamento atuais destes efluentes não são eficientes o bastante para impedir a formação de compostos tóxicos como anilinas, hidrocarbonetos aromáticos, entre outros.

Atualmente os corantes representam menos que 1% do total de vendas de produtos químicos orgânicos no mundo. Mas isto não mostra a real importância dos corantes na vida cotidiana, na indústria química e na química orgânica. Nas últimas décadas foram criadas novas classes de corantes para atender as necessidades atuais do mercado (ZOLLINGER, 1987), agravando ainda mais o problema dos efluentes industriais, principalmente por corantes azóicos.

Através dos trabalhos de Gregory (1986), foi possível determinar que a ativação metabólica dos corantes azóicos indica a pró-carcinogenicidade, que pode ser tanto da molécula de corante intacta, como dos metabólitos resultantes (aminas aromáticas).

Além de serem utilizados em têxteis, os corantes azóicos são utilizados em borracha, plástico e impressão. Também são usados em medicamentos, alimentos, refrigerantes e cosméticos (RAFII et al.; WALKER, 1997, 1970).

Os corantes azóicos são degradados por microorganismos intestinais no ser vivo e é possível que os efeitos tóxicos e ou carcinogênicos destes corantes possam ser devido a seus produtos de degradação.

As bactérias anaeróbias isoladas da microflora intestinal humana também reduzem os corantes azóicos, usando uma azoredutase extracelular (CHUNG et al., 1978).

Algumas aminas substituídas dos corantes azóicos, incluindo a 4 fenilazoanilina e N -metil e N-N dimetil-4 fenilazoanilinas são mutagênicas e carcinogênicas. A carcinogenicidade dos azos pode ser devido ao próprio corante ou às aminas aromáticas geradas durante a biotransformação redutiva das ligações dos azóicos. Nos mamíferos, os corantes azóicos são transformados em aminas aromáticas pelo citocromo 450 e por uma redutase dependente da flavina. (CHUNG et al.; RICHARDSON; GREGORY, 1978, 1983, 1986)

Já que o câncer de intestino é mais comum em sociedades altamente industrializadas, uma possível conexão entre estes tumores e o uso de corantes azóicos foi investigado por Chung et al. (1978). Alguns corantes foram relatados como tóxico para animais, por exemplo, o amaranço é tóxico e carcinogênico para fetos de ratos.

Estudos com bactérias anaeróbias intestinais foram realizados para determinar a toxicidade e carcinogenicidade de corantes azóicos quando os mesmos são reduzidos por estes microorganismos (CHUNG et al., 1978), já que o primeiro passo no metabolismo dos corantes dentro do trato gastrintestinal é a redução por azoredutases bacterianas (RAFII et al., 1997).

Mori et al. (1978), discorrem sobre testes de carcinogeneidade feitos com rato e corantes azóicos. Foi confirmado que a ligação covalente do carcinógeno a células macromoleculares in vivo é o primeiro passo para a ação carcinogênica, enquanto que in vitro, esta é uma das últimas características a aparecer. Conseqüentemente o autor sugere que a hidroxilação do grupo metil dos corantes aminoazo carcinogênicos pode ser uma das reações de ativação

metabólica. Este experimento foi feito administrando corantes aminoazo na dieta dos ratos durante três meses, o qual mostrou ser um potente hepatocarcinógeno.

Para julgar os efeitos da poluição através dos efluentes têxteis, Richardson (1983) considerou alguns fatores:

- Concentrações g/L descarregadas de corantes (quantidade, concentração, volume);
- Toxicidade aos peixes, etc,
- Toxicidade microbiana, efeitos no metabolismo dos organismos nas águas de esgoto, organismos de rios, etc,
- Acúmulo em vários organismos, cadeias alimentares, etc,
- Aceitabilidade em água potável: o cloro, quando despejado em efluentes têxteis pode formar organoclorados, portanto a água não pode ser consumida.
- Efeitos de metabólitos.

Processos que são eficientes para descoloração destas águas incluem ultrafiltração, adsorção em carvão ativado, ou precipitação com cal. Processos biológicos também foram ensaiados. Os processos de lodo ativado ou lagoas aeradas são ineficientes para a descoloração, embora eles consigam a redução da demanda química de oxigênio. Esta ineficiência para descoloração é provavelmente devido ao baixo conteúdo de nutrientes (nitrogênio e fósforo) nestas águas, e à toxicidade causada pela presença de compostos fenólicos. (RICHARDSON, 1983).

O maior problema em águas residuárias é a recalcitrância de certas substâncias. O processo de tratamento pode ser dividido em quatro grupos: processos de separação (concentração de orgânicos sem alteração química), processos de degradação (processos oxidativos que tem a intenção de mineralizar os orgânicos para a forma de CO₂), e processos que modificam

quimicamente os constituintes do efluente, mas não levam a mineralização (processos de redução, como por exemplo: desalogenação). O quarto grupo é a preparação de efluentes pela adição de certos químicos para tratamento subsequente por separação ou degradação, quebra de emulsões, floculação, precipitação ou ajuste de pH. (GULYAS, 1997).

O método mais recomendável para remoção de compostos tóxicos de efluentes industriais é a adsorção com o uso de fungos (*Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Saccharomyces uvarum*, *Neurospora crassa*, *Ramaria*, *Poria placenta* e *Gloeophyllum trabeum*, entre outros) conseguindo-se excelentes resultados na remoção do corante em meio aquoso. (MARCANTI-CONTATO e CORSO, 1996a), pois dessa maneira, retira-se o composto em sua forma total, sem quebra da molécula.

2.3. Tratamentos

As indústrias têxteis consomem quantias substanciais de água e substâncias químicas para os processos têxteis (esfregar, branqueamento, coloração, impressão e finalização). Existem mais de 8000 produtos químicos associados com o processo de tingimento listados no Colour Index.

Cerca de 7×10^5 toneladas métricas de corantes são produzidas anualmente. Entre estes estão inclusas algumas variedades tais como: ácidos, reativos, básicos, dispersos, azo, diazo, antraquinona e complexos metálicos.

A presença de pequenas quantias de corantes na água (menos de 1 ppm para alguns corantes) é altamente visível e afeta as características estéticas, transparência da água e solubilidade gasosa em lagos, rios e outros corpos d'água.

Métodos para remoção de DQO da maioria dos efluentes estão mais ou menos estabelecidos; corantes, entretanto, são mais difíceis de tratar devido à

sua origem sintética e principalmente pelas estruturas aromáticas complexas.(BANAT et al., 1996).

Os corantes são tão variados em suas estruturas que nenhum esquema simples pode ser desenvolvido para sua remoção de águas residuais. Alguns poderão sofrer biodegradação e os metabólitos formados podem ser ainda mais tóxicos do que aqueles que lhe deram origem (RICHARDSON, 1983). Se um tratamento tem que ser considerado, então este tratamento pode incluir procedimentos físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos.

Banat et al. (1996), citam numerosas técnicas físicas e químicas que incluem floculação físico-química combinada com flotação, eletroflotação, floculação com Fe(II)/Ca(OH)_2 , filtração por membrana, coagulação eletrocinética, destruição eletroquímica, troca iônica, irradiação, precipitação, ozonação, adsorção e o método de tratamento Kattox (comercial), envolvendo o uso de carbono ativado e misturas de ar. Ele ainda lembra que o tratamento de águas residuárias coloridas e sua descoloração parece ainda ser uma tarefa difícil. Entre as chances mais viáveis disponíveis, parece estar o sistema biológico. As técnicas pelas quais a descoloração ocorre variam e entre elas a adsorção parece ser de grande significância para o futuro desenvolvimento em bio-remoção ou bio-recuperação de substâncias dos corantes.

O autor ainda afirma que, uma das direções ainda a ser exploradas é o uso de microrganismos termotolerantes ou termofílicos nos sistemas de descoloração, devido às altas temperaturas dos processos têxteis.

Segundo Tünay et al. (1996), os tratamentos biológicos, tem efeito limitado nos corantes que requerem adsorção, sendo que a estrutura do corante não é modificada pelo processo biológico.

A adsorção é efetiva na remoção de cores, mas sua dosagem necessária é alta. Tünay et al. (1996) afirma que adsorção seria mais viável se fosse aplicada como um tratamento final no processo das águas residuárias.

A indústria de processamento têxtil é caracterizada por seu alto consumo de água e grandes descargas de efluentes. Devido aos processos em solução aquosa ou em suspensão, os efluentes se tornam visivelmente extensos nos corpos d'água.

A descarga de efluentes de tingimentos específicos (por exemplo: lã, cotton, entre outros), varia de acordo com o método de produção: entre 40m³ e 300m³ por tonelada de substrato finalizado.

Segundo testes, os processos abióticos de tratamento estão classificados em duas categorias:

- ❑ Remoção do corante intacto (adsorção)
- ❑ Hidrólise do corante.

O primeiro é geralmente obtido por procedimentos de precipitação e floculação usando cal, alumínio sais de ferro ou agentes orgânicos. Carvão ativado, resinas de troca iônica, sílica gel, bauxita, turfa e mesmo madeira, têm sido testados.

O segundo método, o de transformação química, é melhor efetuado por ozonação. De qualquer forma, grandes quantias de ozônio são necessárias para uma degradação extensiva dos corantes. Os produtos da oxidação são então removidos por floculação, ou sujeitos a processos de tratamento microbiano. Tratamentos com cloro, dióxido de cloro ou cloramina, os quais, embora mesmo sendo de menor custo, não são satisfatórios à formação de resíduos. A descoloração de corantes azóicos com redução pode ser reversível e geralmente não envolve a degradação real da molécula de corante.(RICHARDSON, 1983).

Com o objetivo de comparar qual o melhor método de tratamento, este autor, fez uma interessante pesquisa comparativa de tratamentos com diversas classes de corantes, e estes foram os resultados:

Corantes	Coagulação. Alumínio	Carvão Ativado	Biológico	Físico, Químico, Biológico	Ozônio	Lodo ativado
Azóicos	0	+	0	+	+	
Reativos	0	+	0	+	+(s)	0(+)
Ácidos	0	+	0	+	+	0
Básicos	0	+ (s)	+	+	+	+
Dispersos	+	0	0	+	0	0
Vat	+	0	0	+	+	
Enxofre	+	0	0	+	+	
Diretos		0	0	+		+

0 = insatisfatório

+ = bom

s = especialmente adequado

* tabela A retirada de Richardson, M.L. Dyes - the aquatic environment and the mess made by metabolites (1983)

Segundo revisão feita por Rott et al (1999), as características principais destes efluentes são:

- ❑ Coloração intensa, causada por corante remanescente não fixado;
- ❑ Temperaturas de efluentes muito altas, devido aos processos envolvidos;
- ❑ Poluição com material orgânico;
- ❑ Alta DQO, devido ao alto caráter salino das águas, devido ao uso de auxiliares têxteis (surfactantes, umectantes, amaciantes);
- ❑ Altas concentrações de metal pesado, devido a agentes clorados do “bleaching” (branqueamento), e sulfo-halogenados ou metais pesados contidos em alguns corantes;
- ❑ Altas quantidades de fosfato, devido a alguns processos utilizados.

O reaproveitamento das águas pela indústria requer total descoloração e uma extensa eliminação de todos os produtos orgânicos e inorgânicos.

Segundo Rott e Minke (1999), isto só pode acontecer se for realizada uma multicominação de técnicas de tratamentos:

- ❑ Tratamento biológico aeróbio: tanques com carvão ativado ou lodo ativado. Este é o tratamento onde se consegue a maior eliminação de resíduos de DQO, enquanto que a descoloração fica entre 15 a 18%;
- ❑ Precipitação e floculação: com sedimentação e filtração. Neste estágio consegue-se a maior remoção de corantes. A eliminação de DQO é de 31%;
- ❑ Adsorção: processo final do tratamento.

Com esta série de tratamentos, Rott e Minke (1999) afirmam que a água resultante serve para esfriar as máquinas de corantes, enxaguar nos primeiros estágios, sem perda de qualidade nos estágios têxteis finais. Também serve para caldeiras e sistemas sanitários.

Em seu trabalho sobre o tratamento de efluentes de indústrias têxteis, Grau (1991), releva exemplos típicos de estratégias efetivas que poderiam ser tomadas na administração das águas:

- ❑ Reciclagem direta da água no mesmo processo ou em outros processos;
- ❑ Reciclagem de efluentes após tratamento intermediário;
- ❑ Reciclagem de efluentes após tratamento final;
- ❑ Reutilização de efluentes municipais ou industriais tratados;
- ❑ Troca da água por solventes que podem ser regenerados;
- ❑ Aumento de afinidade das fibras aos auxiliares têxteis, corantes, agentes retardantes e amaciantes;
- ❑ Melhorar a remoção ou a degradação de auxiliares e outros químicos, com o objetivo de facilitar a reutilização e a reciclagem de efluentes;
- ❑ Minimizar a salinidade dos efluentes.

Grau (1991) também disserta a respeito da reutilização de banhos de corantes, já que o custo de corantes atrativos é alto e por sua recuperação pode ser salvo uma parte do custo do tratamento dos efluentes. Banhos de

exaustão contém até 50g/L de sólidos totais, 30-40g/L de DQO e menos que 4g/L de DBO. A ultrafiltração e a osmose reversa têm sido aplicadas para concentrar banhos de exaustão e reutilizá-los. A partir disto, o consumo de índigo, usado para tingir jeans, por exemplo, pode ser diminuído para 80%.

2.3.1. – Carvão Ativado

O processo do carvão ativado, preparado a partir da hulha, possui excelentes características físicas (especificidade, densidade e solidez). Mas este método dispense alto custo de instalação e manutenção de equipamentos, sendo difícil a recuperação adsorbtiva do carvão após seu primeiro uso. (MC KAY et al, 1978).

Ocorrem ainda freqüentes problemas de DBO e DQO, bem como degradação parcial dos compostos, resultando em aminas aromáticas. (RICHARDSON, 1983).

As propriedades do carvão ativado num determinado processo dependem do tamanho de seu poro e tempo de contato para obtenção de equilíbrio (3-5h) sendo que este fato indica sua natureza adsorbtiva. (MOKRZYCKA e PRZYBINSKI, 1991).

2.3.2. – Lodo Ativado

Embora a maioria dos efluentes têxteis seja tratada em sistema de lodo ativado, a maioria dos corantes sintéticos é recalcitrante a biodegradação, além de criar um problema antiestético nas águas que o recebem, devido à coloração remanescente.

Shaul et al. (1985), mostraram a possibilidade de remoção de corantes azóicos através do lodo ativado, onde ocorreu adsorção nos sólidos suspensos, (onde não ocorreu nem biodegradação, transformação química ou fotodegradação), sendo esta adsorção provada pelos testes de isotermas.

A alternativa mais comum é o processo de lodo ativado, o qual é uma completa mistura de processos aerados, misturados por baixa difusão, ou agitação de superfície. Em sua revisão, Wheatley (1982), nos mostra que o lodo ativado foi primeiramente utilizado em Manchester (EUA), em 1914, onde o efluente era aerado e sua permanência no tanque de aeração com o lodo era de 4 a 10 horas. O efluente final era então filtrado e a maioria do lodo voltava para a mistura com o novo efluente que chegava. Este processo é mais intenso que filtros biológicos, capaz de tratar aproximadamente 10 vezes o volume de efluente do reator. Também é mais barato em termos de capital, mas, é mais difícil de operar e manter devido às misturas e aeração e ao excesso de lodo biológico produzido durante o processo.

Wheatley (1982), também nos lembra de outra dificuldade, que é o crescimento de fungos ou bactérias filamentosas, os quais são naturais de águas poluídas. Estes podem reduzir seriamente a densidade da biomassa de lodo ativado e interromper o retorno do mesmo para o tanque de aeração.

Shaul et al. (1986) fizeram experimentos em um projeto piloto de lodo ativado, no qual foram inseridos vários corantes azóicos solúveis em água, para determinar se o composto era removido por adsorção, degradação aparente ou se não era removido. Deste estudo, Shaul concluiu que quatro corantes haviam sido adsorvidos e degradados, enquanto que os cinco corantes restantes sofreram apenas adsorção.

A eficácia do processo de carvão ativado e lodo ativado foi comparada com o processo apenas de carvão ativado por Shaul et al. (1983), sendo que obtiveram melhores resultados quando os dois métodos eram utilizados dentro

de um único tratamento, com índice máximo de remoção de cor (96%), comparando-se com o carvão ativado (34%), e índices superiores de remoção de DBO, DQO e carbono total, com valores máximos de 98-99%, 75-96% e 65-87% respectivamente. Também foi observado que cerca de 50 a 98% de toxicidade foi removida num tratamento de 4 a 16 dias.

Richardson (1983), em experimentos com Acid Orange 7 e lodo ativado, mostrou que este corante está sujeito a biodegradação quando um inóculo adaptado a esta substância era usado. Com este inóculo, 99% do carbono orgânico dissolvido foi removido.

Segundo Shaul et al. (1985), testes primários de clarificação (com filtros e solventes) removeram 20% do composto do corante, enquanto que o processo de lodo ativado removeu cerca de 90% do corante remanescente. Havia vários possíveis mecanismos de remoção de um corante pelo lodo ativado, no qual o único que foi comprovado foi a adsorção.

2.3.3. – Fotodegradação

Richardson (1983) lembra que, a fotodegradação de corantes é uma hipótese cada vez menos provável devido ao fato de que atualmente estão sendo desenvolvidos corantes com alto poder de fixação e estabilidade à luz.

Li e Zhao (1999) demonstraram que, em efluentes têxteis tratados com um reator de Decantação Intermitente de Aeração Prolongada (DIAP), era possível remover material biodegradável e tratá-lo mais tarde com um reator fotocatalítico de TiO_2 , o qual descolore e aumenta a remoção de DQO. A qualidade da água tratada por este meio avançado pode ser boa o suficiente para ser reutilizada nos processos das indústrias têxteis.

Corantes azóicos são capazes de serem descoloridos por métodos fotocatalíticos, tais como o usado por Chun e Yizhong (1999), que usaram

suspensões de TiO_2 , irradiado com uma lâmpada de mercúrio de pressão média. A remoção das soluções de corantes e dos efluentes alcançou quase 90% em um período de 20 a 30 minutos de tratamento fotocatalítico. A DBO aumentou, enquanto que a DQO e o carbono orgânico total (COT), diminuíram.

2.3.4. – Utilização de Enzimas

Um grande número de enzimas oxidativas encontradas em bactérias, fungos e plantas têm tido um papel importante em numerosas aplicações de tratamento de efluentes. Peroxidasas e ou fenoloxidasas podem atuar em poluentes recalcitrantes específicos por precipitação ou transformando-os em outros produtos, permitindo assim um melhor tratamento final do efluente.

Em sua revisão, Duran e Esposito (2000), nos mostram alguns tipos de enzimas mais utilizadas:

- ❑ Peroxidase de raiz forte (Horseradish peroxidase - HRP): cataliza a oxidação de fenóis, bifenóis, anilinas, benzidinas e compostos heteroaromáticos relacionados. Atua em amplos pHs e temperaturas.
- ❑ Cloroperoxidase (CPO): provem do fungo *Caldariomyces fumago*, oxida compostos fenólicos e promove também a oxidação do etanol para aldeído.
- ❑ Lignina Peroxidase (LiP): encontrada nos fungos da podridão branca, mineraliza uma grande quantidade de compostos aromáticos policíclicos e compostos fenólicos.
- ❑ Manganês Peroxidase (MnP): também encontrada em fungos da podridão branca, catalisa a oxidação de alguns fenóis monoaromáticos e corantes aromáticos.
- ❑ Fenoloxidasas: são oxidoredutases que catalisam a oxidação de compostos fenólicos. São subdivididas em tirosinases e lacases e, ambos os grupos reagem com oxigênio.

Mas Duran e Esposito (2000) nos lembram que, implementar o tratamento de águas residuárias a base de enzimas pode ter um custo muito alto. As enzimas que estão sendo investigadas até agora ainda são caras devido ao alto custo em seu isolamento, purificação e produção.

2.3.5. - Microrganismos

A redução de corantes azóicos por bactérias anaeróbias geralmente diminui a cor, mas finalizam em aminas aromáticas, as quais são geralmente, mais tóxicas que o corante inicial, enquanto que as bactérias aeróbias são restritas a um único corante por vez. Visando isto, Swamy e Ramsay (1999), realizaram estudos com vários fungos da podridão branca (ligninolíticos), visando a descoloração e degradação de efluentes têxteis, conseguindo bons resultados. Desde a década passada, estes fungos se tornaram cada vez mais interessantes devido a sua habilidade de degradar poluentes orgânicos e recalcitrantes tais como: hidrocarbonetos, poliaromáticos, clorofenóis e bifenis policlorados.

Em seus experimentos, Nigam et al. (1996) alcançaram bons resultados em biorremediação com certas culturas de bactérias, quando em condições anaeróbias.

Wang e Yu (1998), realizaram experimentos de adsorção e biodegradação de corantes pelo fungo *Trametes versicolor*. Em seus trabalhos, a adsorção se deu na primeira hora de contato entre os corantes e as hifas fúngicas. A capacidade de adsorção e afinidade do fungo ao corante depende da estrutura de cada corante. Segundo Wang, o micélio saturado pode ser regenerado, ou por desorção física, ou por degradação enzimática, podendo o mesmo ser aproveitado para uma segunda adsorção.

A toxicidade de substâncias como o fenol, ainda é um grande problema a ser resolvido no tratamento de águas residuárias. Experimentos mostraram que a toxicidade do fenol em fungos filamentos não era afetada pelo pH ou

pela dureza das águas (BABICH e STOTZKY, 1985), mas era potencializado pela salinidade. Através do aumento da temperatura, de 22 até 32° C, Os autores conseguiram demonstrar que a resposta do fungo ao fenol era altamente variável; dependendo da espécie do fungo a toxicidade não foi afetada; aumentou; ou diminuiu, conforme a temperatura utilizada.

O uso experimental de crescimento de culturas de fungos para remover corantes orgânicos dissolvidos em efluentes teve um enfoque especial na pesquisa de Corso et al. (1987a), com o uso de colônias paramórficas de *Neurospora crassa*. O objetivo alcançado foi o de validar a aplicabilidade de leis de adsorção, através do uso das isothermas de Freundlich (multicamada) e Langmuir (monocamada).

Walker e Wetherley (2000), em seus estudos com bactérias aeróbias, tais como *Bacillus gordonae*, *Bacillus benzeovorans* e *Pseudomonas putida*, obtiveram bons resultados na descoloração do corante ácido antraquinona Tectilon Blue (TB4R), utilizado na coloração de carpetes. 19% da descoloração foi causado por biosorção. Os cálculos mostraram que os *Bacillus*, além de promoverem a biosorção, também degradaram o corante, mais rápido que as *Pseudomonas*.

Na busca de mais material biosorvente, Muraleedharan et al. (1995), testaram cogumelos de nove espécies não comestíveis para biosorção de cobre (II). Os resultados foram promissores e o autor ressalta a importância de se testarem espécies de fungos tropicais nativos.

Nigam et al. (1996) fizeram experimentos de descoloração de compostos azo com processos microbiais e verificaram crescimento rápido da cultura PDW de bactérias e descoloração eficiente sob condições anaeróbias (100% da descoloração de 5 entre 9 compostos de corantes testados dentro de 48 horas).

Este tratamento microbiológico é simples, rápido e econômico para a descoloração de corantes e pode ter aplicações potenciais no tratamento de efluentes de indústrias têxteis.

Marcanti-Contato e Corso (1996a) realizaram trabalhos sobre processos biosortivos em efluentes têxteis com o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, sendo comprovado que o mesmo tem grande potencial adsorativo para corantes e substâncias tóxicas, independentes da temperatura, mas com melhor atuação em meio ácido.

A remoção de corantes orgânicos utilizando processos biosortivos é a base de trabalhos de remoção de metais em sistemas biológicos de tratamento de efluentes. Banks e Parkinson (1992), utilizaram certas linhagens de fungos que foram particularmente eficientes na remoção de metais. O fungo *Rhizopus arrhizus*, durante os experimentos, mostrou ser um excelente seqüestrador de moléculas de ácido húmico, sob condições ácidas. A adsorção é reversível, quando em condições alcalinas, levando a uma regeneração do sistema. O uso das isotermas para estudo da adsorção, mostrou que os sítios ativos para adsorção húmica estão na parede celular fúngica, e que os componentes mais provavelmente envolvidos seriam quitina e quitosana, sendo sugerido um estudo mais refinado, para provar que este é o sítio de ligação durante a adsorção. (BANKS e PARKINSON, 1992).

2.4. - Paramorfogênese e Biosorção

O método químico com L-Sorbose foi muito utilizado para induzir o crescimento colonial em linhagens de *Neurospora crassa*, as quais são geneticamente não-coloniais, desde a descoberta de seu efeito paramorfogênico. (SERRES et al., 1962),

A L-sorbose, uma cetohexose afeta a síntese de 1,3 β -glucano nos fungos, levando-os a distintas mudanças em sua morfologia e crescimento (EL-SHAFEI, 1997). Este fenômeno conhecido como paramorfogênese foi primeiramente descrito por Tatum et al (1949), em *Neurospora crassa*, onde foi

notado que a mudança paramorfogênica estava associada com um aumento da taxa de glicosamina/glicose na parede celular hidrolizada do fungo.

A L-sorbose, um açúcar conhecido por causar mudanças morfológicas em fungos, foi testado por El-Shaffei (1997), que a testou no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*. A sorbose induziu o crescimento colonial no fungo, o qual foi restrito e suas hifas apresentaram aumento de ramificações e septações. Tais efeitos foram mais pronunciados à medida que a concentração de L-sorbose era aumentada.

Em seus experimentos, El-Shafei (1997), notou uma mudança na composição da parede do fungo e aumento de ramificações e septos, quando utilizava a L-sorbose. Seus efeitos inibitórios no crescimento fúngico sugerem a inativação de sintetases polissacarídeas pela sorbose, afetando então a composição da parede celular.

O método paramorfogênico foi originalmente desenvolvido para estudos de interação biosortiva entre fungos filamentosos e corantes industriais. Este método permite a obtenção de inóculo e pellets miceliais, os quais são homogêneos, pequenos, assépticos e fáceis de manejar, oferecendo uma superfície maior e mais uniforme.

Na busca de um método que não fosse químico, Marcanti-Contato e Corso (1996b) tentaram uma nova forma de induzir a paramorfogênese. Este método, físico, com a utilização de cilindros de vidro, visa a obtenção de inóculo e pellets de micélio, os quais são homogêneos, tamanho reduzido, asséptico e de fácil manuseio, oferecendo superfície de atividade maior e mais uniforme. Deste modo, uma forma morfológica diferente de fungo foi obtida.

Marcanti-Contato et al. (1997), conseguiram estes pellets através de um novo método de paramorfogênese física, na qual cilindros de vidros de um centímetro de comprimento eram colocados dentro do meio de cultura líquida,

juntamente com o inóculo e posto em mesa rotatória à velocidade de 250 rpm, durante 24 e 48 horas. Após a laceração da hifa e devido ao movimento rotatório da mesa, foi modificado apenas o modo como o fungo cresceu, enovelando-se sobre si mesmo e formando os pellets. O potencial reprodutivo do fungo não foi alterado.

Marcanti-Contato e Corso (1996a) realizaram interessantes experimentos com *Aspergillus niger* em interação com o corante azóico Procion Blue MXG, sendo que a temperatura (20, 30, 40°C), não exerceu influência na adsorção. Mas com a utilização de pHs mais ácidos (2,50 e 4,50) conseguiram bons resultados nos processos adsorptivos, com valores acima de 90% de remoção do corante. Este resultado cai para 47% em pH 6,50 e é quase nulo em pH 8,50. Estes resultados foram analisados pela equação de Freundlich (multicamadas) que foi adequada para comprovar a biosorção.

Outros trabalhos já foram realizados com fungos filamentosos, entre eles a *Neurospora crassa* var. 74 A, em interação biosorptiva com o corante azóico Vermelho Reanil P8B, obtendo índices de remoção de cor entre 91,3 e 89, 1%. (CORSO et al., 1981)

Em experimentos com *Neurospora crassa* e o corante reativo Procion Scarlet MX-G, Corso et al. (1987a) concluíram que a adsorção foi mais efetiva no pH 2, 50, apresentando 80% de eficácias nas colônias paramórficas, num tempo máximo de 120 minutos. Este mesmo procedimento foi aplicado na interação com o corante azóico reativo Procion Blue MXG (CORSO et al, 1987b) onde se constatou resultados semelhantes.

Os dados foram analisados pelas equações de Freundlich e Langmuir, onde, em ambos os casos os autores relatam melhores resultados pela equação de Langmuir (equação linear, onde uma única camada de corante é adsorvida pelas hifas do fungo). Os valores de k_2 decrescem do pH 2,50 para 6, 50, enquanto que a demanda de biomassa aumenta do pH 2,50 para 6,50.

2.5 - Estudo das Isotermas de Adsorção

A primeira discussão quantitativa a respeito da adsorção foi realizada por Langmuir e foi baseada nas seguintes hipóteses:

- a) A superfície sólida contém um número determinado de sítios de adsorção. No equilíbrio, uma fração de sítios será ocupada por moléculas adsorvidas, e uma fração de sítio estará vago.
- b) Cada sítio pode manter uma molécula adsorvida.
- c) O calor de adsorção é igual para todos os sítios e não depende da fração recoberta.
- d) Não há interação entre as moléculas localizadas em sítios diferentes. A chance de uma molécula se condensar sobre um sítio desocupado ou abandonar um outro ocupado, não depende de os vizinhos estarem ou não ocupados.

A equação que relaciona a quantidade de moléculas adsorvidas sobre uma superfície à pressão e à temperatura constante é denominada isoterma de adsorção (MOORE, 1968).

As moléculas e átomos podem atacar uma superfície de duas maneiras. Na “Fisiosorção” (abreviatura de adsorção física), aonde ocorre uma interação de Van der Waals entre o “adsorbato e o substrato”. Tais interações podem ser extensas, porém bastante fracas, e a energia que é liberada quando a partícula é “fisiosorvida”, é tão pequena que pode ser absorvida como vibração de baixa intensidade, na verdade as moléculas ficam aderidas à superfície após um processo de “acomodação” entre as forças atuantes no processo.

Na “Quimiosorção” (abreviatura de adsorção química), as partículas interagem com a superfície formando uma ligação química, usualmente ligações covalentes, e tendem a encontrar um número máximo de sítios com o

substrato. A entalpia de quimiosorção é muito maior do que o da “fisiosorção”, uma molécula “quimiosorvida” pode ser removida separadamente se a valência da ligação não estiver correspondendo com a da superfície (ATKINS, 1991). A isoterma de Langmuir baseia-se no recobrimento gradual de uma superfície pelas moléculas adsorvidas, dando-se a saturação quando a camada adsorvida tem a espessura uniforme de uma molécula. A isoterma é especialmente aplicável aos casos de “quimiosorção”, em que as moléculas adsorvidas são mantidas à superfície por ligações comparáveis às dos compostos químicos, ficam em equilíbrio e formam uma monocamada (CASTELLAN, 1964).

Contudo, contrariando a hipótese inicial, também pode surgir uma espécie de adsorção, a qual acelera muito as velocidades de reação. A camada quimiosorvida desempenha o papel de um composto intermediário no processo da catálise da reação, podendo levar a um processo de multicamadas, onde pode ocorrer ligações molécula-molécula do adsorbato, o de “fisiosorção”. Desta maneira, outras isotermas de adsorção surgiram para tentar explicar melhor cada tipo de fenômeno adsorativo, tal como a Equação de Freundlich, que coloca as possibilidades de reação dentro de proporções logarítmicas e que permitem avaliar se um determinado fenômeno é resultado de uma adsorção em monocamadas ou em multicamadas, associando-se às variáveis a um sistema de regressão, permitindo verificar qual apresenta melhor correlação em cada equação estudada. (ATKINS, 1991).

As equações de Freundlich e Langmuir são representadas da seguinte forma:

Equação de Freundlinch:

$$\text{Log } (x/m) = \text{log } k + n \text{ log } C_f \quad \text{onde:}$$

x/m - massa do soluto adsorvido por unidade de massa do adsorvente (mg/g)

C_f - concentração do soluto em equilíbrio (mg/L)

k - x/m onde C_f é igual a 1 (mg/g)

n - líquido expresso em litro de solução de corante por grama de adsorvente (L/g)

Equação de Langmuir:

$C_f (m/x) = 1/(k_1 k_2) + (1/k_2).C_f$ onde:

k_1 - índice de capilaridade expresso em litro de solução de corante, por corante adsorvido (mg) na saturação (1/mg).

k_2 - a quantia de soluto que deveria saturar a unidade de massa do adsorvente com uma camada única (mg/g)

2.6. – *Pleurotus ostreatus*

O fungo *Pleurotus ostreatus*, pertencente a ordem Aphyllophorales é, em geral, lignícola, ou seja, capaz de degradar a lignina, sendo mais conhecido como causador da podridão branca ou da podridão parda, possuindo um papel fundamental na ciclagem de nutrientes, dentro dos ecossistemas terrestres.(BONONI, 1995).

O *Pleurotus ostreatus* é também chamado Cogumelo Ostra ou Gigante. É um dos mais encontrados no mundo, sendo também comestível. É também um dos mais agressivos, quando se trata de crescimento. (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Sendo fungo lignocelulítico, causador da podridão branca, é um dos responsáveis pela reciclagem do carbono nos ecossistemas. Degradam celulose, hemicelulose e lignina. (BONONI, 1997).

O *Pleurotus ostreatus*, possui um aparato enzimático de celulasas lignases, capazes de quebrar as moléculas dos principais compostos da

madeira (lignina, celulose e hemicelulose)(GUGLIOTTA e CAPELARI in BONONI et al., 1998).

Economicamente este grupo de fungos é importante, seja causando a podridão em madeiras, utilizadas comercialmente, seja como espécie comestível, ou ainda, seja em processos biotecnológicos, já que promovem tanto a biosorção quanto a degradação.

No desenvolvimento de métodos para descoloração e degradação de corantes em efluentes industriais, Vyas e Molitoris (1995) nos mostram trabalhos com culturas lignolíticas de alguns fungos de podridão branca, principalmente o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, com o corante Remazol Azul Brilhante R (RBBR), sendo este utilizado com sucesso.

A podridão branca tem sido estudada largamente para se obter enzimas ligninolíticas úteis para aplicações biotecnológicas. O *Pleurotus ostreatus* produz um tipo de peroxidase extracelular (PoP) e glicose oxidase geradora de H₂O₂. Estudando estas enzimas, Shin et al. (1997), realizaram experimentos de descoloração, onde foi observada a descoloração do corante Remazol Azul Brilhante R (RBBR), no filtrado de cultura de *Pleurotus*. O autor sugere a presença de outras enzimas extracelulares no processo.

2.6.1. – Biosorção e Biodegradação – Atividade enzimática dos fungos da Podridão Branca

A lignina é uma molécula muito complexa, biopolímero de alto peso molecular, de estrutura irregular, amorfo, heterogêneo. (BONONI, 1997). São polímeros fortemente interligados por radicais livres, sem pontes hidrolisáveis.

Na degradação promovida pelos fungos da podridão branca, foram estudadas as principais enzimas que promovem este processo. São elas: a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), Lacases, álcool veratrílico, entre outros. (DURAN e ESPOSITO, 1997).

Nos processos de tratamento de efluentes têxteis hoje utilizados, procuram-se inicialmente, remover os sólidos em suspensão, o ajuste do pH e a diminuição da temperatura. Em seguida, tratamentos com lodo ativado reduzem a carga orgânica e os sólidos sedimentáveis. Neste processo a cor não é removida.

Daí o uso de fungos da podridão branca. Testes feitos com *Phellinus gilvus* mostraram que este fungo pode descolorir completamente o efluente contaminado com corante índigo, apresentando baixa capacidade de redução de toxicidade (até 49%). Mas testes com *Pleurotus sajor-caju*, *Picnoporus sanguineus* e *Phanerochaete chrysosporium* podem descolorir até 94,90 e 75% do corante no efluente e reduzir 97,96 e 90% da toxicidade. (MATHEUS e OKINO in BONONI et al., 1998).

Spadaro et al. (1992), em seus trabalhos com o fungo de podridão branca *Phanerochaete chrysosporium*, degradador de lignina, mostrou que o mesmo mineraliza uma grande variedade de poluentes aromáticos importantes.

Kirby et al. (1995) realizaram testes interessantes em um efluente têxtil artificial, utilizando o fungo *Phanerochaete chrysosporium* para descoloração. Este descoloriu 6 dos 9 corantes sintéticos testados na presença de glicose. A descoloração foi completa em um prazo de 7 dias. Mas o autor ficou em dúvida a respeito da atividade enzimática do fungo. Ele sugere que o fungo utilizou a glicose com fonte primária de carbono e depois começou a degradar o corante, utilizando-o como fonte de carbono.

Royer et al. (1985) realizaram pesquisas com o fungo da podridão branca *Coriolus versicolor*, usado na forma de pellets miceliais para descolorir efluentes de fábricas de papelão que contém lignina proveniente do processo de tratamento da madeira. Os pellets miceliais adsorveram os cromóforos do líquido e ocorreu oxidação na presença de glicose. O processo de adsorção e de oxidação funciona melhor entre os pHs 4 e 5, e em temperaturas entre 25 e 30° C.

Outros experimentos com *Phanerochaete chrysosporium* foram realizados, como o de Podgornik et al. (1999), que usaram este fungo na descoloração de diferentes corantes comerciais, que teve como agente principal a enzima extracelular lignina peroxidase (LiP). Os autores sugerem que é necessário testar o maior número de corantes possíveis, devido às diversas classes estruturais.

Entre as enzimas utilizadas para a descoloração está a lacase. Em experimentos com *Pyricularia oryzae*, Chivukula e Renganathan (1995), demonstraram que a lacase proveniente deste fungo é capaz de oxidar corantes azo fenólicos. A ligação azo é susceptível a redução, o qual gera aminas aromáticas potencialmente carcinogênicas. A oxidação da lacase pode detoxicar os corantes azóicos porque sua reação libera as ligações azo sob a forma de nitrogênio molecular, o qual não permite a formação de aminas aromáticas.

Testes com fungos da podridão branca (*Bjerkandera sp*, *P. chrysosporium* e *Trametes versicolor*) mostraram grande potencial de descoloração (SWAMY e RAMSAY, 1999), quando em contato com corantes como o Amaranto, RBBR, Remazol Laranja e outros.

A descoloração, de qualquer forma, demonstra somente a transformação do grupo cromofórico de um corante, não demonstra sua completa degradação.

A degradação da lignina pode ser convencionalmente dividida em reações de despolimerização, as quais são extracelulares, e o metabolismo dos fragmentos liberados do polímero, é quase sempre intracelular (GLENN e GOLD, 1983). A evidência apresentada indica que os corantes servem como substratos para os fungos lignocelulíticos e também tem valor de determinação no metabolismo secundário deste organismo.

A degradação da lignina ocorre a pHs baixos. Seus ótimos diferem entre as espécies. *P. Chrysosporium* que degrada lignina a pH 4 com perda de atividade a pHs mais baixos. Em outro estudo, a degradação da lignina por *P.chrysosporium* e *Pleurotus sajor-caju* aumenta a atividade com o decréscimo do pH para valores abaixo de 3. (BOYLE et al., 1992).

Tien e Kirky (1983), lembram que a degradação da lignina tem um papel importante no ciclo do carbono na Terra. Além da degradação de lignina, celulose e hemicelulose serem de extrema importância, por se tratarem do material reciclável mais abundante, as moléculas de aminas são muito parecidas com a de lignina, facilitando seu estudo de degradação por fungos da podridão branca que possuem um aparato enzimático para degradá-las.

O mecanismo extracelular envolvido na degradação da lignina pelo *P.chrysosporium* é composto de lignina peroxidases (LiPs) e peroxidases dependentes do manganês (MnPs). Field et al. (1993) fizeram estudos intensivos para provar que fungos da podridão branca são os melhores candidatos para a biorremediação de altos poluentes apolares, quando comparados com microrganismos não ligninolíticos.

A degradação de compostos aromáticos xenobióticos por microrganismos não ligninolíticos ocorre intracelularmente e a conseqüente

biodisponibilidade limitada dos compostos (devido à dissolução e difusão dentro das células) mostra a baixa taxa de biodegradação nestes organismos. Field et al. (1993) ainda afirmam que a descoloração de corantes poliméricos tem provado ser um bom indicador de transformação inicial de xenobióticos medidas pela atividade peroxidativa do fungo.

O *Phanerochaete chrysosporium* é extensivamente estudado por sua capacidade de degradação de compostos organoclorados recalcitrantes, até a completa mineralização (BONONI, 1997). Para estes fins estão sendo executados trabalhos com *Pleurotus spp*, *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, entre outros.

É importante a relevância das enzimas produzidas pelos fungos da podridão branca, para verificação em estudos posteriores, já que pode vir a ser um bom meio de tratamento de efluentes têxteis, pois a composição dos corantes é muito parecida com a lignina.

3 - MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. – Cultivo do Microrganismo e Paramorfogênese

(realizado no Instituto de Botânica de São Paulo)

Material:

- ❑ Vidraria: Vidraria comum de laboratório, alça de platina, bisturi;
- ❑ Aparelhos: autoclave Fabbe modelo 104C, Estufa incubadora para BOD 101 std Eletrolab, Blender Mixing com copo de aço inoxidável de 250 mL e motor de uma velocidade Eberbach, Shaker incubador série 25 New Brunswick.

Reagentes:

- ❑ Meios de cultivo BDA e ME, água destilada e esterilizada.
- ❑ Microorganismos: três linhagens do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*: CCB 004 (ATCC96999) de cultivo comercial de Arujá, SP, CCB010 do México (INEREB-A), CCB 650 da China. A partir de tubos contendo culturas-estoque da coleção de culturas de basidiomicetos do Instituto de Botânica de São Paulo, amostras das linhagens foram obtidas.

3.1.1. BDA (batata-dextrose-agar)

140g de batata inglesa

10g de dextrose

20g de ágar

1000 mL de água destilada

Cozinhar a batata em 500 mL de água destilada. Depois de cozida, peneirar em peneira para análise com abertura de malha de 0,105 mm e recolher o filtrado.

Juntar o filtrado de batata com o ágar e a dextrose. Completar o volume com água destilada até 1000 mL.

Distribuir o meio bem dissolvido em erlenmeyers de 1000 mL, sem que o conteúdo ultrapasse a metade da capacidade total do frasco, fazendo assim com que o líquido não transborde no decorrer da esterilização, colocando, desta forma apenas 500 mL em cada erlenmeyer. Tampá-lo com um tampão feito com algodão hidrófobo, recoberto com plástico polipropileno, para que não umedeça o tampão. Prender com um elástico ou barbante, para que não destampe no momento da esterilização.

O período de esterilização é de 20 minutos, em temperatura e pressão constantes. Após o término da esterilização, o meio é distribuído em placas de Petri, deixando o meio com aproximadamente 0,5cm de espessura. Este passo é feito na câmara de fluxo laminar contínuo e próximo à chama do bico de Bunsen, para que a boca do frasco seja flambada antes da distribuição do meio e fazendo com que o ar quente colabore para a não contaminação do meio durante o manuseio.

Esperar que o meio se solidifique e conservá-lo sob refrigeração por até 40 dias.

3.1.2. ME (extrato de malte - meio líquido)

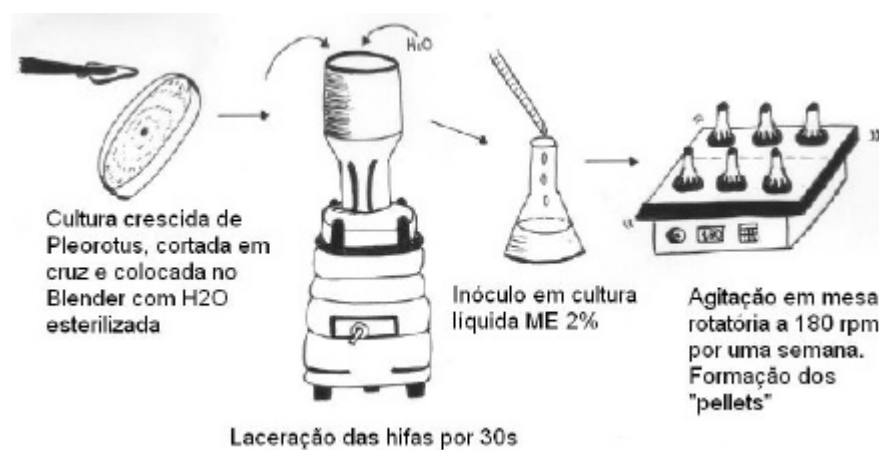
10g de Extrato de Malte
10g de glicose
0,5g de peptona
500mL de água destilada

As substâncias sólidas foram pesadas e em seguida colocado o valor de 500 mL de água. Distribuir 100ml de meio em erlenmeyers de 250 mL, tampar com tampão feito com algodão hidrófobo e esterilizar em autoclave por 15 a 20 minutos.

3.2. - Método de pelletização, com a utilização do blender:



Figuras A e B: Aparelho Blender Mixing com copo de aço inoxidável.



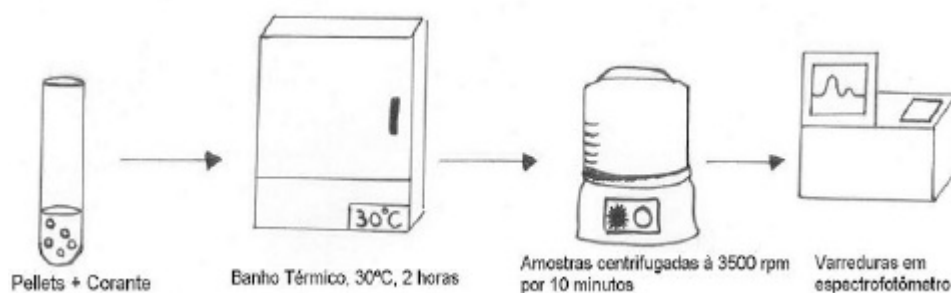


Figura C – Esquema de “pelletização” e biosorção

Dentro da câmara de fluxo laminar contínuo, próximo à chama do bico de Bunsen e com todo o material previamente autoclavado, iniciou-se o procedimento adicionando 100 mL de água destilada esterilizada no copo de blender. Cortou-se em cruz o meio de cultura de uma placa de Petri com a linhagem já crescida; colocou-se no copo e ligou-se o aparelho por 30 segundos.

Deste inóculo preparado, retirou-se uma alíquota de 5mL e inseriu-se no erlenmeyer de meio líquido. Tampou-se com tampão de algodão hidrófobo e foi levado para o shaker (180 rpm) em sala climatizada (28°C) para incubação. Os pellets cresceram no prazo de 4 a 6 dias. Este procedimento foi repetido para as três linhagens.

Quando os pellets estavam com o tamanho apropriado para os testes, filtrou-se o meio de cultura, separando os pellets do meio. Após separação, lavou-se os pellets com água destilada. Acondicionou-se os mesmos em erlenmeyers com água destilada sob refrigeração

3.3. – Material para testes biosortivos:

(testes realizados na Universidade Estadual Paulista – Campus Bela Vista – Departamento de Microbiologia e Bioquímica)

- ❑ Corantes utilizados: corantes azóicos
- ❑ Vidrarias: Tubos de rosca, tubos comuns, Erlenmeyers, balões volumétricos, pipetas, cristalizador, balança analítica, pipeta Pasteur com bordas arredondadas e demais utilitários comuns de laboratório.

- ❑ Aparelhos: pHmetro, balança analítica Mettler H6T, refrigerador Consul 280 litros. pHmetro, espectrofotômetros Metrolab modelo 1700 Micronal modelo B382 e UV-2401PC Shimadzu, autoclave Fabbe modelo 104C, estufa Fanem modelo Cb2, refrigerador Consul modelo 280, centrífugas MLW modelos k23 e K24 e Fanem - modelo Excelsa2.
- ❑ Microorganismo: *Pleurotus ostreatus* linhagens CCB 004, 010 e 650, autoclavados e não autoclavados, já pelletizados.

3.4. - Preparo das soluções de corante e testes biosortivos

3.4.1. Corante:

3.4.1.1. - Procion Blue MX-G

λ : 375,4 nm (ponto isobéstico);

Grau de pureza: 65%

Massa Molar: 1262 g/mol

Estrutura química: patente industrial

O corante de aplicação têxtil foi preparado por simples dissolução em água destilada com valores de pH ajustados para 2.50, 4.50 e 6.50. O corante foi preparado na concentração de 1mg/mL a fim de poder posteriormente sofrer diluições adequadas para cada teste.

3.5. – Teste de biosortividade

3.5.1. - Varredura espectral do corante Procion Blue MXG em diferentes valores de pH

Foram realizadas varreduras espectrais do corante Procion Blue MXG com concentração de 100 µg/mL entre 200 e 800 nm nos valores de pH 2,50; 4,50 e 6,50, visando determinar o comprimento de onda mais adequado para as determinações quantitativas do corante

3.5.2. Análise Quantitativa

Foram realizadas varreduras espectrais do corante Procion Blue MXG com concentrações variando de 20 a 100 µg/mL entre 200 e 800 nm, nos valores de pH 2,50; 4,50 e 6,50, visando determinar os valores de absorbância no comprimento de onda mais apropriado (ponto isobéstico), para a confecção das retas padrões.

3.5.3 Teste de biosortividade do corante em diferentes valores de pH

O estudo da remoção total do corante, em diferentes valores de pH foi realizado da seguinte maneira: As amostras contendo “pellets” de *Pleurotus ostreatus*, após o ajuste do pH, foram divididas em duas partes sendo uma conservada ao natural para os testes de biosorção e a outra autoclavada a 1,2 atmosferas, 120 °C por 20 minutos, e colocada também para os testes de biosorção.

Obtenção de peso seco da biomassa: Durante os experimento, foram retiradas amostras de biomassa e levadas à estufa a 105°C para obtenção de

peso seco constante que possam vir a ser expressos em mg/mL, em termos de peso seco.

Foram retiradas alíquotas de 2, 4, 6 e 8 mL de biomassa e acrescentadas a tubos de ensaio com rosca em triplicata, contendo água com pHs ajustados para 2.50, 4.50 e 6.50, nas proporções de 7, 5, 3 e 1 ml respectivamente, em relação às biomassas empregadas, e em seguida foi aplicado o corante (1mL) cuja concentração final foi de 100µg/mL. Os tubos assim preparados foram levados a banho térmico com temperatura de 30°C pelo tempo de 120 minutos. Após este período de equilíbrio, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos, sendo, a seguir, analisadas espectrofotometricamente.

3.5.4. Teste de interação: *Pleurotus ostreatus* com corante Procion Blue MXG

O corante azóico Procion Blue MXG foi preparado na concentração de 100 µg/ml, O pH da água foi ajustado para: 2,50. Foi feita a seguinte interação: 1 mL de água acidulada, 1 mL de corante e 1 mL de biomassa.

Este procedimento foi repetido para as três linhagens de *Pleurotus ostreatus*, autoclavados e não autoclavados.

O experimento foi levado para estufa, a 30°, para incubação, inicialmente por 2 horas. Após este período, foram realizadas varreduras espectrais na faixa de 800 a 300 nm, sendo que nas biomassas utilizadas foram determinados os valores das concentrações em mg/mL. (peso seco)

3.5.5. – Aplicação das Equações das Isotermas de Adsorção no estudo da interação biosortiva entre diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus* e o corante Procion Blue MXG

Para o estudo da aplicabilidade das Equações das Isotermas de Adsorção de Freundlich e Langmuir na interação entre a forma paramorfogênica de diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus* e o corante Procion Blue MXG, foram realizadas as seguintes correlações:

O corante Procion Blue MXG foi preparado na concentração de 100µg/mL, com o pH ajustado para 2,50, e concentrações variadas de biomassa em forma de pellets foram adicionadas à solução de corantes e mantidas a 30° C por 120 minutos, para se estabelecer o tempo de equilíbrio. Após este período, os tubos foram centrifugados a 3.500 rpm e a concentração do corante foi determinada em espectrofotômetro.

Com os dados obtidos, foi possível a realização do estudo da aplicabilidade das isotermas, (Oliveira et al 1983), conforme segue:

Equação de Freundlich

$\log(x/m) = \log k + n \log C_r$, sendo:

x/m = concentração de corante adsorvido por unidade de massa de biomassa (µg/µg)

C_r = concentração de corante remanescente em solução (µg/mL)

k = x/m quando C_r é igual a 1

$\log K$ = intercepto em y

n = inclinação

Equação de Langmuir

$C_r.(m/x) = 1/(k_1/k_2) + (1/k_2).C_r$, sendo:

K_1 = índice de capilaridade

K_2 = quantidade de soluto que satura uma unidade de adsorvente com uma monocamada

C_r = concentração do corante remanescente no equilíbrio ($\mu\text{g/mL}$)

3.5.6. Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 do *Pleurotus ostreatus* não autoclavado e autoclavado com o corante Procion Blue MXG, durante 100 horas, em diferentes valores de pH

O corante azóico Procion Blue MX-G foi preparado na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. O pH da água foi ajustado para: 2,50, 4,50 e 6,50. Seguiu-se então a seguinte divisão de alíquotas em mL, em erlenmeyers, em várias replicatas: 10 ml de biomassa (concentração: 1,2 mg/mL) , água acidulada: 26 mL, corante: 4 mL, em cada erlenmeyer.

O experimento foi mantido em estufa a 30° C, tampado, e foram realizadas leituras em espectrofotômetro de 30 em 30 minutos nas primeiras 5 horas, e depois em tempos aleatórios, no comprimento de onda de 375,4 nm. Para cada leitura, foi retirado um mL de solução, em condições assépticas (pipeta estéril e próximo ao bico de bunsen).

Este teste foi feito com biomassa não autoclavada e autoclavada e suas leituras foram realizadas em um período aproximadamente de 100 horas.

4. – RESULTADOS

4.1. – Corpo de frutificação, crescimento em placa de petri e homogeneidade dos pellets de *Pleurotus ostreatus* (figuras 1 e 2)



Figura 1: Corpo de frutificação do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* (à esquerda) e seu crescimento após repicagem em placa de petri em meio de cultura BDA (após uma semana de crescimento em BOD a 28°C)

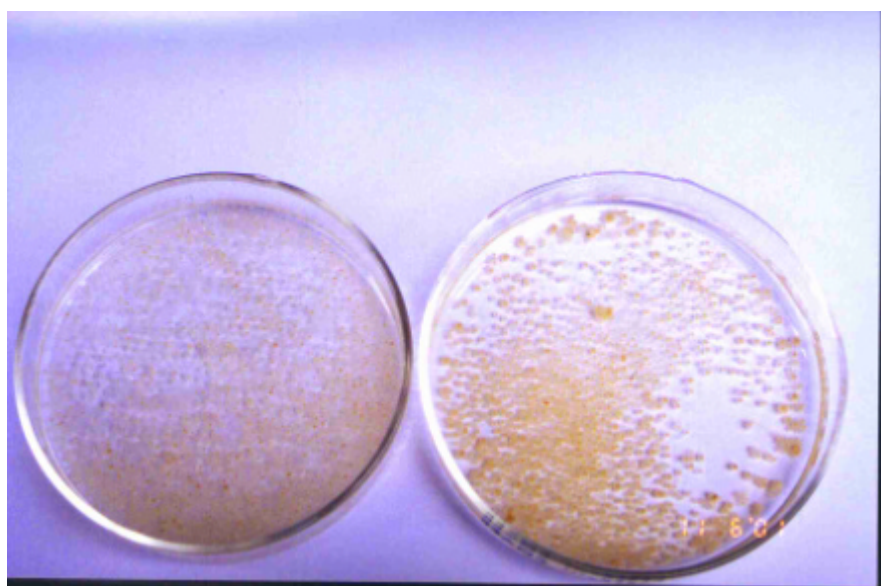


Figura 2 Comparação entre pellets de *Pleurotus ostreatus* não autoclavado (esquerda) com pellets autoclavados (direita), após paramorfogênese física com o uso do blender

4.2. – Aspectos de um efluente poluído com corantes e resultados de experimentos de adsorção entre *Pleurotus ostreatus*, após paramorfogênese e o corante azóico: Procion Blue MX-G (Figuras 3a e 3b)



Figura 3 (a): Aspecto de despejo de águas residuárias de indústrias têxteis em córregos e rios. Observar coloração final das águas.

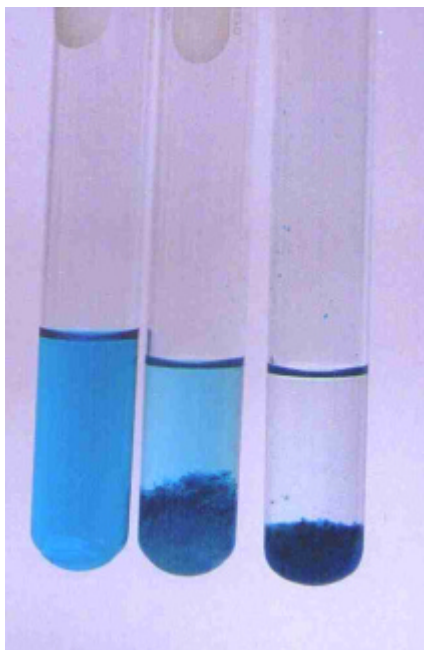


Figura 3 (b): Utilização do basídio *Pleurotus ostreatus* (CCB 010) para biorremediação de águas residuárias coloridas. Corante Procion Blue MX-G (na concentração de 100 ug/ml) e seu aspecto após interação com o basídio *Pleurotus ostreatus*, não autoclavado e autoclavado (da esquerda para a direita), contendo a quantidade máxima de biomassa experimental com o corante adsorvido em seu pH ótimo (2,50)

4.3. – Obtenção dos Espectros do Corante Procion Blue MXG

Espectros de absorção do corante Procion Blue MXG em leituras de 200 a 800 nm e em diferentes valores de pH (Figuras 4, 5, 6 e 7)

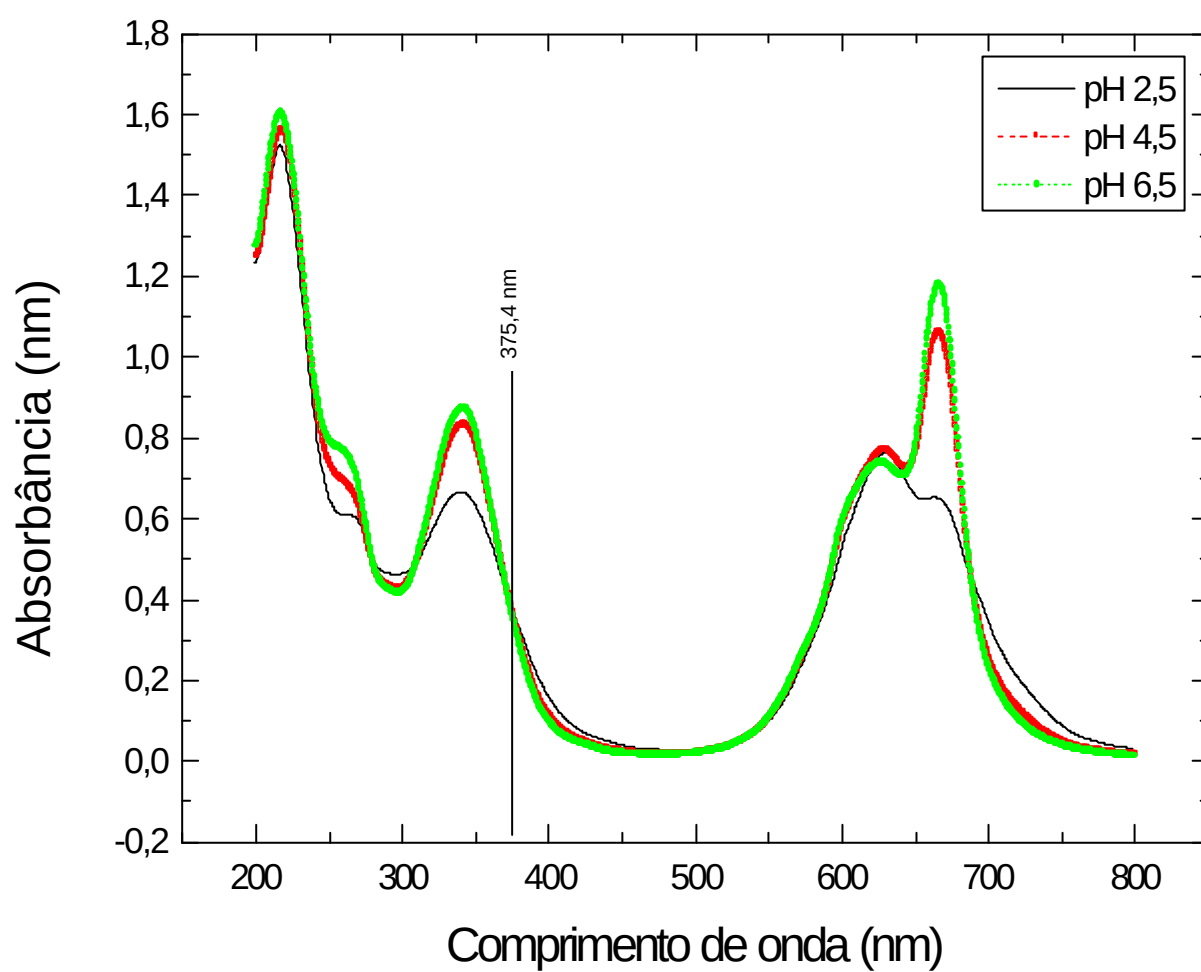


Figura 4: Curva de absorvância do corante Procion Blue MXG
Valores de pH; 2,50; 4,50 e 6,50
Concentração do corante: 100 $\mu\text{g/mL}$
Caminho óptico de 5 mm
Cubeta de Quartzo
Leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC

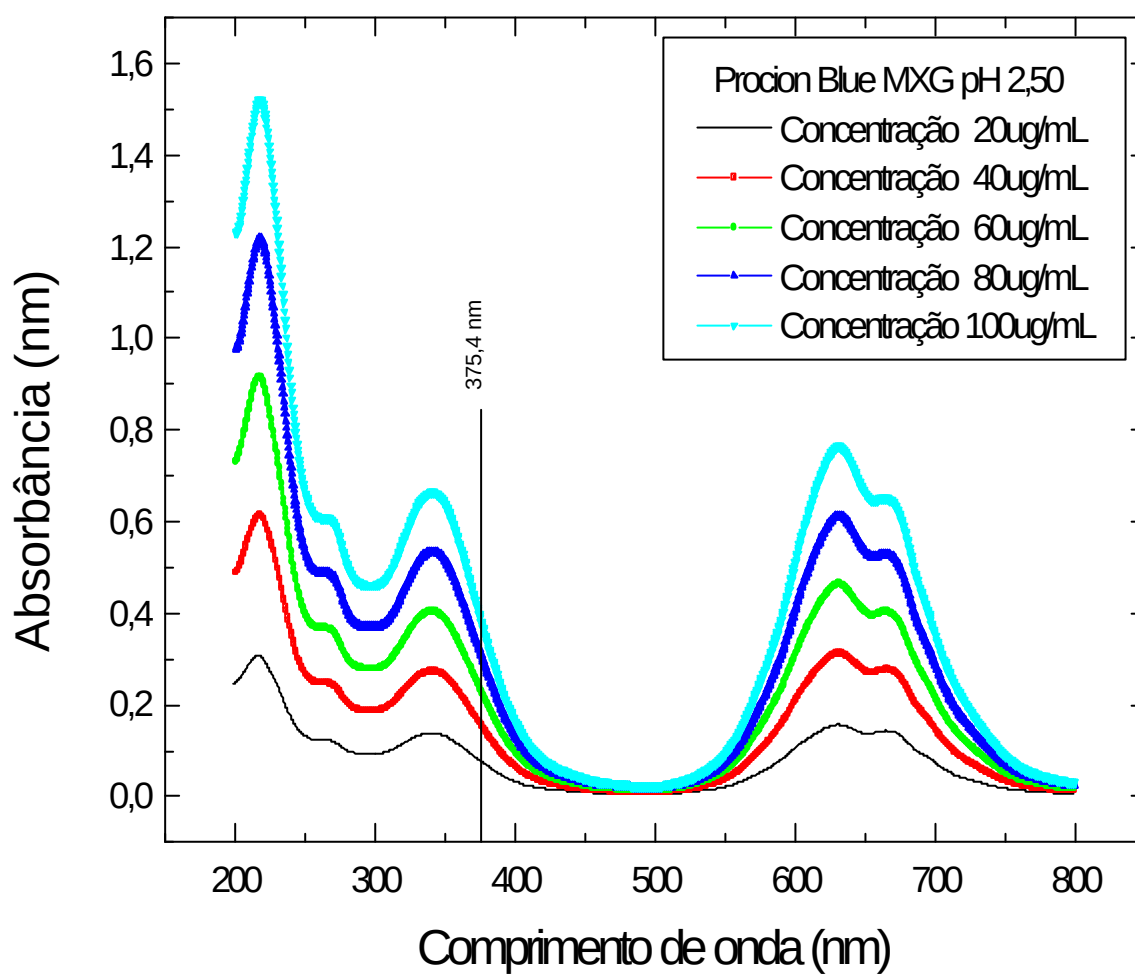


Figura 5: Espectro de absorção do Corante Procion Blue MXG nas seguintes concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100µg/mL, pH 2,50
Caminho óptico de 5mm.
Absorbância^{375,4 nm} = 0,00427 + (0,0038 * concentração do corante)
R= 0,99987
Leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC

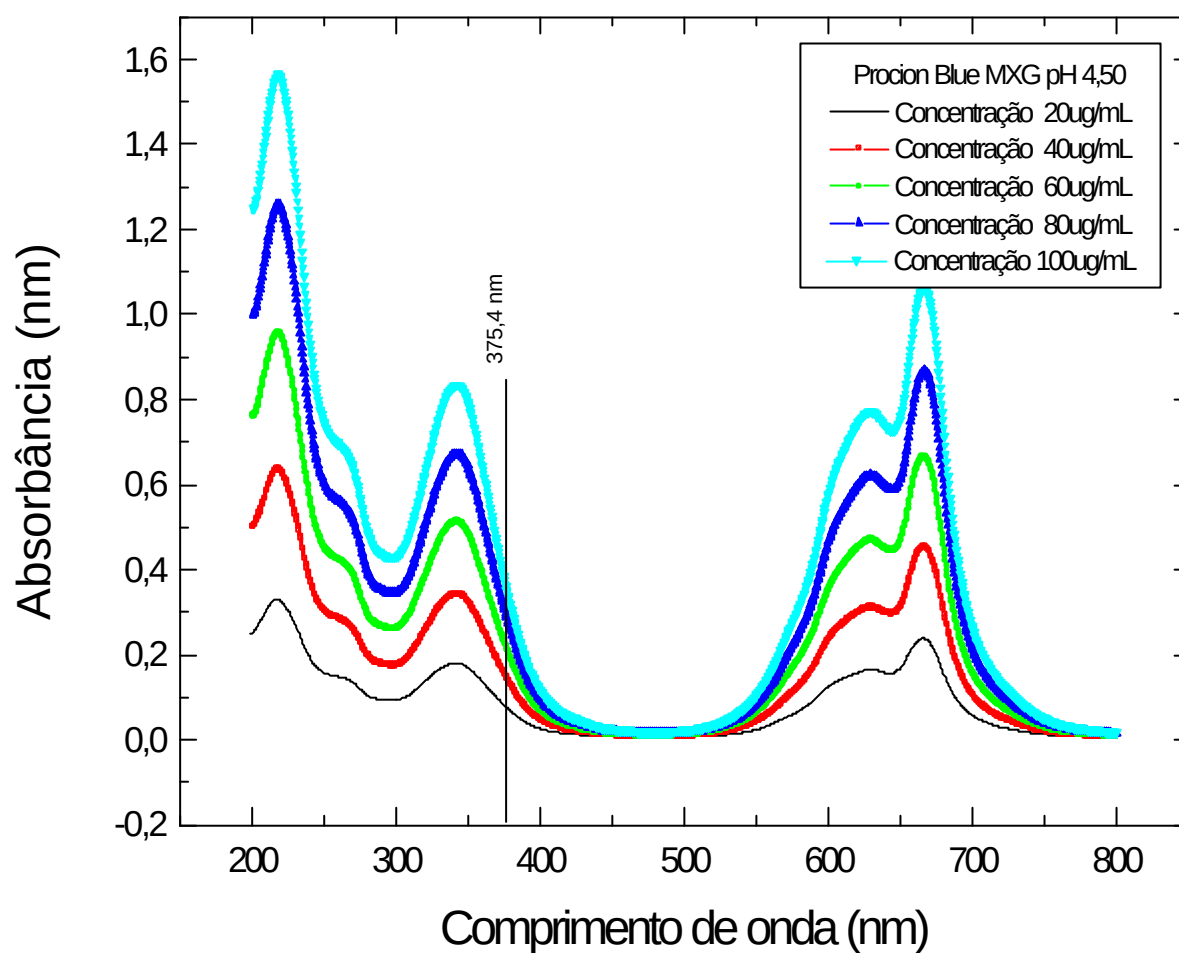


Figura 6: Espectro de absorção do Corante Procion Blue MXG nas seguintes concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100µg/mL, pH 4,50
Caminho óptico de 5mm
Absorbância^{375,4 nm}=0,00929 +(0,00361 * concentração do corante)
R= 0,99993
Leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC

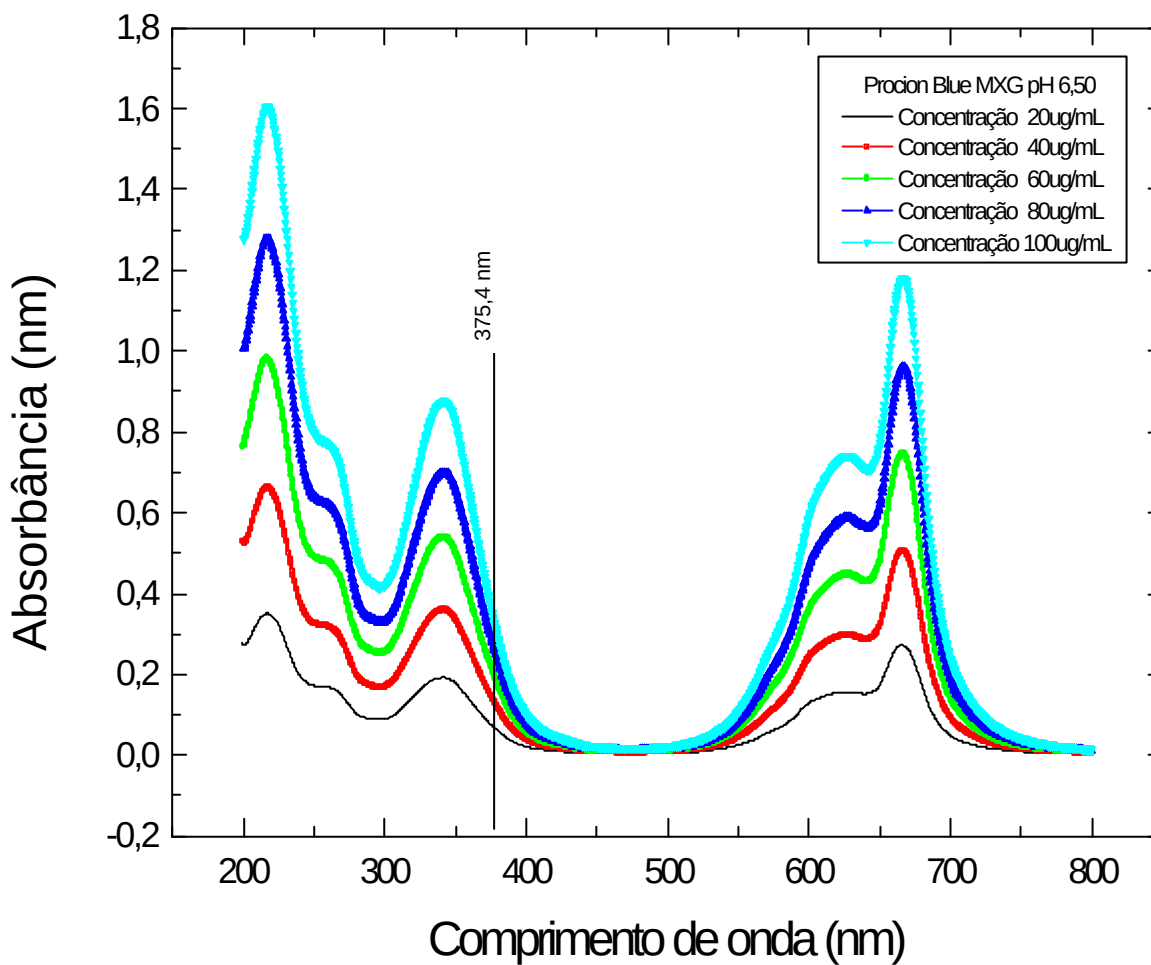


Figura 7: Espectro de absorção do Corante Procion Blue MXG nas seguintes concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100µg/mL pH 6,50.
Caminho óptico de 5 mm
Absorbância^{375,4 nm} = $0,00659 + (0,0035 * \text{concentração do corante})$
R= 0,99988
Leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC

4.4. Teste de Biosortividade dos corantes em diferentes valores de pH

Estudo da interação biosortiva entre *Pleurotus ostreatus* paramorfogênico autoclavado, linhagens CCB 004, CCB 010 e CCB 650, não autoclavados e autoclavados e o corante Procion Blue MXG, nos seguintes valores de pH: 2,50; 4,50; 6,50 (Figuras: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16)

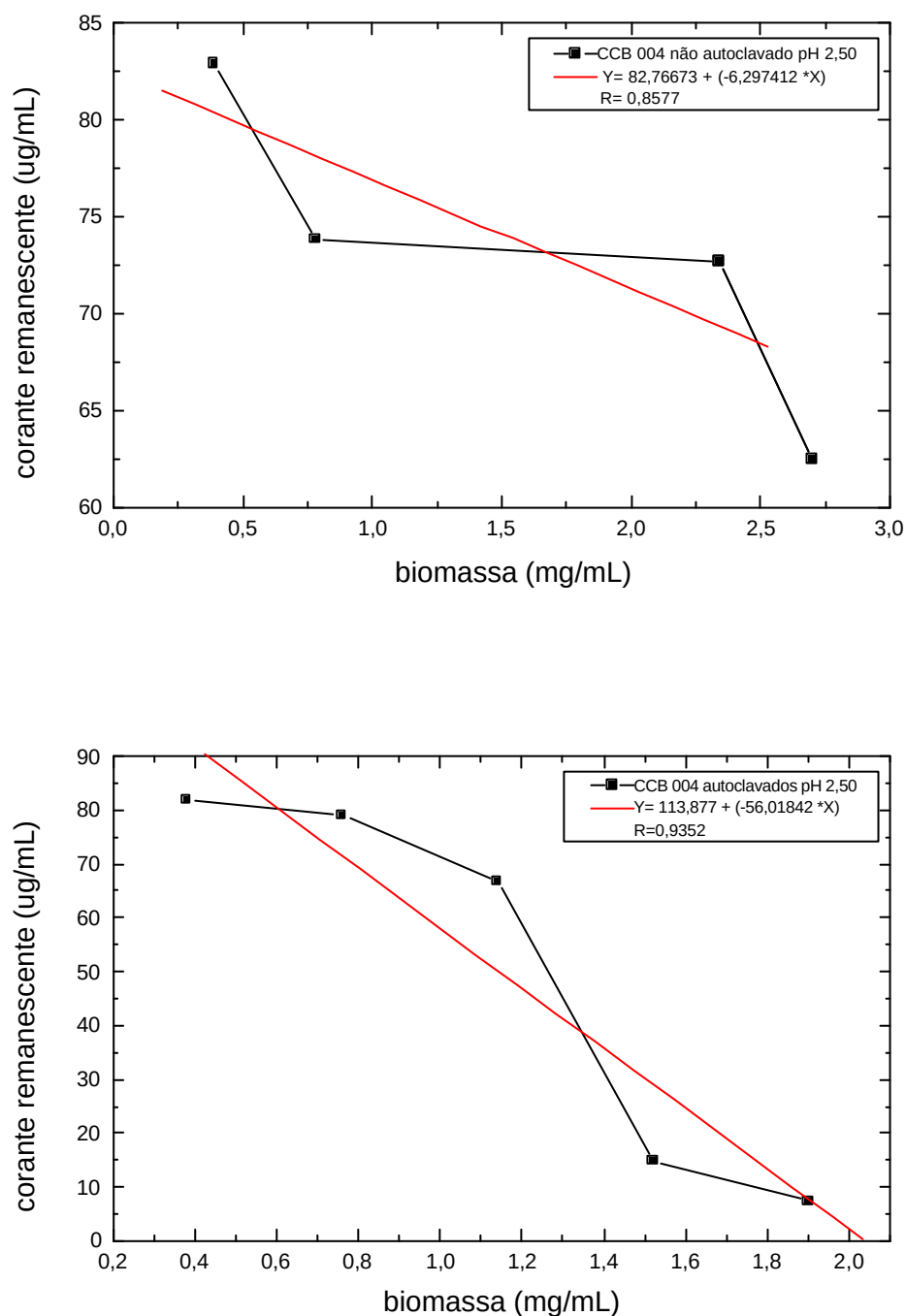


Figura 8: *Pleurotus ostreatus*, linhagem CCB 004 não autoclavado e autoclavado em contato com corante Procion Blue MX-G (concentração inicial 100 µg/ml), em pH 2,50, temperatura 30° C, tempo de contato: 120 minutos.

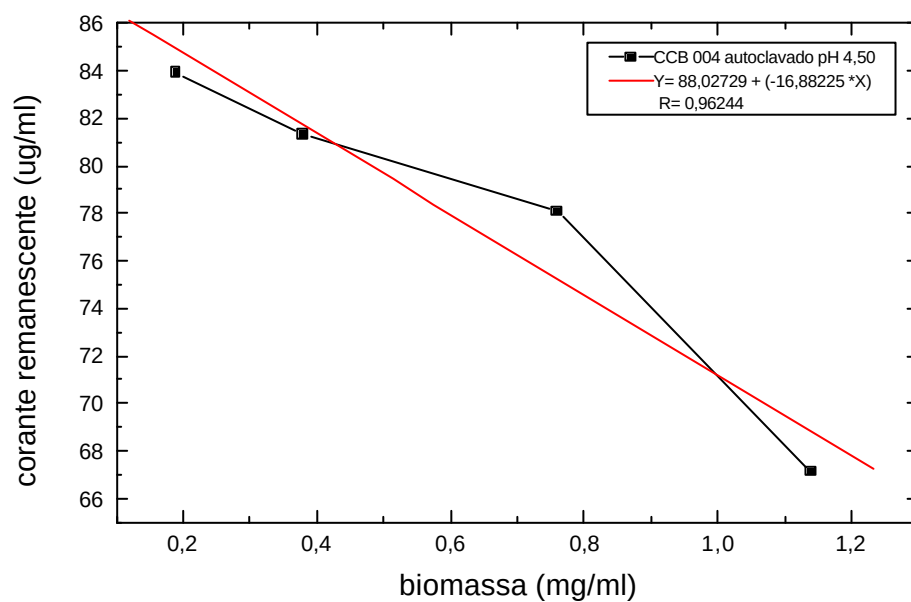
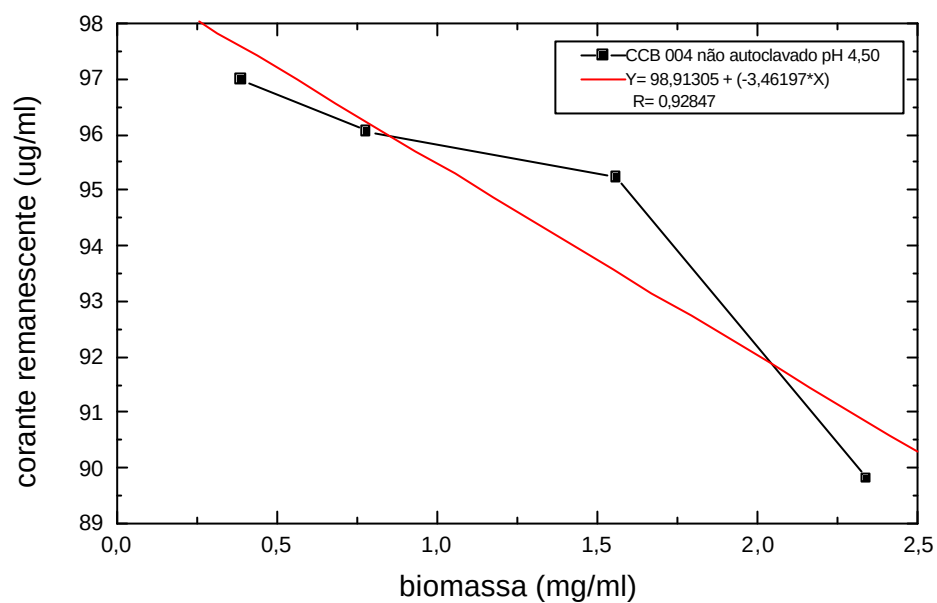


Figura 9: *Pleurotus ostreatus*, linhagem CCB 004 não autoclavado e autoclavado em contato com corante Procion Blue MX-G (concentração inicial 100 µg/ml), em pH 4,50, temperatura 30° C, tempo de contato: 120 minutos.

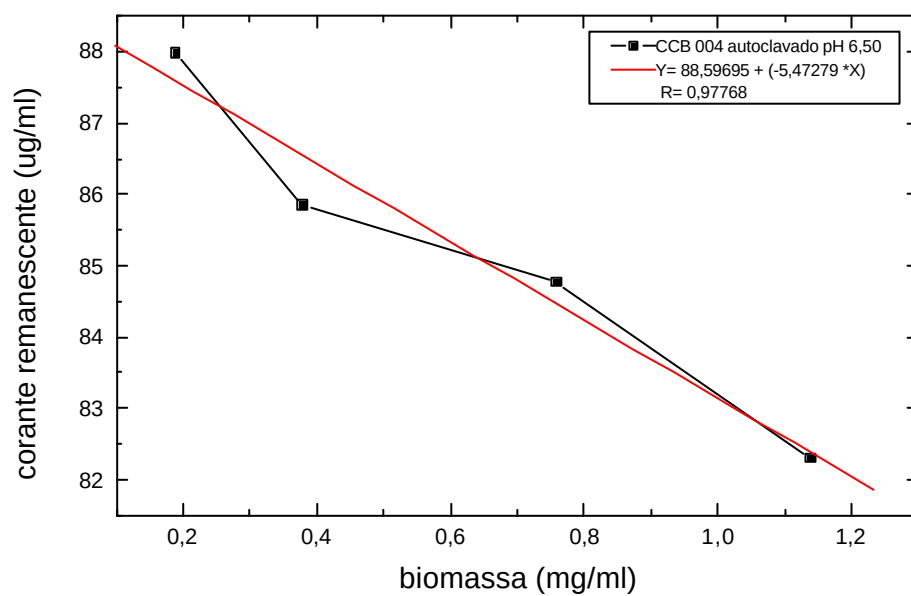
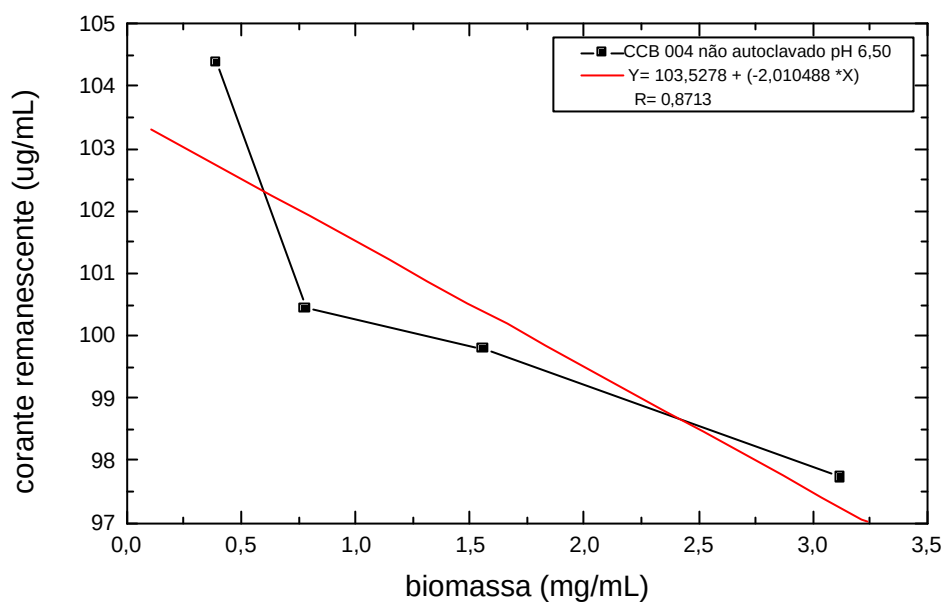


Figura 10: *Pleurotus ostreatus*, linhagem CCB 004 não autoclavado e autoclavado em contato com corante Procion Blue MX-G (concentração inicial 100 $\mu\text{g/ml}$), em pH 6,50, temperatura 30° C, tempo de contato: 120 minutos.

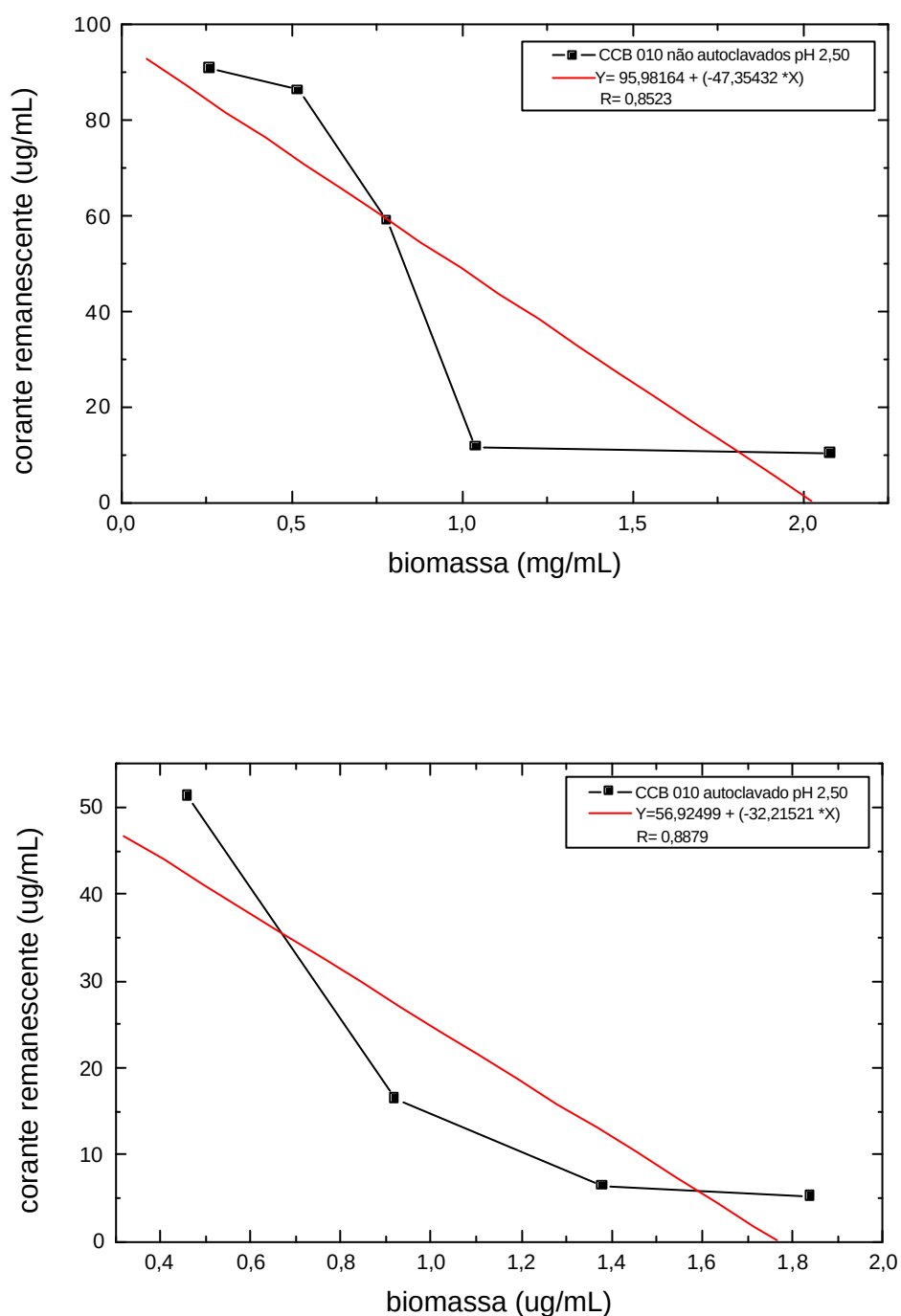


Figura 11: *Pleurotus ostreatus*, linhagem CCB 010 não autoclavado e autoclavado em contato com corante Procion Blue MX-G (concentração inicial 100 µg/ml), em pH 2,50, temperatura 30° C, tempo de contato: 120 minutos.

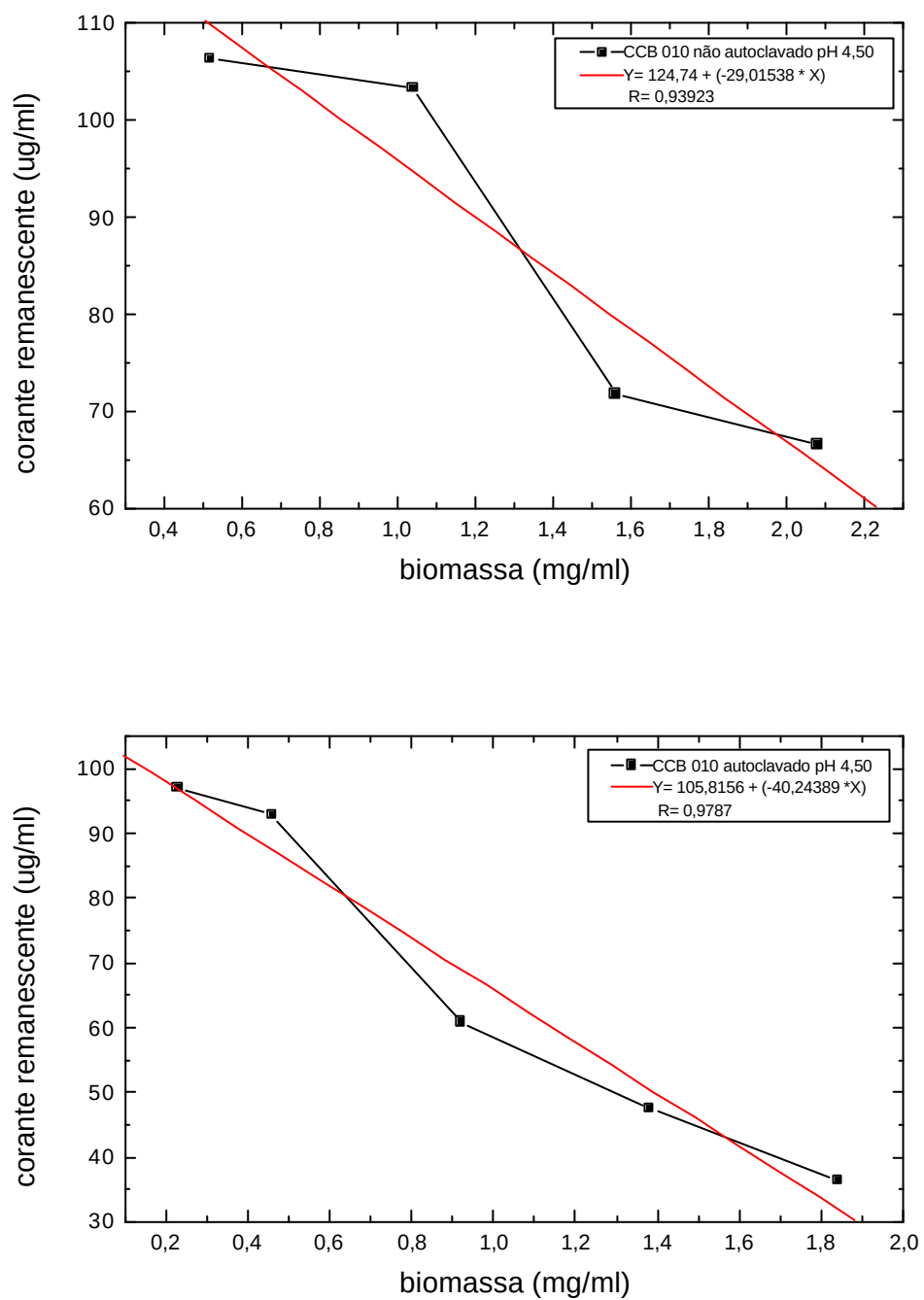


Figura 12: *Pleurotus ostreatus*, linhagem CCB 010 não autoclavado e autoclavado em contato com corante Procion Blue MX-G (concentração inicial 100 µg/ml), em pH 4,50, temperatura 30° C, tempo de contato: 120 minutos.

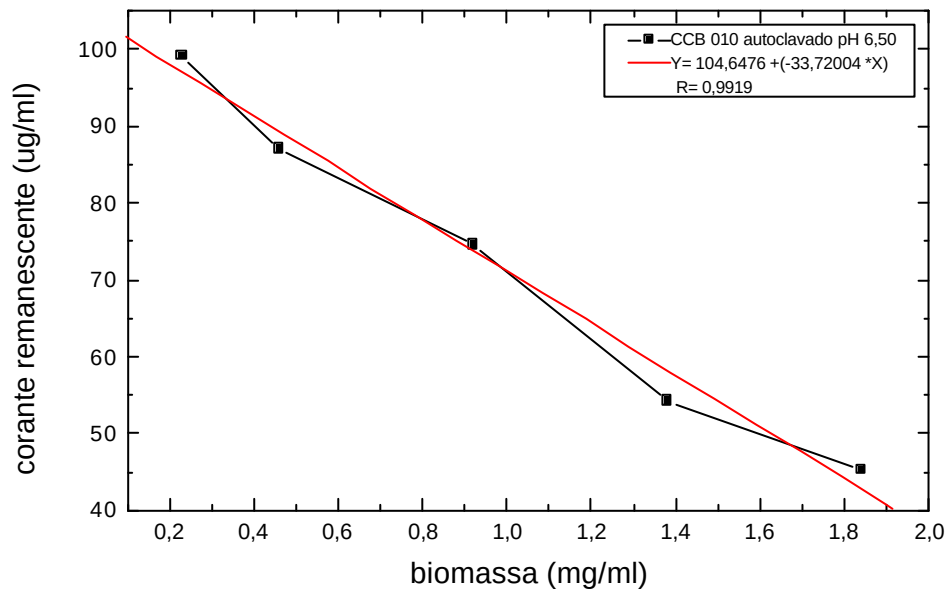
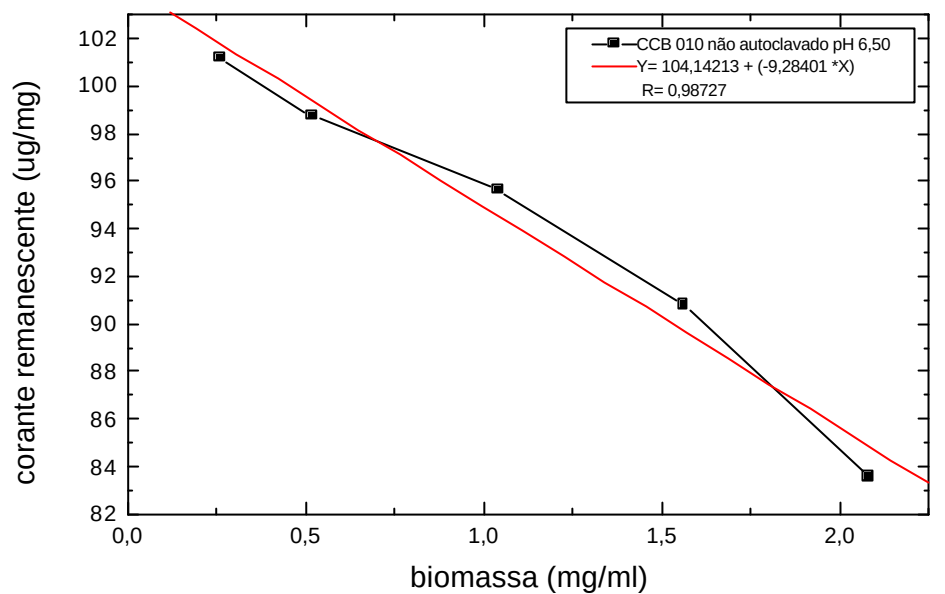


Figura 13: *Pleurotus ostreatus*, linhagem CCB 010 não autoclavado e autoclavado em contato com corante Procion Blue MX-G (concentração inicial 100 µg/ml), em pH 6,50, temperatura 30° C, tempo de contato: 120 minutos.

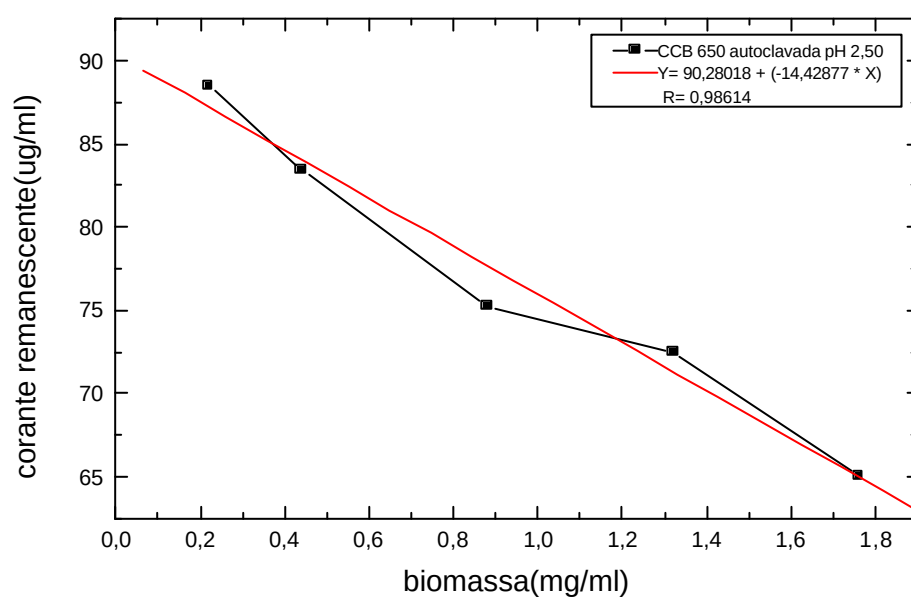
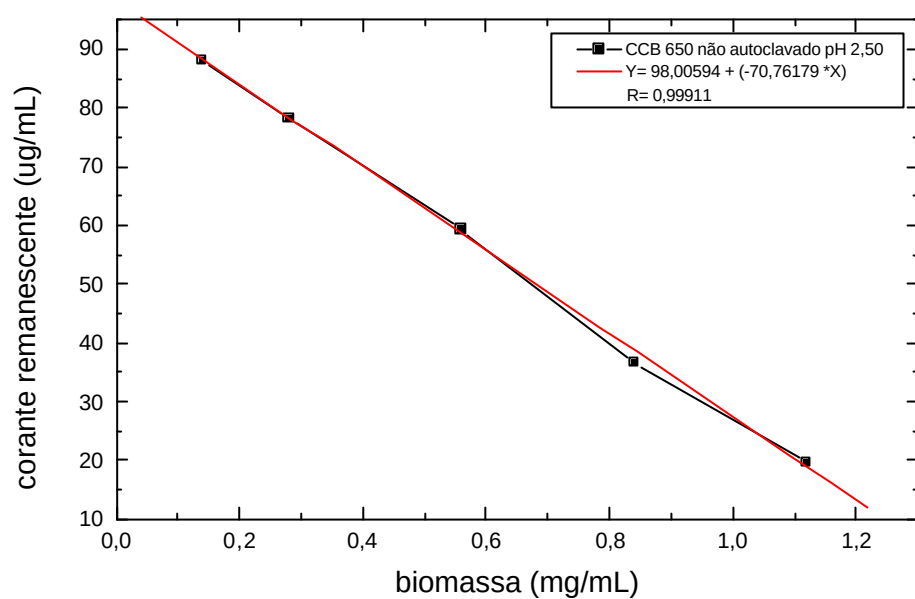


Figura 14: *Pleurotus ostreatus*, linhagem CCB 650 não autoclavado e autoclavado em contato com corante Procion Blue MX-G (concentração inicial 100 $\mu\text{g/ml}$), em pH 2,50, temperatura 30° C, tempo de contato: 120 minutos.

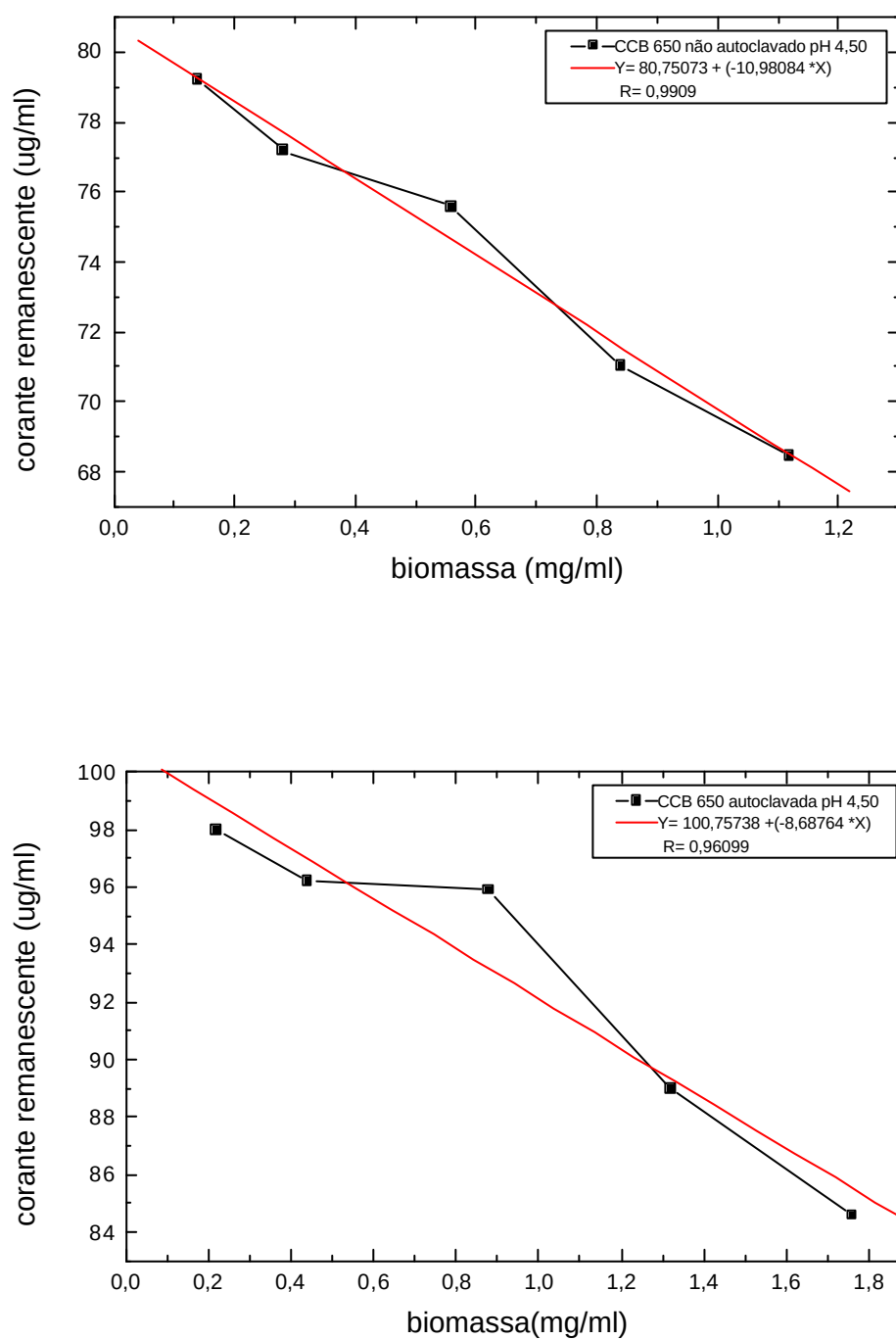


Figura 15: *Pleurotus ostreatus*, linhagem CCB 650 não autoclavado e autoclavado em contato com corante Procion Blue MX-G (concentração inicial 100 µg/ml), em pH 4,50, temperatura 30° C, tempo de contato: 120 minutos.

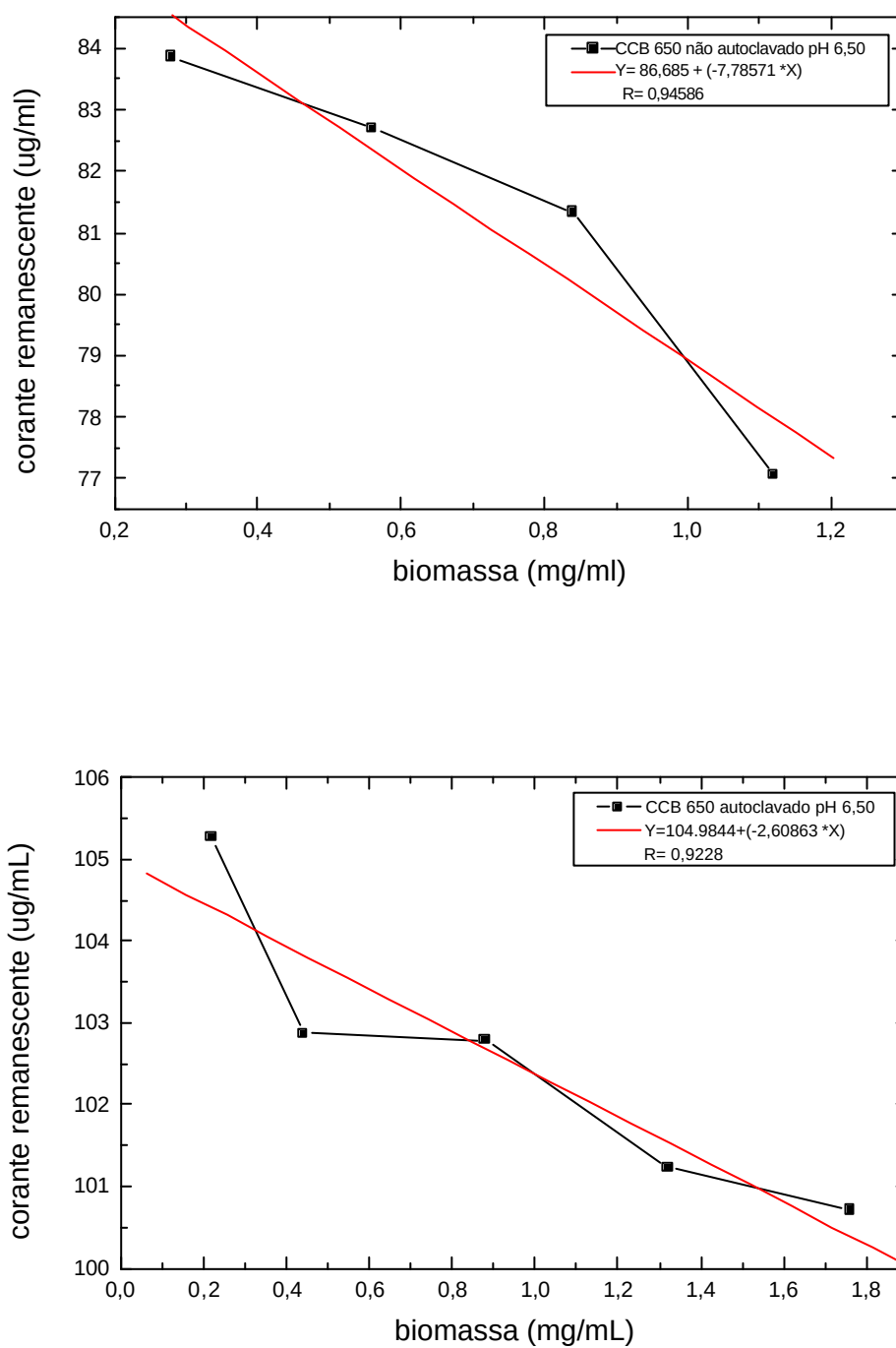


Figura 16: *Pleurotus ostreatus*, linhagem CCB 650 não autoclavado e autoclavado em contato com corante Procion Blue MX-G (concentração inicial 100 µg/ml), em pH 6,50, temperatura 30° C, tempo de contato: 120 minutos.

4.5. – Estimativa de Remoção Total dos Corantes em Solução

Estimativa de remoção do corante Procion Blue MXG pela forma paramorfogênica das linhagens 004, 010 e 650 de *Pleurotus ostreatus* não autoclavado e autoclavado em diferentes valores de pH (Tabela 1)

Tabela 1: Estimativa de remoção total do corante Procion Blue MXG, na concentração inicial de 100µg/mL, pelas linhagens CCB 004, CCB 010 e CCB 650, na forma paramorfogênica de *Pleurotus ostreatus*, expresso em mg/mL de biomassa (peso seco), em diferentes valores de pH

<i>Pleurotus ostreatus</i>			
Linhagens	pH	Não autoclavado	Autoclavado
	2,50	13,14	2,03
CCB 004	4,50	28,57	5,21
	6,50	51,49	16,19
	2,50	2,03	1,77
CCB 010	4,50	4,30	2,63
	6,50	11,21	3,10
	2,50	1,38	6,25
CCB 650	4,50	7,35	11,59
	6,50	11,13	40,24

4.6. - Teste de Biosortividade do corante com diversas linhagens em pH 2,50

Estudo da interação biosortiva através de varreduras espectrais entre *Pleurotus ostreatus* paramorfogênico não autoclavado e autoclavado, linhagens 004, 010 e 650, em contato com corante Procion Blue MXG (conc. inicial 100µg/ml) em pH 2,50 (pH ótimo), após contato de 120 minutos. (Figuras 17 e 18)

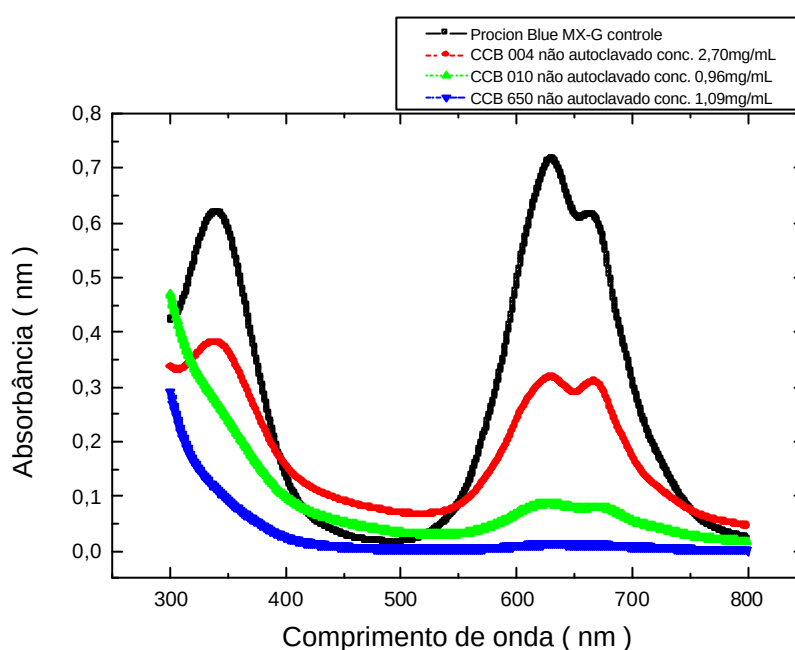


Figura 17: Varreduras espectrais com o corante Procion Blue MXG em sua maior concentração (100µg/mL) e as três linhagens de *Pleurotus ostreatus* não autoclavados, pH 2,50, após 120 minutos de contato a 30°C.

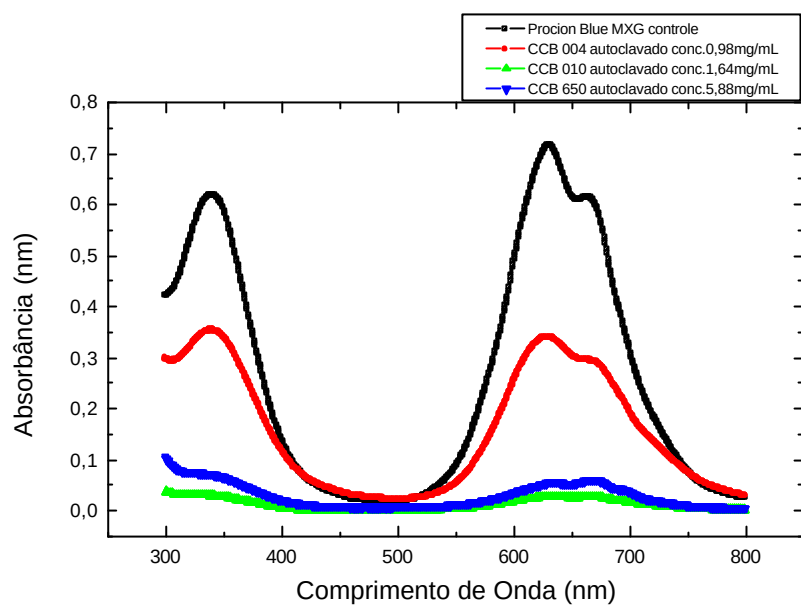
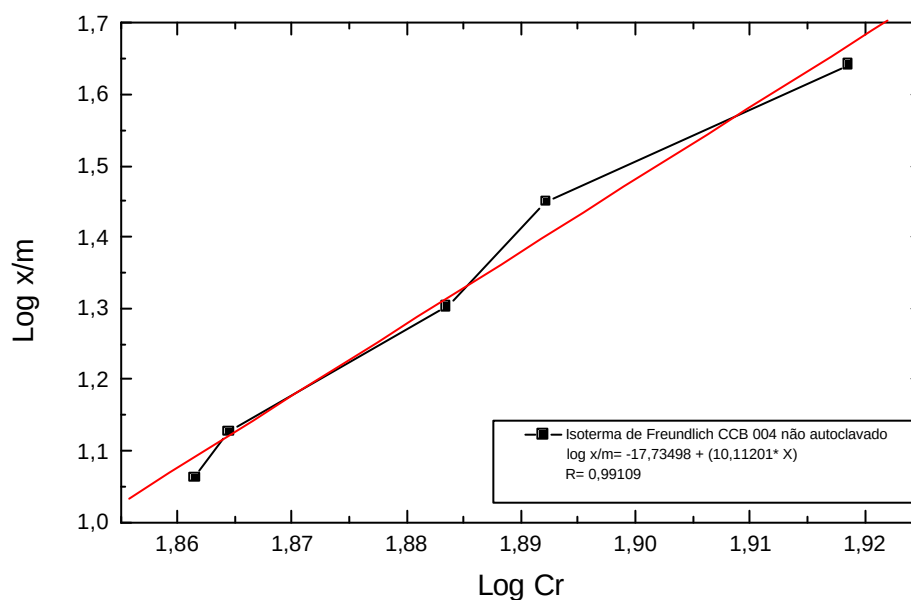


Figura 18: Varreduras espectrais com o corante Procion Blue MXG em sua maior concentração (100µg/mL) e as três linhagens de *Pleurotus ostreatus* autoclavados, pH 2,50, após 120 minutos de contato a 30°C.

4.7. – Teste de biosorção segundo as equações das Isotermas de Adsorção de Freundlich e Langmuir

Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa não autoclavada e autoclavada das três linhagens de *Pleurotus ostreatus* paramorfogênico, realizado através das equações das Isotermas de adsorção de Freundlich e Langmuir nas melhores condições biosortivas: pH 2,50 e temperatura 30° C. (Figuras 19, 20, 21, 22, 23 e 24)



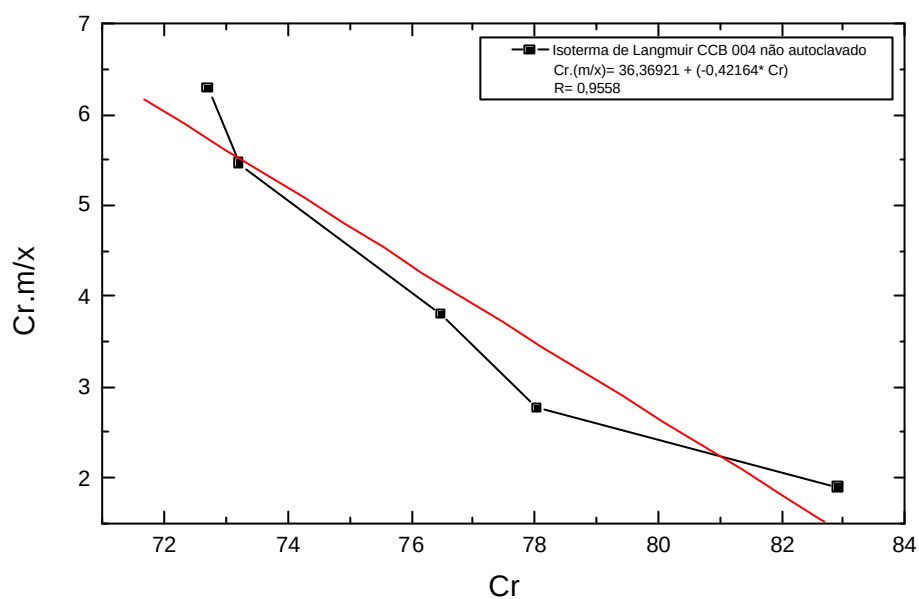


Figura 19: Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de *Pleurotus ostreatus*, CCB 004 não autoclavado realizado através das isotermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50 e temperatura de 30°C. Concentração inicial do corante: 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,39 e 2,70 mg/mL e tempo de contato 120 minutos

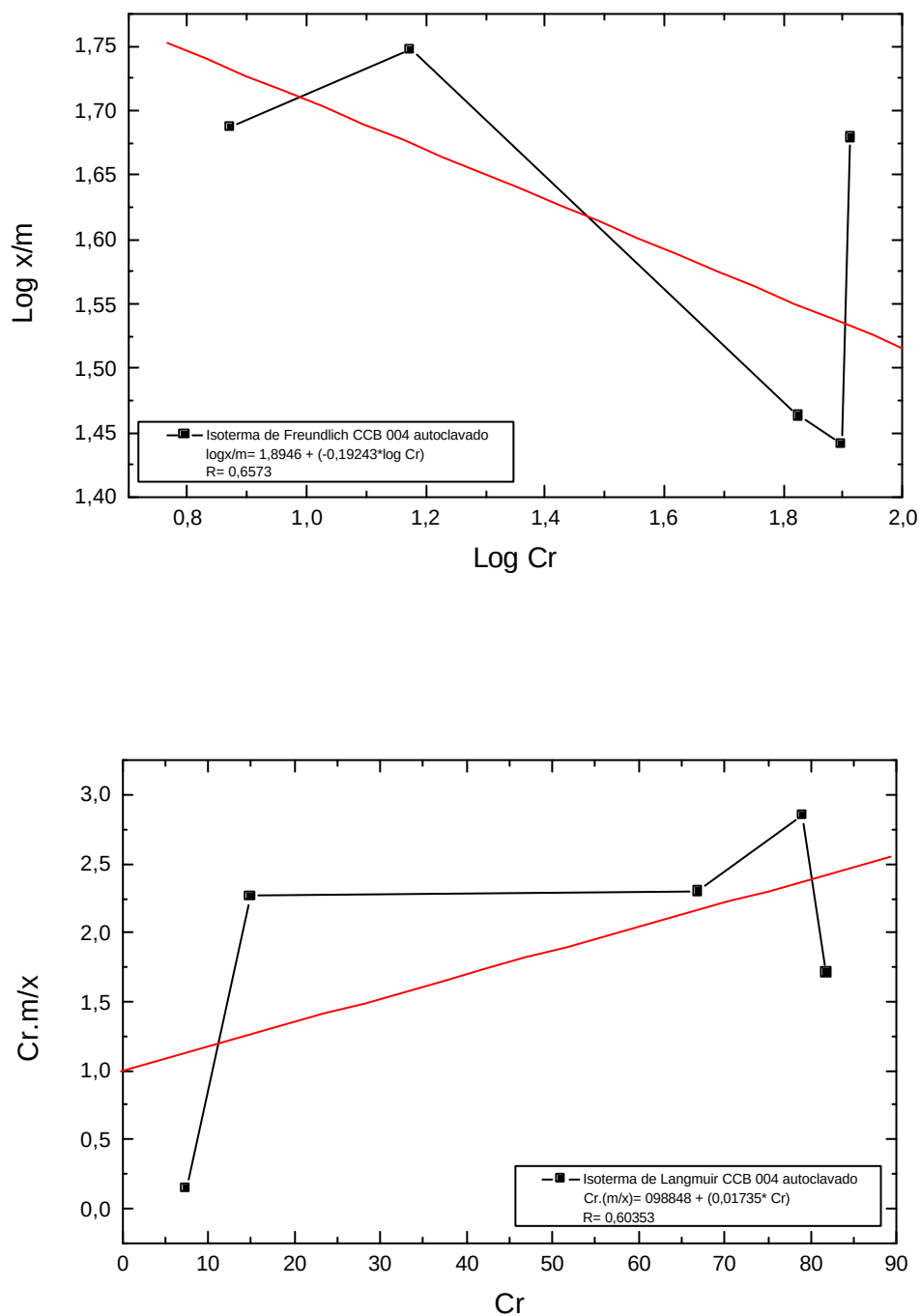


Figura 20: Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de *Pleurotus ostreatus*, CCB 004 autoclavado realizado através das isothermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50 e temperatura de 30°C. Concentração inicial do corante: 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,38 e 1,9 mg/mL e tempo de contato 120 minutos

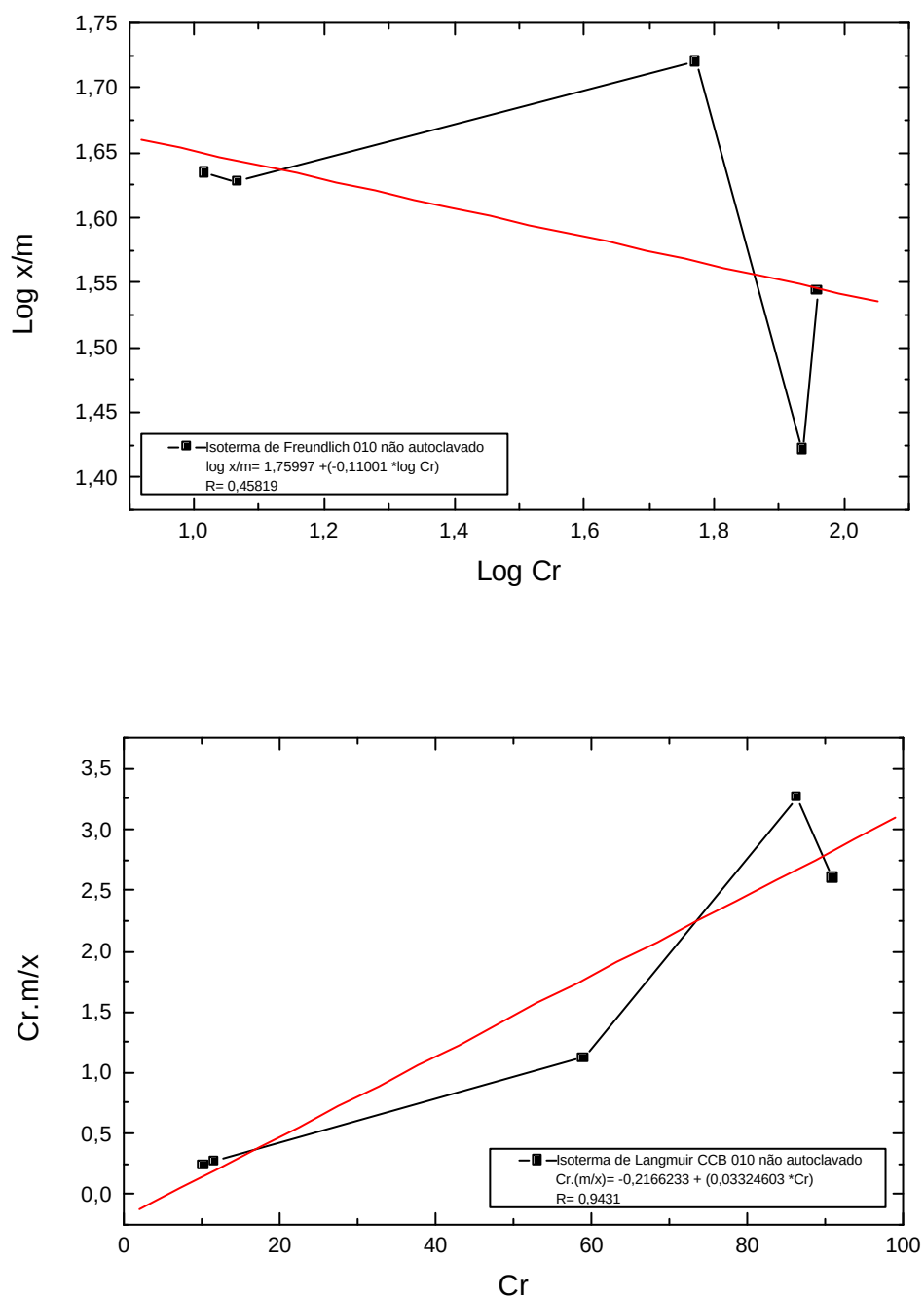


Figura 21: Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de *Pleurotus ostreatus*, CCB 010 não autoclavado realizado através das isothermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50 e temperatura de 30°C. Concentração inicial do corante: 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,26 e 2,08 mg/mL e tempo de contato 120 minutos

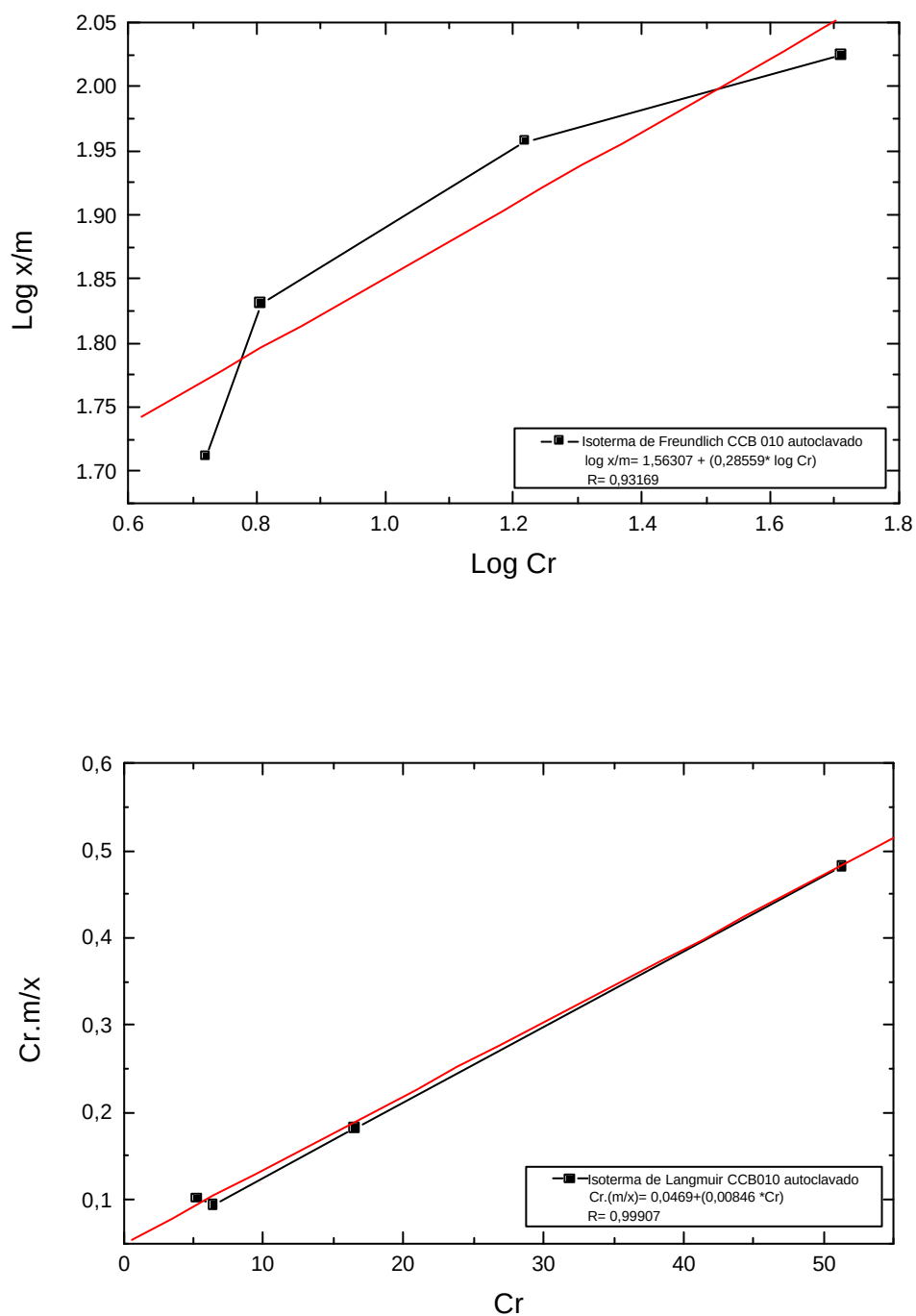


Figura 22: Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de *Pleurotus ostreatus*, CCB 010 autoclavado realizado através das isothermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50 e temperatura de 30°C. Concentração inicial do corante: 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,46 e 1,84mg/mL e tempo de contato 120 minutos

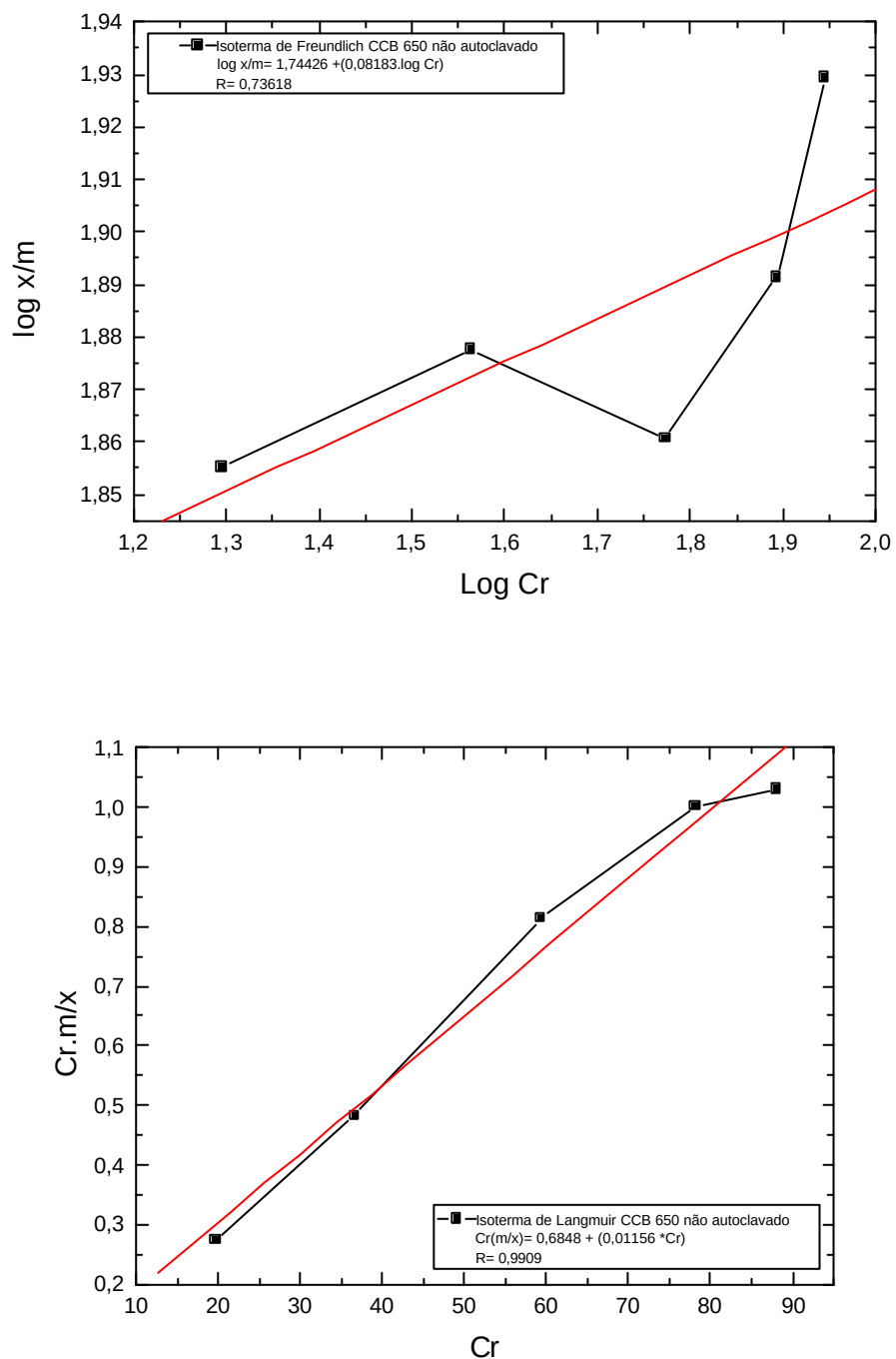


Figura 23: Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de *Pleurotus ostreatus*, CCB 650 não autoclavado realizado através das isothermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,50 e temperatura de 30°C. Concentração inicial do corante: 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,14 e 1,12 mg/mL e tempo de contato 120 minutos

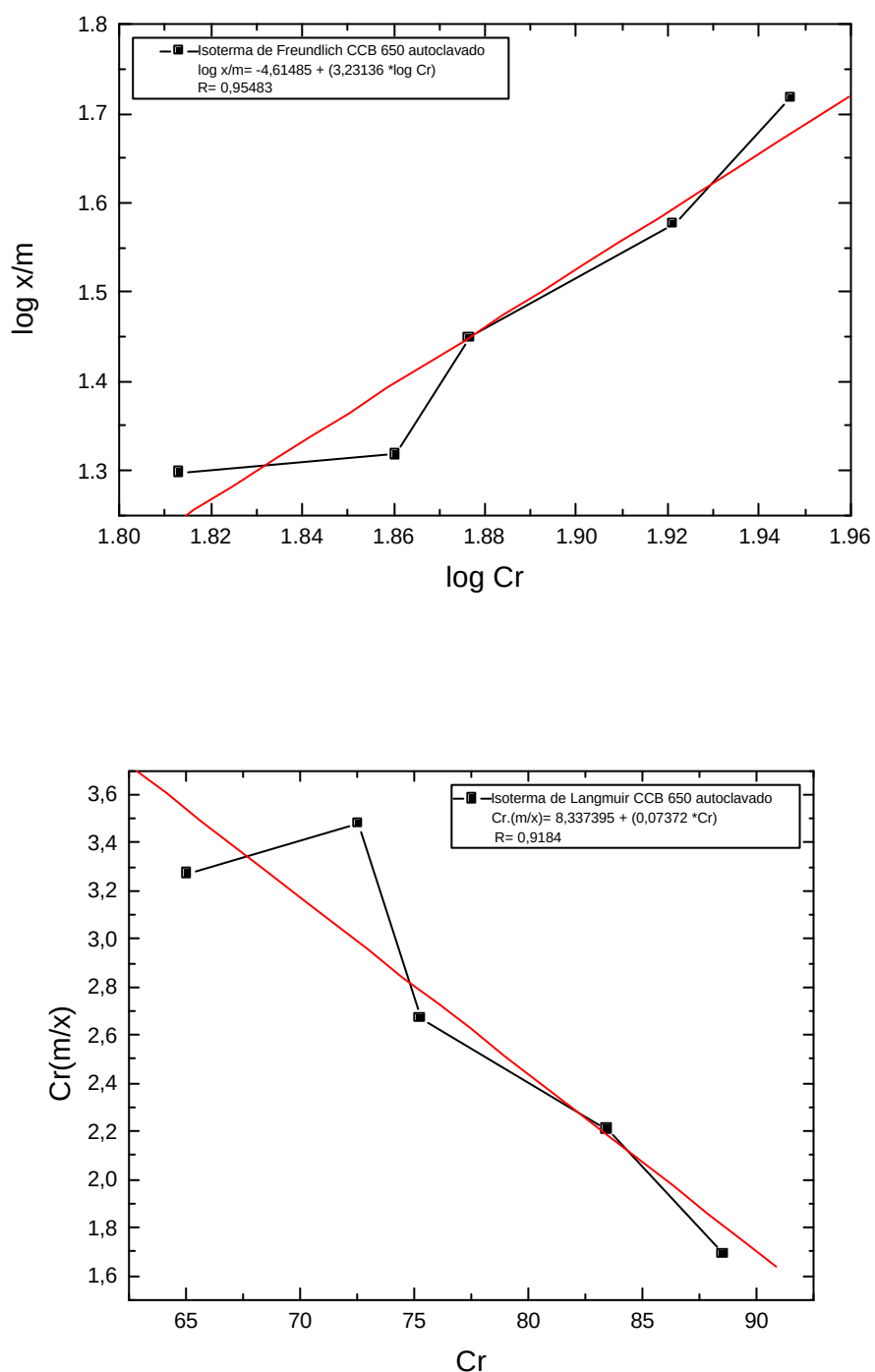


Figura 24: Estudo da biosorção do corante Procion Blue MXG por biomassa “pelletizada” de *Pleurotus ostreatus*, CCB 650 autoclavado realizado através das isothermas de Freundlich e de Langmuir no pH 2,5 e temperatura de 30°C. Concentração inicial do corante: 100µg/mL, concentração de biomassa variando entre 0,22 e 1,76 mg/mL e tempo de contato 120 minutos

4.8. – Demonstrativo de Coeficiente de Correlação obtidos pela utilização das equações de Freundlich e Langmuir na interação do corante Procion Blue MXG e diversas linhagens de *Pleurotus ostreatus* no pH 2,50

(Tabela 2)

Tabela 2: Demonstrativo dos coeficientes de correlação obtidos pela utilização das equações isotermas de Freundlich e Langmuir na interação do corante Procion Blue MXG (concentração inicial de 100µg/mL) e as linhagens CCB 004, CCB 010 e CCB 650 de *Pleurotus ostreatus* (pH 2,50, temperatura 30° C)

<i>Pleurotus ostreatus</i>	Freundlich		Langmuir	
Linhagens	Não Autoclavado	Autoclavado	Não Autoclavado	Autoclavado
CCB 004	0,3144	0,6573 *	0,5530 *	0,6035
CCB 010	0,4582	0,9317	0,9431 *	0,9991 *
CCB 650	0,7362	0,9548 *	0,9909 *	0,9184

Obs: (*) melhor coeficiente de correlação quando comparadas as linhagens, não autoclavadas e autoclavadas

4.9. – Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 de *Pleurotus ostreatus* não autoclavado e autoclavado durante 100 horas em diferentes valores de pH(Figuras 25, 26 e 27)

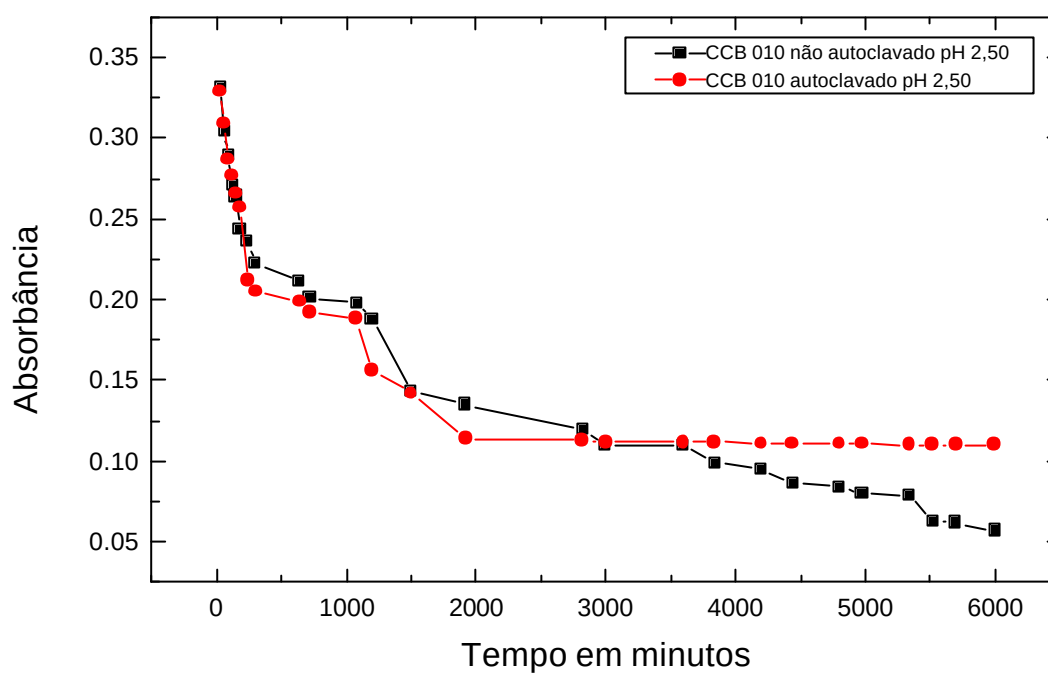


Figura 25: Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 não autoclavado (concentração 0,12 mg/mL) e autoclavado (concentração 0,17mg/mL), com corante azóico Procion Blue MXG, concentração inicial 100µg/mL. Incubação em todo o experimento a 30° C., pH 2,50
Leituras feitas de 30 em 30 minutos durante as primeiras 5 horas.

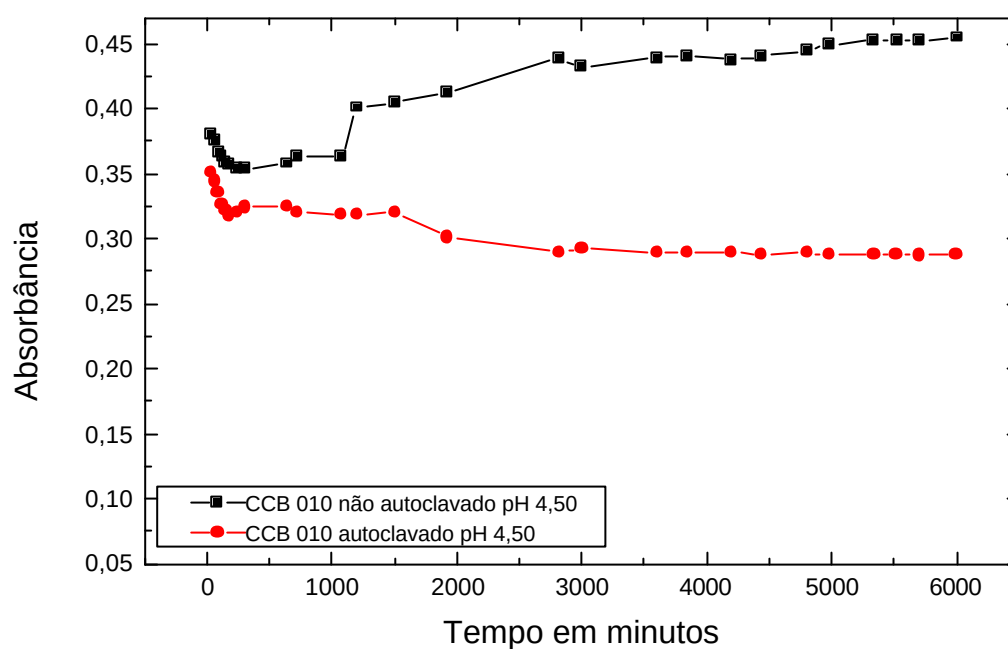


Figura 26: Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 não autoclavado (concentração 0,12 mg/mL) e autoclavado (concentração 0,17mg/mL), com corante azóico Procion Blue MXG, concentração inicial 100µg/mL. Incubação em todo o experimento a 30° C, pH 4,50
Leituras feitas de 30 em 30 minutos durante as primeiras 5 horas.

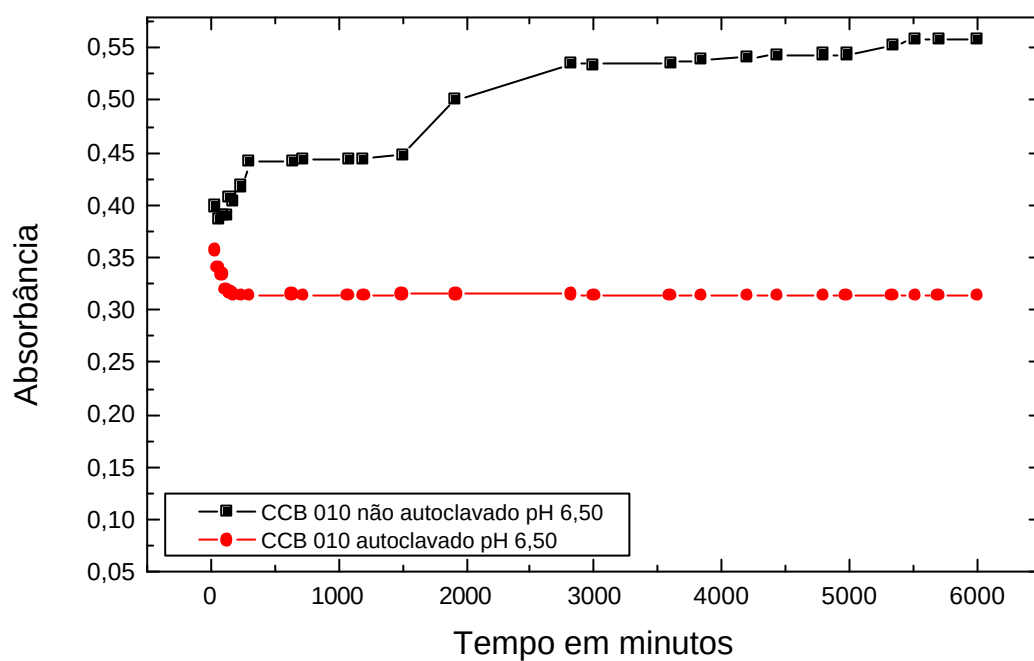


Figura 27: Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 não autoclavado (concentração 0,12 mg/mL) e autoclavado (concentração 0,17mg/mL), com corante azóico Procion Blue MXG, concentração inicial 100µg/mL. Incubação em todo o experimento a 30° C, pH 6,50.

Leituras feitas de 30 em 30 minutos durante as primeiras 5 horas.

5. - DISCUSSÃO

5.1. – Obtenção da forma paramorfogênica de *Pleurotus ostreatus*

Segundo Corso (1998), no estudo dos efeitos da remoção de corantes em solução aquosa, utilizando fungos filamentosos, o maior problema é a subdivisão da biomassa em partes homogêneas e confiáveis, o qual é extremamente dificultada, pelo crescimento enovelado das hifas fúngicas. Após o surgimento da possibilidade de se promover o crescimento da biomassa em forma de “pellets” com o diâmetro quimicamente controlado (TATUM et al., 1949), foi possível trabalhar com *Neurospora crassa* em ensaios matemáticos sobre a remoção destes corantes (CORSO et al., 1987a). Entretanto, em outros fungos como o do gênero *Aspergillus*, o tratamento químico não demonstrou o efeito desejado. A obtenção de biomassa modificada só foi possível a partir do momento em que Marcanti (1988) conseguiu a formação de pellets através de indução física, que foi utilizada inicialmente com *Aspergillus niger*, com grande sucesso. O processo até então utilizado para este fungo era de germinação de esporos, o qual apresentava o inconveniente de formar “pellets” de diâmetros

diferentes, devido ao crescimento irregular proporcionado pela latência de cada esporo durante a germinação.

Para este trabalho, houve a necessidade de se adicionar o aparelho Blender Mixing à técnica de indução física. As hifas do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* eram mais difíceis de se partir. Por isso, o uso do blender. Os “pellets” obtidos após incubação em meio líquido eram homogêneos, regulares, de fácil manipulação com as pipetas apropriadas, padronizando-se assim os volumes e as diferentes concentrações.

Na figura 1, pode-se observar a forma original do *Pleurotus ostreatus*, um basidiomiceto ligninolítico e comestível, de grande importância comercial; e o crescimento de suas hifas em placa de petri. Neste estudo foram utilizadas 3 linhagens de *Pleurotus ostreatus*, geneticamente iguais, mas de procedências diferentes (CCB 004 de São Paulo, CCB 010 do México e CCB 650 da China). Na figura 2, observa-se sua homogeneidade após indução física à paramorfogênese.

5.2. – Corante Utilizado

5.2.1. Corantes Reativos

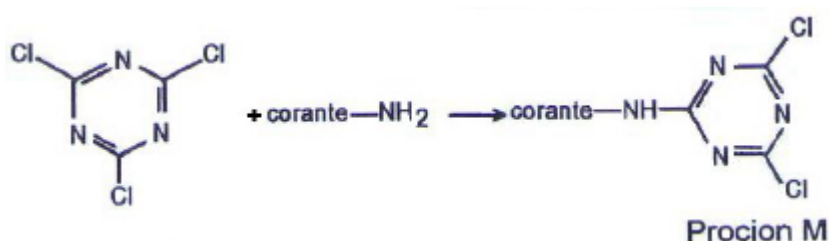
Os corantes reativos são compostos coloridos capazes de formarem ligações covalentes entre as moléculas de corantes e as fibras. Rys e Zollinger (1975), definem estas ligações covalentes como sendo formadas entre um átomo de carbono da molécula do corante e um oxigênio, nitrogênio ou átomo de enxofre de uma amina ou um grupo mercaptana do substrato. Os corantes reativos para fibras, têm sido comercialmente desenvolvidos para lã e fibras sintéticas de poliamida, mas, indiscutivelmente sua aplicação de maior sucesso têm sido o algodão e suas misturas têxteis.

Os corantes da linha Procion, de um modo geral, foram sintetizados por químicos das indústrias têxteis, mais especificamente da Indústria Burlington

associada à I.C.I. Imperial Chemistry Industries, as quais mantém por longos períodos a não divulgação de suas fórmulas estruturais, protegidas sob patentes, entretanto, com referência ao corante reativo utilizado neste trabalho, podemos informar segundo Waring (1994):

O grau de reatividade deste tipo de corante depende do chamado sistema reativo, onde, os corantes são formados pela reação de um amino grupo cromógeno, ou, de um corante-básico com cloreto cianúrico em condições moderadamente ácidas. O caráter eletronegativo do anel contendo átomos de nitrogênio e, as possíveis substituições dos átomos de cloro induzem à um aumento de carga positiva, no anel carbônico, os quais são agora susceptíveis ao ataque nucleofílico por moléculas contendo grupos amino.

A formação dos corantes faz-se em várias etapas, de acordo com a reação:



Os corantes assim produzidos são formados essencialmente de duas partes, uma cromogênica e a outra formando o sistema reativo, sendo importante que, em muitos corantes, a parte cromogênica é igual e o sistema reativo é diferente. Entretanto, temos também a montagem estrutural dos corantes com o mesmo sistema reativo e diferentes agrupamentos cromóforos, dando origem aos produtos que, comercialmente, são conhecidos como Procion H e Procion HE.

Na figura 3(a), observa-se um rio sendo contaminado por efluente colorido, proveniente de corantes de indústria têxtil, e em 3(b), compara-se a ação do fungo estudado na descoloração do corante Procion Blue MXG.

5.3. – Obtenção dos espectros de absorção do corante

A análise espectrofotométrica realizada (figura 4), nos indica que o corante Procion Blue MGX pode ser considerado como um corante instável, frente às variações de pH, isto é, ele apresenta diferenças significativas nos espectros das amostras submetidas a diferentes valores de pH.

Apesar de apresentar um comprimento de onda máximo em torno de 670 nm, podemos verificar que, em cada pH, se obtém um valor de absorbância diferente (figuras 4, 5, 6 e 7).

Contudo, podemos também verificar que este corante apresenta um ponto isoabsortivo (ponto isobéstico), no qual os três valores de pH testados apresentam a mesma absorbância que é de 375,4 nm e que foi utilizado como ponto de referência para as determinações quantitativas deste corante.

Podemos observar também que as retas feitas em cada pH, neste comprimento de onda apresentam valores experimentais, no que diz respeito à sua inclinação, muito próximas (figuras 5, 6 e 7).

5.4. – Testes de biosortividade dos corantes em diferentes valores de pH

Os testes de biosorção em diferentes valores de pH com o corante Procion Blue MXG, na concentração inicial de 100µg/mL e a forma paramorfogênica de *Pleurotus ostreatus* não autoclavada e autoclavada, indicaram que o meio mais ácido é o que melhor consegue remover este corante em solução aquosa e que os “pellets”autoclavados são melhores substratos do que a biomassa fúngica viva (figuras 8 a 16 e Tabela 1). A interação biosortiva (fungo X corante) nesta concentração inicial de corante indica uma boa correlação linear, a qual variou de 0,8523 a 0,9991, mesmo em valores de pH menos biosortivos. Através desta técnica foi também possível estabelecer uma estimativa de remoção total do corante em cada caso estudado e que figuram na Tabela 1.

Quanto ao fato de as formas “pelletizadas” autoclavadas apresentarem melhores mecanismos de remoção no prazo de 120 minutos, segundo Corso

(1998), a presença do corante em solução agiria para as células fúngicas como se fossem um “corpo estranho”, e que necessita portanto ser removido, através de sistemas enzimáticos, os quais dificultariam os sítios adsortivos a receberem as moléculas de corante, como os estabelecidos por Sharf (1978), com o corante eritrosina. A partir do momento em que ocorre a autoclavagem, cessam estes sistemas enzimáticos e as células se tornam um substrato mais propício à aproximação de moléculas “estranhas”.

Com estes resultados podemos verificar que, ainda que, ao se trabalhar com diferentes linhagens de *Pleurotus ostreatus*, elas se comportam de maneira bastante diferente do ponto de vista adsortivo, visto que, a linhagem CCB 004 foi a que teve maior dificuldade de remoção e a linhagem CCB 010 a que teve o melhor comportamento, tanto nas amostras não autoclavadas como autoclavadas, seguida da linhagem CCB 650, que também apresentou um comportamento razoável nos testes não autoclavados.

Um outro fato que nos chama a atenção foi o fato da absorbância ter aumentado nas menores concentrações de biomassa nas amostras de pH mais elevado, principalmente nas não autoclavadas (figuras 10, 12 e 13). Isto também se verificou na figura 16 autoclavada.

Isto provavelmente se deve ao fato que, com pH mais elevado haja a alteração na porosidade da parede celular, tornando mais densa a solução aquosa.

5.5. – Estudo da interação biosortiva através de varreduras espectrais entre *Pleurotus ostreatus* paramorfogênico e o corante Procion Blue MXG

A fim de tentarmos entender o comportamento biosortivo apresentado pelas diferentes linhagens, realizamos varreduras espectrais, tanto para o experimento não autoclavado como para o autoclavado.

Conforme podemos observar pelas figuras 17 e 18 cada linhagem apresentou um comportamento distinto.

Na figura 17 podemos verificar que a linhagem CCB 004 que se encontrava em maior concentração em mg/mL praticamente acompanha as características espectrais do controle. Quanto às linhagens CCB 010 e CCB 650, cujas concentrações são aproximadamente equivalentes, verificamos que ocorre uma remoção bastante razoável para ambas.

Contudo, em ambos os casos, após os 120 minutos já mostram alterações estruturais significativas nas faixas do violeta e ultra-violeta, onde praticamente desaparece o pico em 340 nm, indicando dois acontecimentos: uma biosorção e uma possível biodegradação para estas duas linhagens.

Quando comparamos com os testes autoclavados (figura 18), notamos uma inversão na remoção do corante entre as linhagens CCB 010 e CCB 650. Contudo, na região de 340 nm, verificamos que o corante que saiu destas linhagens ainda mostra uma tendência de pico neste comprimento de onda após a biosorção. Isto se deve, provavelmente pelo fato de que, com as hifas vivas, o tempo de 120 minutos para estas linhagens já foi suficiente para aproveitamento do corante como fonte de carbono, pois com as amostras autoclavadas estas alterações espectrais não aconteceram.

5.6. – Estudo das isotermas de adsorção

A aplicação das equações isotermas de Freundlich e Langmuir para o sistema “biomassa de *Pleurotus ostreatus*-corante”, no melhor pH biosortivo (2,50), revela em linhas gerais que a equação de Langmuir foi a mais favorável (melhores coeficientes de regressão) em quase todas as situações estudadas, mesmo para os menos biosortivos (figuras 19, 21, 22 e 23), sendo que a equação de Freundlich se mostrou mais favorável apenas nas figuras 20 e 24.

Neste teste foram utilizados parâmetros semelhantes aos demais ensaios realizados, qual seja uma quantidade crescente de biomassa e uma concentração igual de corante.

Conforme indica a tabela 2, podemos resumir que a equação de Langmuir se adapta completamente às três linhagens com hifas vivas e a de Freundlich se adapta apenas às linhagens 004 e 650 autoclavadas. Estes dados sugerem que, apesar de pertencerem à mesma espécie, verificamos que o mecanismo de biosorção acontece de modos diferentes nas três linhagens, devido às características estruturais das paredes dos “pellets” e à possível produção de polissacarídeos extracelulares que permitem o aumento de aderência e afinidade pelo corante.

5.7. – Teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 de *Pleurotus ostreatus* e o corante Procion Blue MXG, em diferentes valores de pH

Com a finalidade de acompanharmos os mecanismos adsorptivos após 120 minutos escolhemos a linhagem CCB 010 para realizarmos este teste cinético nos 3 valores de pH estudados.

Podemos observar que no período inicial de contato, as amostras autoclavadas removeram o corante do meio aquoso com mais intensidade.

Quando foi testado o pH 2,50 (figura 25), verificou-se que após 48 horas (2880 minutos), a amostra não autoclavada promoveu uma remoção mais efetiva do que a autoclavada, que se manteve constante até o final do experimento.

Para os valores de pH 4,50 e 6,50 (figuras 26 e 27), os “pellets” autoclavados removeram melhor desde o início e continuaram estabilizados até o final do experimento. Quanto às amostras não autoclavadas, após 1500 minutos mostraram acréscimo na absorbância, indicando provavelmente a alteração osmótica com liberação de substâncias para fora da célula.

No caso do pH 2,50, ao que tudo indica, este pH favorece a indução de atividade enzimática e da adaptação do corante como fonte de carbono para esta linhagem, como vemos também em Boyle et al (1992), que afirma que o *Pleurotus spp* aumenta sua atividade enzimática em valores de pH inferiores a 3.

De um modo geral em cada situação experimental discutida no presente trabalho, se demonstra a habilidade das hifas “pelletizadas” de *Pleurotus ostreatus* de remover substâncias coloridas que são normalmente encontradas em efluentes industriais, além de nos permitir chegarmos no limite na análise da dualidade biosorção-biodegradação destes compostos coloridos presentes em nossas águas.

6 - CONCLUSÕES

A técnica de paramorfogênese física com a utilização do Blender mostrou-se adequada para a produção de pellets das diferentes linhagens do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*.

O corante reativo Procion Blue MXG se mostrou em termos de absorbância espectral “pH instável” quando analisados nos valores de pH 2,50; 4,50 e 6,50, e mostrou um ponto isobéstico no comprimento de onda 375,4 nm.

No estudo da interação biosortiva entre *Pleurotus ostreatus* não autoclavado e autoclavado e o corante Procion Blue MXG, verificou-se que, para um período de 120 minutos, a biomassa autoclavada apresenta maior capacidade de remoção dos corantes, sendo superior à biomassa viva, em quase todos os valores de pH analisados, com exceção apenas da linhagem CCB 650.

O pH que apresentou melhor potencial na remoção do corante em todas as linhagens analisadas foi o pH 2,50, tanto para as biomassas não autoclavadas como autoclavadas de *Pleurotus ostreatus*.

A comparação entre os coeficientes de correlação das Isotermas de Adsorção de Freundlich e Langmuir, na temperatura de 30° C e tempo de incubação de 120 minutos, em pH 2,50, indicam que a equação de Langmuir explica melhor a interação entre a biomassa fúngica das linhagens CCB 004, 010 e 650 não autoclavadas e da linhagem CCB 010 autoclavada, admitindo-se tratar de processo biosortivo em monocamadas para estes tipos de substratos.

Para as linhagens CCB 004 e CCB 650 autoclavadas, os dados indicam que, no processo de autoclavagem ocorreram alterações nas tendências de atrações moleculares, dando como efetiva a equação de Freundlich, admitindo-se tratar de um processo biosortivo de múltiplas camadas de moléculas de corante sobre o substrato.

O estudo da interação biosortiva através das varreduras espectrais entre o *Pleurotus ostreatus* paramorfogênico não autoclavado nas linhagens CCB 004, CCB 010 e CCB 650 em contato com o corante Procion Blue MXG revelam que as linhagens CCB 010 e CCB 650 apresentam modificações espectrais na região de 340 nm, indicando que ocorreu possivelmente alguma ação enzimática para a utilização da molécula de corante como fonte de carbono. Tal fato não ocorre com a linhagem CCB 004, que mantém uma região de pico em 340 nm.

Para as amostras autoclavadas, todas as linhagens mantiveram a tendência de pico em 340 nm, mesmo as mais biosortivas.

O teste cinético realizado com a linhagem CCB 010 de *Pleurotus ostreatus* não autoclavado e autoclavado durante 100 horas no valor de pH 2,50, revelou que, a ação enzimática de biodegradação para com o corante Procion Blue MXG ocorre aproximadamente a partir de 2800 a 3000 minutos (+ou- 48 horas) quando a remoção de corante por biomassa viva ultrapassa a autoclavada que já se encontra completamente estabilizada neste espaço de tempo.

Para os valores de pH 4,50 e 6,50, tal fato não ocorre, indicando que as enzimas biodegradativas para o corante têm uma ação mais efetiva em valor de pH mais ácido.

Pelos dados apresentados no presente trabalho, podemos afirmar que do ponto de vista de biosorção, as biomassas tanto autoclavadas como não autoclavadas destas linhagens de *Pleurotus ostreatus* oferecem condições de virem a ser utilizadas como substrato biosorvente no tratamento de efluentes industriais que contenham estes azo compostos.

E novos estudos deverão ser dirigidos, em relação aos processos de biodegradação, para se verificar a possibilidade de sua aplicação em sistemas de tratamento de efluentes.

7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS; C. W.; BLACKWILL, M. **Introductory Micology** 4.ed. New York: John Willy & Sons INC., 1996, 856p.

ATKINS, P. W. **Physical Chemistry**. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 1991, 541p.

BABICH, H.; STOTZKY, G. A microbial assay for determining the influence of physicochemical environmental factors of the toxicity of organics: Phenol. **Archives Environmental .Contamination. Toxicology**. New York: Springer-Verlage Inc., 1985, n.14, p. 409-415.

BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial Decolorization of Textile-Dye-Containing Effluents: a Review. **Bioresource Technology**. England, 1996, n. 58, p. 217-227.

BANKS, C. J.; PARKINSON, M. E. The mechanism and application of fungal biosorption to colour removal from raw waters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. New Jersey, 1992, v. 54, n.2, p. 192-196.

BONONI, V. L. R.; CAPELARI., M.; MAZIERO, R.;TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de Cogumelos Comestíveis**. São Paulo: Ed. Ícone, 1995, .p.27-41.

BONONI, V.L.R. Biodegradação de Organoclorados no Solo Por Basidiomicetos Lignocelulíticos. In: **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna. EMBRAPA – CNPMA, 1997, 440p.

BONONI, V.L.R. et al. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções Básicas de Taxonomia e Aplicações Biotecnológicas**. Instituto de Botânica. Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 1998, 184p.

BOYLE, C.D; KROPP, B.R.; REID, I.D. Solubilization and Mineralization of Lignin by White Rot Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**. New York, 1992, v.58, n.10, p.3217-3224.

CASTELAN, G.W. **Physical Chemistry** . New York: Addison-Wesley Publishing Company, 1964,.717p.

CHIVUKULA, M.; RENGANATHAN, V. Phenolic Azo Dye Oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**. New York, 1995, v.61, n.12, p. 4374-4377.

CORSO, C.R. Aplicabilidade das equações de Freundlich e Langmuir e o estudo da toxicidade, na interação biosortiva entre *Aspergillus oryzae* paramorfogênico e corantes azóicos em solução aquosa. **Tese (Livre-Docência em Biofísica)**. Rio Claro, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 1998, 115 p.

CORSO, C.R. et al. Interaction between the diazo dye Vermelho Reanil P8B and *Neurospora crassa* strain 74 A. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. Heidelberg. 1981, v.13, p. 64-66.

CORSO, C.R.; MARCANTI, I.; YAMAOKA, E.M.T. Applicability of the equations of Freundlich and Langmuir to the adsorption of the azo dye Procion Scarlet on paramorphic colonies of *Neurospora crassa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. São Paulo, v. 20, p.623-626, 1987a

CORSO, C.R.; MARCANTI, I.; YAMAOKA, E.M.T. Investigation on the adsorption equilibria of ICI reactive azo dye Procion Blue MXG from aqueous solutions on colonial paramorphs of *Neurospora crassa* strain 74 A. Salvador. In: **2nd International Environmental. Chemistry Congress in Brazil**. Salvador, p.110-111, 1987b.

CHUN, H.; YIZHONG, W. Decolorization and biodegradability of Photocatalytic Treated Azo Dyes And Wool Textile Wastewater. **Chemosphere**. Amsterdam, 1999, v.39, n.12, p.2107-2115.

CHUNG, K.T.; FULK G.F.; EGAN, M. Reduction of Azo Dyes by Intestinal Anaerobes. **Applied Environmental Microbiology**. New York, 1978, v.35, n.3, p.558-562.

DIETRICH, D.; HICKEY, W.J.; LORMAR, R. Degradation of 4,4' Dichlorobiphenil, 3,3', 4,4' Tetrachlorobiphenil, and 2,2', 4,4', 5,5' Hexachlorobiphenil by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**. New York, 1995, v.61, n.11, p.3904-3909

DURÁN, N., ESPOSITO, E. Biodegradação de Lignina e Tratamento de Efluentes por Fungos Ligninolíticos. Jaguariúna. In: **Microbiologia Ambiental**, EMBRAPA- CNPMA. Jaguariúna, 1997, 269-292p.

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

EL-SHAFEI, H.A Influence of L-Sorbose and the Cell-Wall-Lytic *Micrococcus spp* on the Major Polymers of *Aspergillus fumigatus*. **Polymer Degradation and Stabilitiy**. Nothern Ireland,1997, v.57, p.151-156

FIELD, J.A .; DE JONG, E.; FEIJOO-COSTA, G.; DE BONT, J.A .M.. Screening for Ligninolytic Fungi Aplicable to the Biodegradation of Xenobiotics. **Tibtech**. Canada, 1993, v.11.

GLENN, J.K. ; GOLD, M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied. and Environmental Microbiology**. New York, 1983, v.45 .n. 6, p.1741-1747

GRAU, P. Textile Industry Wastewaters Treatment. **Water Science Tech.** England, 1991, v.24,n. 01, p. 97-103

GREGORY, P. Azo dyes: Structure Carcinogenicity Relationships. **Dyes and Pigments**. England: Elsevier Applied Science Publishers Ltda., 1986, n.7, p.45-56

GUARANTINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes Têxteis. **Química Nova**. São Paulo, 2000, v.23, n.01, p. 71-78.

GULYAS, H. Processes for the Removal of Recalcitrant Organics from Industrial Wastewaters. **Water Science Tech.** England, 1997, v.36, n.2-3, p.9-16

GUGLIOTTA, A.M.; CAPELARI, M. Taxonomia de Basidiomicetos. In; **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções Básicas de Taxonomia e Aplicações Biotecnológicas**. Instituto de Botânica. Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 1998, p. 84-91.

KIRBY, N.; MC-MULLAN, G.; MARCHANT, R. Decolourisation of an Artificial Textile Effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Letters**. New York, Chapman and Hall, 1995, v.17, n.7, p.761-764

KIRK-OTHMER. Encyclopedia of Chemical Technology. New York: John Wiley & Sons, 3rd.ed. Wiley-Inter Science, vol. 8, in: '**Dyes, natural**', 1979, p.363-368, e "**Dyes and Dyes intermediates**",1979, p.159-161, 169, 172.

LI, X. Z.; ZHAO, Y. G. Advanced Treatment of Dyeing Wastewater for Reuse. **Water Science Tech.** England, 1999, v. 39, n.10-11, p.249-255

MARCANTI , I. Aplicabilidade das isothermas de Freundlich e Langmuir na interação adsorbtiva entre *Aspergillus niger* IZ 9 paramorfogênico e corantes azóicos básicos, ácidos, diretos e reativos: influência do pH e Temperatura. 1988. 98p. **Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)**. Instituto de Biociências. UNESP. Rio Claro, 1988.

MARCANTI-CONTATO, I. Emprego de *Aspergillus niger* paramorfogênico para avaliação do grau de interferência dos aditivos químicos na Biosorção de corantes têxteis de efluentes industriais. 1995. 173p. **Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)**. Instituto de Biociências. UNESP. Rio Claro, 1995.

MARCANTI CONTATO, I.; CORSO, C.R.; OLIVEIRA , J. E. Indução de paramorfogênese física em *Aspergillus Niger* IZ-9. In: XIV Congresso Brasileiro de Microbiologia. Viçosa,MG. **Resumos...** Viçosa,MG., 1987, p.30

MARCANTI CONTATO, I.; CORSO, C.R.; OLIVEIRA, J.E., Induction of Physical Paramorphogenesis in *Aspergillus* sp. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, 1997, v.28, 65-67

MARCANTI-CONTATO, I.; CORSO, C.R. Studies of adsorptive interaction between *Aspergillus niger* and the reactive azo dye Procion Blue MXG. **Eclética Química**. São Paulo, 1996 (a), v. 21, p.97-102.

MARCANTI CONTATO, I.; CORSO, C.R. Adsorção de corantes azóicos básicos por culturas paramórficas de *Aspergillus niger*. In: III Congresso de Ecologia do Brasil. Brasília, **Resumos...** Brasília, 1996(b), p.287

MATHEUS, D.R.; OKINO, L.K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções Básicas de Taxonomia e Aplicações Biotecnológicas**. Instituto de Botânica. Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 1998, p.107-139.

MC KAY, G.; OTTERBURN, M.M.; SWEENEY, A .G. The Removal of colour from effluent using various adsorbents: some preliminary economic consideration. **Journal of Soc. Dyes Colourists**. 1978, v.94, n.4, p.357-360.

MORI, Y.; HORI, T.; TOYOSHI, K., HORIE, M. Carcinogenic azo dyes: IX - Detection of new metabolites of 3'-methyl-4-(dimethylamino) azobenzene in rat bile. **J.Pharm.Dyn**. 1978, v.1, p.192-201

MOKRZYCKA, B.; PRZYBINSKI, J. Determination of the suitability of some polish active carbons for adsorption of selected dyes. **Tech. Work.**1991, n.6, p.158-163

MOORE, W.J. **Físico-Química**, Ao livro Técnico e Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1968. p.1001

MURALEEDHARAN, T.R.; IYENGAR, L.; VENKOBACHAR, C. Screening of Tropical Wood-Rotting Mushrooms for Copper Biosorption, **Applied and Environmental Microbiology**. New York, 1995, v.61., n.9, p.3507-3508

NIGAM, P.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial Process for the Decolorization of Textile Effluent containing Azo, Diazo, and Reactive Dyes. **Process Biochemistry**. 1996, v.31, n.5, p.435-442

OLIVEIRA, J.E.; ANGELIS, D.F.; CORSO, C.R.; KYIAN, C. Investigation on the adsorption equilibria of the acid azo dye Amaranth (C.I. 16.185) from aqueous solutions on *Saccharomyces uvarum* IZ 1904 cells. **Naturalia**. São Paulo, 1983, v.8, p.211-217

PODGORNIK, H.; GRIGIÉ, I.; PERDIH, A . Decolorization Rate of Dyes Using Lignin Peroxidases of *Phanerochaete Chrysosporium*, **Chemosphere**. Amsterdam, 1999, v.38., n.6, p.1353-1359

RAFII, F.; HALL, J.D.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of Azo Dyes used in Foods, Drugs and Cosmetics before and after Reduction by *Clostridium species* from the Human Intestinal Tract. **Food and Chemical Toxicology**, 1997, v.35, p.897-901

RICHARDSON, M.L. Dyes - the aquatic environment and the mess made by metabolites. **ISDC**, 1983, v.99, p.198-200

RYS, P. and ZOLLINGER, H. Reactive dye-fibre systems in **The Theory of Coloration of Textiles** The Dyer Company Publication Trust 1975

ROTT, U.; MINKE, R. Overview of Wastewater Treatment and Recycling in the Textile Processing Industry, **Water Science Tech.** England. Tech, 1999, v.40, n.1, p.137-144

ROYER, G.; DESROCHERS, M.; JURASEK, L.; ROULEAU, D.; MAYER, R.C. Batch and Continuous Decolorisation of Bleached Kraft Effluents by a White-Rot Fungus **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**.1985, v.35B, p.14-22.

SERRES, F.J.; KOLMARK, H.G.; BROCKMAN, H.E. Factors influencing the survival of *Neurospora crassa* conidia in sorbose-sucrose media. **Nature**. London, 1962, v.10, p.556-557.

SHARF, J.M. **Métodos recomendados para o exame de alimentos**. Ed. Polígono. São Paulo, 1978, p.257

SHAUL, G.M. et al. Activated Sludge with Powdered Activated Carbon Treatment of a dye and pigments processing wastewater. In: **38 the Proc.Ind. Waste Conf.** Indiana, 1983, p.659-671

SHAUL, G.M.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A . Removal of azo dyes by the activated sludge process. In: **40th annual Purdue Industrial Waste Conference.** Indiana, 1985, p.1-17

SHAUL, G.M. et al. Treatability of water soluble azo dyes by the activated sludge Process In: **Proceedings of the Industrial Waste Symposia,** WPFC. 1986, 315-332

SHIN, K.S.; OH, I.K.; KIM, C.J. Production and Purification of Remazol Brilliant Blue R Decolorizing Peroxidase from the Culture Filtrate of *Pleurotus ostreatus*, **Applied and Environmental Microbiology**, New York, 1997, v.63, n.5, p.1744-1748

SPADARO, J.T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York , 1992, v.58, n.8, p.2397-2401

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A . The evaluation of the white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**. New York, 1999, v.24, p.130-137

TATUM, E.L.; BARRAT, R.W.; CUTTER., V.M. Chemical Induction of Colonial Paramorphs in *Neurospora crassa* and *Syncephalastrum*. **Science**. Washington: Highwire, 1949, v.109, p.509-511

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**. Washington: Highwire, 1983, v.221, p.661-662

TÜNAY, O. et al. Color Removal From Textile Wastewaters. **Water Science. Tech**. England. 1996, v.34, n.11, p. 9-16

VYAS, B.R.M.; MOLITORIS, H.P. Involvement of an extracellular H₂O₂ – dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. **Applied and Environmental Microbiology**. New York, 1995, v.61, n.11, p.3919-3927

YETIS, U et al. Heavy Metal Biosorption by White-Rot Fungi. **Water Science Tech**. England, 1998, v.38, n.4-5, p.323-33

WANG, Y.; YU, J. Adsorption and degradation of Synthetic Dyes on the Mycelium of *Trametes versicolor*. **Water Science Tech**. England ,1998, v.38. n.4-5, p. 233-238.

WALKER, G. M.; WEATHERLEY, L.R. Biodegradation and Biosorption of Acid Anthraquinone Dye. **Environmental Pollution**. Oxford, 2000. v.108. p. 219-223

WALKER, R. The metabolism of azo compounds: a review of the literature. **Ed. Cosmet.Toxicol.** England, 1970.v. 8. p. 659-676

WARING, D.R. Dyes for cellulosic fibers.,p.49-106 in **The Chemistry and Application of Dyes**. 2nd ed. New York, Ed. Waring D.R. and Hallas G. 1994

WHEATLEY, A .D. Effluent treatment. **Chemistry and Industry Magazine:** England: Society of Chemical Industry,. 1982, v 7, p.512-518

ZOOLINGER, H. Color Chemistry: Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments. **VCH**. New York, 1987, p.197-198