

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS**

EVERTON PIZATO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE CORANTE TÊXTIL
PELO FUNGO *Lasiodiplodia theobromae* MMPI
EM EFLUENTE SINTÉTICO E INDUSTRIAL**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2013

EVERTON PIZATO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE CORANTE TÊXTIL
PELO FUNGO *Lasiodiplodia theobromae* MMPI
EM EFLUENTE SINTÉTICO E INDUSTRIAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de concentração: Química Biotecnológica.

Orientadora: Dr^a. Raquel Dalla Costa da Rocha

Co-orientador: Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

PATO BRANCO

2013

P895a Pizato, Everton.
Avaliação da capacidade de remoção de corante têxtil pelo fungo
Lasiodiplodia theobromae MMPI em efluente sintético e industrial / Everton
Pizato. – 2013.
101 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Dalla Costa da Rocha
Coorientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e
Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2013.
Bibliografia: f. 89 – 94.

1. *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. 2. Fungos. 3. Corantes. 4. Efluentes
têxteis. 5. Remoção de cor. I. Rocha, Raquel Dalla Costa da, orient. II.
Cunha, Mário Antônio Alves da, coorient. III. Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 6

Título da Dissertação

Avaliação da Capacidade de Remoção de Corante Têxtil pelo Fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em Efluente Sintético e Industrial

Autor

Everton Pizato

Esta dissertação foi apresentada às 8 horas e 30 minutos do dia 9 de setembro de 2013, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de Pesquisa Química Biotecnológica – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. O autor foi arguido pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof.^a Dra. Raquel Dalla Costa da Rocha – UTFPR
Orientadora

Prof. Dr. Marcio Barreto Rodrigues – UTFPR
Examinador

Prof.^a Dra. Daiane Cristina Lenhard – UTFPR
Examinadora

Visto da Coordenação

Prof.^a Dra. Cristiane Regina Budziak Fukamachi
Coordenadora Substituta do PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

Em especial,

Dedico este trabalho

Ao meu pai Adelmo

Pela educação, amor, carinho, força e coragem...

À minha mãe Eliége,

Minha maior incentivadora, sempre presente com suas orações...

Deus permitiu que você estivesse aqui ao meu lado presenciando esta conquista

Aos meus irmãos Ana Paula, Wellynton e Deyse Caroline

Ao meu sobrinho e afilhado João Vitor

*Ofereço a minha amada Magalí, pelo amor,
ajuda, paciência e companheirismo...*

*Sem você, tenho certeza que este caminho
teria sido mais difícil!*

AGRADECIMENTOS

- À Professora Dra. Raquel Dalla Costa da Rocha, por ter aceitado orientar-me, pela paciência e, sobretudo, pela autonomia que me proporcionou durante todas as etapas desta dissertação.
- Ao Professor Dr. Mário Antônio Alves da Cunha, pela orientação imprescindível, apoio e direcionamento.
- Ao Professor Vanderlei Aparecido de Lima, pelo auxílio fundamental nas análises estatísticas.
- A Coordenação Adjunta de Laboratório da UFFS, Câmpus Realeza-PR, na pessoa de Clóvis Caetano, pela prontidão em sempre atender ao meu “horário especial de estudante”, meus sinceros agradecimentos.
- Aos amigos e filósofos de “buteco”, Ana Paula Petrikoski, Camila Giongo, Danniella Xavier e Raphael C. Ivanov, obrigado pelo companheirismo, amizade e por toda choradeira compartilhada ao longo destes anos. Boa sorte a todos!
- Aos colegas de laboratório da UFFS, Adriano, Ana, Cereto, Cleomar, Edinéia, Edson, Emanuel, Lígia, Moacir, Orlando e Samuel, obrigado pelos momentos de descontração, trabalho e crescimento profissional que me proporcionaram.
- Aos colegas que trilharam outros caminhos, mas que continuam sempre presentes Roney, Sílvia, Jaqueline, Mariane e Jorge pela amizade e companheirismo.
- À colega Aline Chitto Lopes pelo auxílio prestado na realização dos ensaios de toxicidade.
- A todos os amigos que fiz ao longo dos anos nesta instituição e que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.
- A Deus.

*“[...] talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
Mas lutei para que o melhor fosse feito [...]
Não sou o que deveria ser,
Mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”
Marthin Luther King*

RESUMO

PIZATO, Everton. Avaliação da capacidade de remoção de corante têxtil pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em efluente sintético e industrial. 2013. 100 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013.

Os processos industriais de produção têxtil têm como característica o uso de grandes volumes de água durante as etapas de lavagem e tingimento de tecido, resultando em efluentes com enorme diversidade e complexidade química. A presença de corantes dissolvidos no efluente é bastante visível e problemática, considerando sua recalcitrância e cinética de degradação lenta. Neste trabalho, o fungo ascomiceto *L. theobromae* MMPI foi avaliado quanto à capacidade de remoção de cor do efluente sintético contendo corante azul reativo e de efluente industrial. Os ensaios com efluente sintético foram realizados em incubadora orbital *shaker* e em biorreator com cuba de 5 L. O meio foi suplementado com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g L^{-1} , K_2HPO_4 2 g L^{-1} , autoclavado ($121^\circ \text{ C}/15 \text{ min}$), e acrescido de sacarose, nitrato de amônio e velocidade de agitação de acordo com delineamento composto central rotacional (DCCR), temperatura 28° C , inóculo padronizado e tempo para retirada das amostras de 72 h. A eficiência de remoção de cor variou de 31,58% até 91,60% e a produção de biomassa de $0,40 \text{ g L}^{-1}$ a $8,70 \text{ g L}^{-1}$. Foi observada ainda, a produção de um exopolissacarídeo (EPS) na ordem de $0,66 \text{ g L}^{-1}$ a $9,70 \text{ g L}^{-1}$. Na análise das estimativas dos efeitos ($p < 0,05$) apenas o efeito linear da concentração de sacarose ($p < 0,000$) e o efeito quadrático da concentração de nitrato de amônio ($p < 0,018$) se mostraram significativos. O modelo obtido foi avaliado através da ANOVA, apresentando coeficiente de regressão elevado considerando um sistema biológico (R^2 0,8483). Este modelo foi validado através de experimento *a posteriori*, indicando excelente correlação entre o valor preditivo (74,8%) e o valor observado (73,8%). Os ensaios em biorreator ratificaram o comportamento observado em incubadora *shaker*, obtendo-se 86% de descoloração do efluente sintético ao final de 72 horas de tratamento e 91,3% de descoloração ao final de 168 horas de tratamento para o efluente industrial. Após 168 h de incubação observou-se atividade enzimática de lacase ($0,0563 \text{ U / ml}$). Os ensaios de toxicidade aguda com *Artemia salina* indicaram que a CL_{50} foi de aproximadamente 14,72% (v / v) para o efluente bruto, enquanto que o efluente submetido ao tratamento de oito dias o valor aproximado foi de 4,98% (v / v). Diversos autores relacionam os processos de descoloração a atividade enzimática, no entanto os resultados obtidos sugerem que a remoção de cor está relacionada a adsorção do corante na biomassa produzida. Estudos posteriores devem ser realizados para o melhor entendimento e confirmação de que a remoção de cor não está associada a biossíntese de enzimas degradadoras de estruturas fenólicas como as lacases.

Palavras-chave: *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Fungos. Corantes. Efluentes têxteis. Remoção de cor.

ABSTRACT

PIZATO, Everton. Capacity assessment of textile dye removal by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* MMPI in a synthetic and industrial effluent. 2013. 100 p. Dissertation – Post Graduate Program on Technology of Chemical and Biochemical Processes, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2013.

The industrial processes of textile production are characterized by the use of large volumes of water during the steps of washing and dyeing fabric, resulting in effluent with enormous diversity and chemical complexity. The presence of dye dissolved in the effluent is quite noticeable and problematic, considering its recalcitrance and slow degradation kinetics. In this work, the fungus ascomycete *L. theobromae* MMPI were evaluated for the ability to color removal from synthetic effluent containing blue dye reactive and industrial effluent. The tests with synthetic effluent were performed in incubator orbital *shaker* and in bioreactor with tub of 5L. The media was supplemented with $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g L^{-1} , K_2HPO_4 2 g L^{-1} , autoclaved (121 C/15 min), plus sucrose, ammonium nitrate and stirring speed according to central composite design (CCDR), temperature 28 C, inoculum standardized and time to withdrawal of samples 72h. The color removal efficiency ranged from 31.58% to 91.60% and the biomass yield 0.40 g L^{-1} to 8.70 g L^{-1} . It was still observed the production of an exopolysaccharide (EPS) in the range of 0.66 g L^{-1} to 9.70 g L^{-1} . In the analysis of estimated effects ($p < 0.05$) only the linear effect of sucrose concentration ($p < 0.000$) and quadratic effect of the concentration of ammonium nitrate ($p < 0.018$) were significant. The model was evaluated by ANOVA, with high regression coefficient considering a biological system (R^2 0.8483). This model was validated by experiment retrospectively, indicating excellent correlation between the predictive value (74.8%) and the observed value (73.8%). The tests in bioreactor ratified the behavior observed in an incubator *shaker* to give 86% decolorization of synthetic effluent at the end of 72 hours of treatment of discoloration and 91.3% at the end of 168 hours of treatment for industrial effluent. After 168 h of incubation was observed laccase enzyme activity (0.0563 U / ml). The acute toxicity tests with brine shrimp showed that the LC50 was approximately 14.72% (v / v) for the raw wastewater, while the effluent subjected to the treatment eight days was approximately 4.98% (v / v). Several authors relate the processes of bleaching enzyme activity, however the results suggest that the color removal is related to the adsorption of the dye in the biomass produced. Further studies should be performed for better understanding and confirmation that the color removal is not associated with the biosynthesis of phenolic structures degrading enzymes such as laccases.

Keywords: *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. Fungis. Dyes. Textile Effluents. Color removal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Divisão da estrutura molecular de um corante: parte A grupo cromóforo e parte B estrutura de fixação a fibra têxtil.	23
Figura 2	Quadro de classificação e utilização de corantes industriais	24
Figura 3	Estrutura de um corante reativo com o seu cromóforo, contendo grupos azo/ceto-hidrazona, os centros reativos e seus componentes solubilizadores.	24
Figura 4	Esquema de uma estação de tratamento de efluentes utilizando lodo ativado.....	27
Figura 5	Imagem da estação de tratamento de efluentes têxteis a) caixa de entrada; b)vista parcial do sistema de tratamento.....	34
Figura 6	Espectro de absorção ultravioleta visível do corante sintético preparado em diferentes concentrações (100, 75, 50, 25, 12,5 e 6,25%).	42
Figura 7	Absorbâncias do efluente sintético diluído (100, 75, 50, 25, 12,5 e 6,2%) em 622 nm -▲- e 313 nm -■- e absorbância relativa para cada diluição A 622/313 -●-.	44
Figura 8	Espectro de absorção ultravioleta visível do corante reativo em solução em diferentes valores de pH — ES, — pH 6,5 — pH 8,5 — pH 12,5... ..	45
Figura 9	Espectro de absorção ultravioleta visível do efluente bruto industrial ..	49
Figura 10	Efluente sintético do corante Azul Reativo preparado a) antes do tratamento b) após o tratamento 72 horas.	51
Figura 11	Solução do corante sintético nos diferentes ensaios realizados de acordo com o planejamento central ES (efluente sintético)	54
Figura 12	Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 6, em função das variáveis independentes concentração de nitrato de amônio e concentração de sacarose.	57
Figura 13	Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 7, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de sacarose.	57
Figura 14	Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 8, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de nitrato de amônio.	59
Figura 15	Simulações de remoção de cor com base nos parâmetros do modelo que foram estimadas a partir dos dados experimentais.	60
Figura 16	Simulações de remoção de cor com base nos parâmetros do modelo que foram estimadas a partir dos dados experimentais.	61
Figura 17	Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 9, em função das variáveis independentes concentração de nitrato de amônio e concentração de sacarose.	63

Figura 18	Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 10, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de sacarose.	64
Figura 19	Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 11, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de nitrato de amônio.	64
Figura 20	Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 12, em função das variáveis independentes concentração de nitrato de amônio e concentração de sacarose.	68
Figura 21	Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 13, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de sacarose.	69
Figura 22	Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 14, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de nitrato de amônio.	69
Figura 23	Biomassa fúngica <i>L. theobromae</i> MMPI após o tratamento.....	71
Figura 24	Porcentagem de descolaração do corante reativo em biorreator e produção de biomassa fúngica durante 07 dias de tratamento.....	73
Figura 25	Solução controle do corante sintético (ES) e solução do corante após o período de tratamento em 24 h (1), 48 h (2), 72 h (3), 96 h (4), 120 h (5), 144 h (6) e 168 h (7).	75
Figura 26	Espectros de absorção do corante reativo em solução após os diferentes tempos de tratamento ES (efluente sintético), 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h.	76
Figura 27	Absorbância máxima do efluente sintético após os tratamentos (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h) em 622 nm -▲- e 313 nm -■- e a absorbância relativa para cada tratamento 622/313 -●-.....	77
Figura 28	Resultados de DQO e acúmulo de EPS em diferentes períodos de tratamento: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 h.....	78
Figura 29	Porcentagem de descolaração do efluente bruto em biorreator e produção de biomassa fúngica durante 08 dias de tratamento.....	80
Figura 30	Efluente bruto EB (padrão de referência) e efluente bruto após o período de tratamento: 24 h (1), 48 h (2), 72 h (3), 96 h (4), 120 h (5), 144 h (6) e 168 h (7) e 192 h (8).	81
Figura 31	Resultados de DQO e EPS produzido em diferentes tempo de tratamento, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h e 192 h.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do Meio Mínimo de Vogel.....	32
Tabela 2	Concentração de nutrientes utilizados nos experimentos preliminares	37
Tabela 3	Níveis e fatores estudados no Delineamento Composto Central Rotacional	37
Tabela 4	Composição física e química do efluente têxtil	46
Tabela 5	Remoção de cor, biomassa produzida e pH final após 72 horas de tratamento	51
Tabela 6	Matriz do delineamento composto central, valores codificados, reais e respostas.....	53
Tabela 7	Efeitos, coeficientes de regressão e interações para a variável remoção de cor	55
Tabela 8	Análise de variância para a remoção de cor (RC).....	56
Tabela 9	Efeitos, coeficientes de regressão e interações calculadas para a variável biomassa.....	62
Tabela 10	Análise de variância para a produção de biomassa (BIO)	62
Tabela 11	Efeitos, coeficientes de regressão e interações calculadas para a variável EPS.....	65
Tabela 12	Análise de variância para a produção de EPS	66
Tabela 13	Efeitos, coeficientes de regressão e interações calculadas para a variável pH	67
Tabela 14	Análise de variância para os valores de pH (pH)	67
Tabela 15	Valores de pH e compostos fenólicos em diferentes tempos de tratamento	83
Tabela 16	Ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> após 48 h de incubação em diferentes concentrações do efluente.....	85

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ANOVA	Análise de variância
BDA	Agar-batata-dextrose
Cema	Conselho Estadual do Meio Ambiente
Cetesb	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
Conama	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EPS	Exopolissacarídeo
ES	Efluente Sintético
Fatma	Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina
NTU	Unidade de Turbidez Nefelométrica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
p / v	Peso / volume
U / ml	Micromol de produto por minuto / ml
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV-VIS	Ultravioleta-visível
v / v	Volume / volume

LISTA DE SÍMBOLOS

μS	microsiemens
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cálcio dihidratado
Cl	Colour Index
CL_{50}	Concentração letal a 50%
cm	Centímetro
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre heptahidratado
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de ferro e amônio hexahidratado
g L^{-1}	grama por litro
g	grama
h	hora
H^+	Íon hidrogênio
H_3BO_3	Ácido bórico
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Dihidrogeno fosfato de sódio
mg	Miligrama
mg g^{-1}	Miligrama por grama
mg L^{-1}	Miligrama por litro
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de magnésio hexahidratado
$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio dihidratado
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio heptahidratado
ml L^{-1}	mililitro por litro
mL	mililitro
mM	milimol
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganês hidratado
N	Nitrogênio
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sódio dihidratado
Na_2SO_4	Sulfato de sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

NH_4^+	íon amônio
NH_4NO_3	Nitrato de amônio
nm	Nanômetro
NO_3^-	íon nitrato
$^\circ\text{C}$	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinco heptahidratado
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 A INDÚSTRIA TEXTIL E A PRODUÇÃO DE EFLUENTES	19
2.1.1 O problema do efluente têxtil.....	20
2.3 CORANTES TÊXTEIS	22
2.4 PROCESSOS DE TRATAMENTO EM EFLUENTES TÊXTEIS	26
2.4.1 Biodegradação de corantes utilizando fungos.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 MICRORGANISMO	31
3.1.1 Preparo do Inóculo	31
3.2 CORANTE TÊXTIL	32
3.2.1 Obtenção dos espectros ultravioleta visível	33
3.2.2 Testes de estabilidade em função do pH	33
3.3 EFLUENTE TÊXTIL	34
3.3.1 Caracterização Físico-química do Efluente Têxtil	34
3.3.2 Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	35
3.4 ENSAIOS EM INCUBADORA SHAKER de bancada	35
3.4.1 Estudos preliminares	35
3.4.2 Planejamento de experimentos	37
3.4.3 Determinação de Cor	38
3.4.4 Determinação de Biomassa	39
3.4.5 Determinação de Exopolissacarídeo (EPS)	40
3.4.6 Determinação da Atividade Enzimática.....	40
3.5 ENSAIOS EM BIORREATOR	40

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS ULTRAVIOLETA VISÍVEL.....	42
4.2 TESTES DE ESTABILIDADEEM FUNÇÃO DO pH	44
4.3 CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE TÊXTIL	46
4.4 ENSAIOS EM INCUBADORA SHAKER DE BANCADA	50
4.4.1 Resultados preliminares	50
4.4.2 Planejamento de experimentos	52
4.4.2.1 Remoção de cor	55
4.2.2.2 Produção de biomassa	61
4.2.2.3 Produção de EPS	65
4.2.2.4 Variação de pH.....	66
4.2.2.5 Atividade enzimática.....	70
4.5 ENSAIOS EM BIORREATOR	72
4.5.1 Tratamento do efluente sintético	73
4.5.1.1 Remoção de cor	73
4.5.1.2 Determinação de DQO	77
4.5.2 Tratamento do efuente bruto industrial.....	79
4.5.3 Ensaio de Toxicidade <i>Artemia salina</i>	85
5 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICE.....	95

1 INTRODUÇÃO

A partir do desenvolvimento de novas tecnologias e conseqüentemente com o crescimento das atividades industriais, cada vez mais têm sido produzidos novos compostos sintéticos e com eles, surgem novos problemas associados ao descarte inadequado dos resíduos oriundos das etapas produtivas. Embora tenham ocorrido progressos das técnicas de controle da poluição para vários campos da indústria, a questão do descarte de resíduos no meio ambiente ainda é um problema, e em muitos casos não se chegou a métodos que propiciem o controle absoluto.

Os processos industriais de produção têxtil têm como característica o uso de grandes volumes de água e a geração de diferentes resíduos e compostos tóxicos. O elevado consumo de água durante as etapas de lavagem e tingimento, fornecem efluentes líquidos com enorme diversidade e complexidade química, dentre os quais se destacam os corantes, os compostos orgânicos e inorgânicos. A presença de corantes dissolvidos no efluente é bastante visível e problemática. A resistência destes compostos frente aos tratamentos convencionais e os produtos originados da degradação incompleta resultam em novas moléculas com efeitos nocivos e / ou mutagênicos aos organismos vivos (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

As pesquisas de degradação de compostos químicos têm revelado vários microrganismos extremamente versáteis em degradar substâncias recalcitrantes. Estes microrganismos são reconhecidos por sua capacidade de se adaptar e crescer em condições ambientais desfavoráveis e têm sido amplamente estudados devido à produção de enzimas intracelulares e extracelulares, que são capazes de degradar moléculas bastante complexas (KUMARAN; DHARANI, 2011).

O aprimoramento das tecnologias existentes ou o estudo e desenvolvimento de novas tecnologias, visando diminuir ou eliminar o lançamento de compostos nocivos no meio ambiente são necessários, assim como a busca por novas espécies de microrganismos que possam ser aplicados para biorremediação de resíduos industriais (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Nesse contexto, propõem-se neste estudo, avaliar a capacidade de descoloração de corante têxtil utilizando o fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, buscando avaliar as características de um novo tipo de microrganismo como alternativa para o tratamento de efluentes têxteis. Este é um

fungo que foi descrito como fitopatógeno facultativo, causador de doenças em plantas vivas, em frutos e vegetais armazenados, provocando diferentes sintomas nas plantas infectadas, tais como lesões no caule, raízes, folhas, frutos e sementes, atacando várias frutíferas tropicais, eucaliptos, entre outras (FREIRE et al. 2004; PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006). A proposta de utilização deste fungo para o tratamento destes resíduos baseia-se na capacidade de produção de lacase pelo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, bem como outros mecanismos existentes descritos nos processos de descoloração, utilizando biomassa fúngica (VASCONCELOS et al., 2001; CUNHA et al., 2003).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A INDÚSTRIA TEXTIL E A PRODUÇÃO DE EFLUENTES

No Brasil, o setor têxtil e de confecções é extremamente relevante para a economia, uma vez que se trata do segundo maior empregador da indústria de transformação e absorve expressiva quantidade de mão de obra. A cadeia produtiva têxtil e de confecções inicia-se na agropecuária a partir das fibras naturais, ou na indústria, que utiliza fibras manufaturadas, passando pelo fio, tecidos, beneficiamento, confecção e termina no consumidor final. Os processos são extremamente heterogêneos no que diz respeito às matérias-primas utilizadas, tipo de produção existente, padrões de concorrências e estratégias empresariais (MDIC, 2012).

As formas de obtenção e produção de tecidos podem ser bastante complexas, mas basicamente são compostas de três fases diferentes: fiação, tecelagem e acabamento. Na etapa de fiação, a indústria recebe a matéria-prima em fibras e transforma em fios. Os fios produzidos são encaminhados a tecelagem para a produção de tecidos, que por sua vez, seguem para os processos de acabamento para finalmente atingir a confecção. O produto final de cada uma dessas fases é a matéria-prima da fase seguinte (BRAILE; CAVALCANTI, 1993; COSTA; ROCHA, 2009).

Nas etapas de fiação e tecelagem, não ocorrem ou pouco contribuem para a geração de efluentes líquidos, pois a maioria dos trabalhos ocorre a seco. Dessa forma, a principal origem do efluente produzido pelas indústrias têxteis é proveniente de processos de acabamento e beneficiamento, tais como desengomagem, lavagem, branqueamento e tingimento (MUKESH; KUMAR, 2005).

De modo geral, as indústrias têxteis consomem quantidades consideráveis de água, gerando grande quantidade de águas residuárias, as quais geralmente contêm elevado potencial poluidor, rico em produtos químicos variados, incluindo corantes sintéticos e naturais (GUARATINI; ZANONI, 2000; SALGADO et al, 2009).

Os despejos gerados pela indústria variam à medida que a pesquisa e o desenvolvimento produzem novos reagentes, novos processos, novos maquinários,

novas técnicas e, também, conforme a demanda do consumidor por outros tipos de tecidos e cores (BRAILE; CAVALCATI, 1993).

Durante o processo de tingimento, por exemplo, uma forma de fixação dos corantes à fibra pode ocorrer através de reações químicas, e a tecnologia utilizada é escolhida de acordo com a natureza da fibra têxtil, características estruturais, classificação e disponibilidade do corante para aplicação, propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, considerações econômicas e muitas outras (BANAT et al. 1996; GUARATINI; ZANONI, 2000).

De modo geral, a qualidade e a quantidade dos despejos têxteis produzidos dependem do tipo de produto fabricado, que associados a grandes vazões e elevadas concentrações de compostos poluentes, conferem ao efluente final uma carga considerável. A maior parte desta carga é constituída por impurezas inerentes à matéria-prima, operações de limpeza das máquinas e lavagem das caldeiras, produtos para facilitar as etapas de produção, tais como, sabões, ácidos, detergentes, hidróxido de sódio, carbonatos, sulfato e cloreto de sódio, além de corantes eliminados durante as diferentes etapas do acabamento (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

A redução, recirculação e reutilização destes despejos, bem como a recuperação de produtos químicos e subprodutos, constituem os maiores desafios enfrentados pela indústria têxtil, visando sempre reduzir os custos e facilitar os processos de tratamento de seus despejos, pois quando não tratados corretamente provocam sérios problemas de contaminação ambiental.

2.1.1 O problema do efluente têxtil

Os problemas ambientais tem se tornado cada vez mais críticos e frequentes, principalmente devido ao desmedido crescimento populacional e ao aumento das atividades industriais, provocando problemas e alterações catastróficas na qualidade do solo, ar e água. Historicamente, o destino mais comum de qualquer efluente produzido, industrial ou urbano, é o lançamento a um corpo d'água. Em consequência desse lançamento, surge a possibilidade de serem gerados certos inconvenientes, como por exemplo, o desprendimento de maus odores, o sabor

estranho na água potável, mortandade de peixes, entre outros (IMHOFF; IMHOFF 1986; KUNZ; ZAMORA, 2002).

O setor têxtil está em constante crescimento e junto com ele, ocorre também um aumento substancial do potencial poluente. Estas indústrias consomem aproximadamente 60 a 400 litros de água para cada quilo de tecido produzido, além de diversos produtos químicos de origem orgânica e inorgânica, utilizados durante os chamados processos molhados (ALI; HAMEED; AHMED, 2009).

Entre os principais parâmetros indicadores de poluição dos efluentes têxteis, destacam-se elevadas cargas de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de grandes quantidades de detergentes, sais e resíduos de baixa biodegradabilidade. O potencial hidrogeniônico (pH) dos despejos varia entre 8 e 11, o teor de sólidos em suspensão de 30 a 50 mg L⁻¹, sólidos totais entre 1000 a 1600 mg L⁻¹, a DBO de 200 a 600 mg L⁻¹, elevada carga de DQO, geralmente excedendo 1000 mg L⁻¹ e a cor depende do corante usado com predominância (BRAILE; CAVALCANTI, 1993; BAIRD; NYANHONGO et al., 2001; CANN, 2011).

Estes contaminantes, se não tratados de forma adequada e lançados diretamente em um corpo receptor, podem causar malefícios ao meio e ao homem, prejudicando inclusive posteriores utilizações destas águas (MOTA, 1995). Von Sperling (1996) aponta que valores elevados de DBO e DQO podem causar diversos problemas nos corpos hídricos, entre eles, o consumo de oxigênio dissolvido provocando a mortandade de peixes, aparecimento de espumas e aumento da toxicidade. Em determinadas condições de pH, o nível de solubilidade de diversas substâncias pode ser modificado, influenciando na distribuição das formas livre e ionizada dos compostos químicos, definindo inclusive o potencial de toxicidade de vários elementos (LIBÂNIO, 2005).

Entretanto, dentre os inúmeros contaminantes presentes, sem dúvida o maior problema no tratamento de efluentes têxteis se deve a presença de corantes, oriundos principalmente da etapa tingimento e descoloração. Durante o processo de produção, cerca de 10 a 15% dos corantes utilizados são descarregados nos efluentes devido à inadequada fixação a fibra e perdas durante a retirada de excessos nas etapas finais de lavagem e acabamento. Estes corantes, além da poluição visual, são também caracterizados como recalcitrantes (compostos que permanecem num determinado ambiente de forma inalterada) e apresentam uma

cinética de degradação muito lenta (KUNZ; REGINATTO; DURÁN, 2001; MUKESH; KUMAR, 2005).

2.3 CORANTES TÊXTEIS

Corantes e pigmentos orgânicos podem ser definidos como substâncias intensamente coloridas que, quando aplicadas a um material lhe conferem cor. São substâncias intensamente empregadas para coloração de vários substratos, tais como: alimentos, cosméticos, plásticos, materiais têxteis, etc. Especificamente os corantes têxteis, são compostos orgânicos cuja finalidade é conferir a certa fibra (substrato) determinada cor, sob condições de processo pré-estabelecidas (ABIQUIM, 2012).

A indústria vem gerando durante décadas, milhões de toneladas desses compostos. O Colour Index (catálogo da Society of Dyers and Colourists) tem registrado atualmente mais de 8 mil corantes orgânicos sintéticos associados à indústria têxtil. Cerca de 700 mil toneladas e 10 mil tipos de corantes e pigmentos são produzidos anualmente em todo mundo. Estes corantes apresentam estruturas moleculares complexas de difícil degradação, que podem envolver, durante seu processo de síntese, até 500 reações intermediárias (BANAT et al. 1996; ZANONI; CARNEIRO, 2001).

A molécula de um corante é dividida em duas partes principais (Figura 1). Geralmente apresentam um grupo cromóforo - que dá cor ao composto pela absorção de uma parte de energia radiante - classificado como azo, antraquinona, nitro, indigoides, etc., e a outra parte da molécula é composta de grupos auxiliares, que propiciam sua afinidade pela fibra têxtil - natural ou sintética. Normalmente, os corantes costumam ser classificados de acordo com a maneira como se fixam à fibra, dentre eles, os reativos, ácidos, básicos, diretos, dispersivos, azóicos, à cuba, de enxofre, pré-metalizados e branqueadores (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

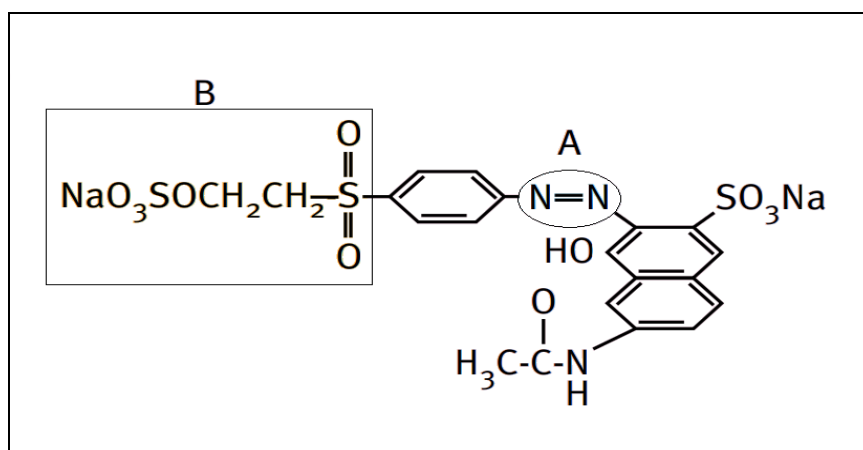


Figura 1 - Divisão da estrutura molecular de um corante: parte A grupo cromóforo e parte B estrutura de fixação a fibra têxtil.
Fonte: Adaptado de ZANONI; CARNEIRO (2001).

Tendo em vista a complexidade dos corantes, muitas vezes é impossível traduzi-los por uma fórmula química – alguns são misturas de vários compostos e outros não possuem estrutura definida. Para identificar os mesmos corantes, comercializados com diferentes nomes, utiliza-se o Colour Index (CI), que contém uma lista organizada para designar os diversos tipos (ABIQUIM, 2012).

A classificação dos corantes de acordo com a sua utilização está disposta no quadro a seguir (Figura 2) contendo os principais substratos, métodos de aplicação, bem como as classes químicas representantes de cada corante.

Classe	Substrato	Método de aplicação	Estrutura química
Ácido	Nylon, lã, seda, poliamida sintética, tintas e couro	Geralmente a partir do neutro a ácido	Azo, antraquinona, trifenilmetano, azina, xanteno, nitro e nitroso
Azóico	Algodão, rayon, poliéster	Impregnado na fibra com acoplamento e tratado com uma solução salina	Azo
Básico	Papel, nylon modificado, poliéster e tinta	Apilcado a partir de banho de corantes ácidos	Azo, azina, xanteno, acridina, antraquinona, difenilmetano, caianina
Direto	Algodão, viscose, papel, couro e nylon	Aplicado a partir de banho neutro ou ligeiramente alcalino contendo eletrólito	Azo, ftalocianina, estilbeno, oxazine
Disperso	Polyester, poliacrilonitrila, nylon e acetato celulose	Frequentemente aplicado em temperaturas elevadas	Azo, antraquinona, estirilo, nitro
Reativo	Algodão, lã, seda e nylon	O sítio ativo do corante reage com o grupo funcional da fibra covalentemente sob a influência de calor e de pH (alcalino)	Azo, antraquinona, ftalocianina, formazano, oxazina e de base
Solvente	Plástico, gasolina, vernizes, lacas, tintas,	Dissolução no substrato	Azo, antraquinona, trifenilmetano e

	gorduras, óleos e ceras		ftalocianina
Enxofre	Algodão e rayon	Aplicados após pré-redução em banho de ditionito de sódio	Estrutura indeterminada
Cuba	Algodão, rayon e lã	Insolúveis em água, solubilizados em hidrossulfito de sódio	Antraquinona, índigo e tioindigoides

Figura 2 - Quadro de classificação e utilização de corantes industriais
Fonte: Adaptado de HUNGER (2003); ZANONI; CARNEIRO (2001).

Os corantes azos são de longe a classe mais importante e mais utilizada, representando mais de 50% de toda linha de corantes comerciais empregados mundialmente no tingimento de fibras, conseqüentemente, constituindo a maior parte dos efluentes gerados de indústrias têxteis. Este grupo apresenta em sua estrutura um ou mais grupamentos azo ($-N=N-$) ligados a sistemas aromáticos, o que contribui para a resistência destes corantes e dificulta a degradação química e biológica destes compostos (KUNZ; ZAMORA 2002; HUNGER, 2003). Em geral, corantes com estruturas mais simples e pesos moleculares menores possuem taxas de degradação maiores, enquanto moléculas com elevado peso molecular são mais difíceis de degradar (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003).

Devido a sua facilidade de produção, baixo custo, constância da estrutura e grande variedade de cores, os corantes reativos azos são extensivamente utilizados na indústria têxtil. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila. A Figura 3 apresenta uma típica estrutura de um corante reativo azo.

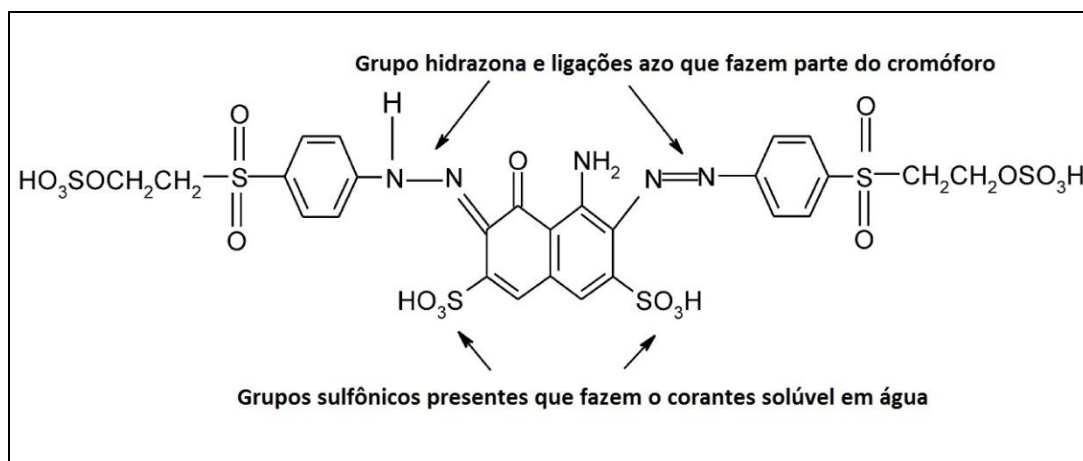


Figura 3 - Estrutura de um corante reativo com o seu cromóforo, contendo grupos azo/ceto-hidrazona, os centros reativos e seus componentes solubilizadores.
Fonte: Adaptado de PEARCE; LLOYD; GUTHRIE (2003).

Em função de sua estabilidade e natureza xenobiótica, corantes reativos azo não são totalmente degradados por processos de águas residuárias convencionais que utilizam produtos químicos e lodos ativados (MUKESH; KUMAR, 2005). De acordo com Gaylarde, Bellinaso e Manfio (2005) “xenobióticos são substâncias químicas de difícil degradação (recalcitrantes), geralmente sintéticas, produzidas por tecnologias industriais, consideradas estranhas ao ambiente natural”. Estas substâncias e seus metabólitos podem ser tóxicos, mutagênicos e até cancerígenos, e ao entrar na cadeia alimentar podem causar danos à saúde.

O interesse no potencial de poluição de corantes têxteis foi impulsionado principalmente pela preocupação com sua possível toxicidade e carcinogenicidade, principalmente devido ao fato de que muitos corantes são feitos a partir de substâncias cancerígenas conhecidas, tais como a benzidina e outros compostos aromáticos (BANAT et al. 1996).

Durante a degradação, os corantes azos e também os metálicos podem sofrer transformações, levando a formação de aminas, metais livres e outros compostos intermediários com potencialidade carcinogênica. Pelo menos 3000 corantes azos comerciais catalogados como cancerígenos não têm sido mais produzidos. Entretanto, em países menos desenvolvidos como Brasil, Argentina Índia e México, não foram cessadas completamente a produção de alguns corantes à base de benzidinas, devido sua grande potencialidade econômica (BANAT et al. 1996; GUARATINI; ZANONI, 2000).

Em consequência do lançamento de compostos contendo corantes em corpos d'água, podem ocorrer efeitos nocivos sobre os microrganismos expostos, devido à toxicidade destes corantes e solubilidade dos gases. A coloração anormal também afeta a estética e a transparência da água, ocorrendo assim à redução na fotossíntese, provocada pela diminuição da incidência de raios no meio. (PEARCE;LLOYD;GUTHRIE, 2003; FU;VIRARAGHAVAN, 2001; KUNZ; ZAMORA, 2002).

Segundo Cetesb (1990 apud Kamida 2004, p.30):

Quando efluentes líquidos, mesmo os tratados, são lançados de forma contínua no ambiente aquático, podem ocorrer efeitos crônicos, uma vez que os organismos são expostos a baixas concentrações de determinados poluentes durante longos períodos de tempo. Se estes poluentes forem degradáveis, dada a sua efêmera persistência no ambiente, ocorrerá equilíbrio a certa distancia do ponto de lançamento, mas, no trecho ou área

em que esse fenômeno de degradação se processa, os organismos poderão enfrentar impedimentos ou dificuldades para se manter no ambiente, levando a alterações na estrutura e funcionamento do sistema aquático. Se entre os poluentes lançados, existirem substâncias persistentes ou bioacumuláveis, efeitos mais drásticos poderão, então, ocorrer nas populações expostas.

A remoção dos corantes do efluente continua sendo o problema principal para a indústria têxtil. Eliminar ou pelo menos reduzir o nível destes compostos no meio ambiente a níveis aceitáveis legalmente é muito importante. A avaliação e conhecimento das propriedades físicas, químicas, toxicológicas e ecológicas de um corante são extremamente essenciais, a fim de verificar a sua influência sobre o meio ambiente e estimar se um determinado produto apresenta ou não um potencial perigo (HUNGER, 2003).

2.4 PROCESSOS DE TRATAMENTO EM EFLUENTES TÊXTEIS

Atualmente os principais métodos utilizados para o tratamento de águas residuárias têxteis envolvem processos físicos, químicos e biológicos. As técnicas de tratamento através de coagulação, flotação ou sedimentação, removem quantidades elevadas de material particulado, porém, a remoção de cor e compostos orgânicos dissolvidos mostra-se deficiente. Além disso, estes sistemas geram ao final do tratamento um novo resíduo (o lodo), pois utilizam como tecnologia a transferência de fase, sendo considerados processos não destrutivos. Embora o volume dos resíduos possa ser significativamente diminuído, a disposição da fase sólida continua sendo um problema sem solução (ZANONI; CARNEIRO, 2001; KUNZ; ZAMORA, 2002; PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003).

Segundo Pearce, Lloyd e Guthrie (2003) outras técnicas emergentes como tratamento por ozonização, utilizando o reagente Fenton, destruição eletroquímica e fotocatalise possuem grande potencial para descoloração. No entanto, essas tecnologias geralmente envolvem processos complicados ou são economicamente inviáveis, apresentando algumas desvantagens em sua aplicação.

Embora a maioria dos corantes não apresente sensibilidade ao ataque de microrganismos (tratamento aeróbio e anaeróbio), muitos pesquisadores têm

apontado a biodegradação – enzimas de fungos e bactérias – e a biomassa (material capaz de retirar o corante dissolvido) como técnicas promissoras para remoção e / ou degradação de efluentes têxteis (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

Dentro do contexto de processos destrutivos, o tratamento biológico merece destaque, pois é a técnica mais comum e mais difundida utilizada no tratamento de efluentes, tendo sido empregada há mais de 150 anos. Em geral, na indústria têxtil os processos de tratamento são feitos utilizando etapas de precipitação-coagulação, seguidos pelo sistema de lodos ativados (Figura 4) (KUNZ; ZAMORA, 2002; HUNGER, 2003).

Entretanto, este processo pode promover apenas a remoção e degradação parcial do corante, gerando substâncias com potencial tóxico ou carcinogênico maior do que o composto original (poluentes persistentes não podem ser facilmente degradados por lodos ativados). Outro inconveniente do processo é a produção de grandes quantidades de lodo contendo corante adsorvido, que necessita de novo tratamento para disposição adequada (ZANONI; CARNEIRO, 2001; HUNGER, 2003).

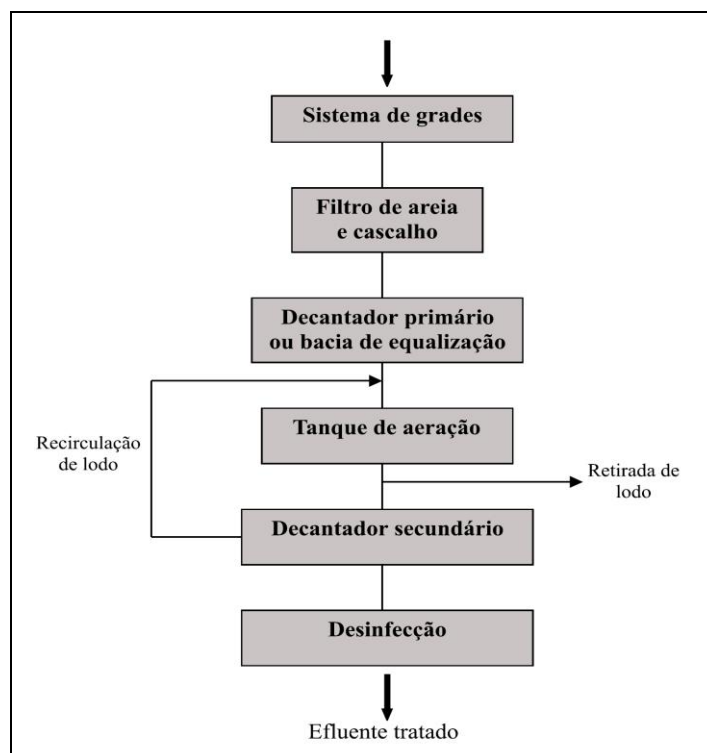


Figura 4 - Esquema de uma estação de tratamento de efluentes utilizando lodo ativado
Fonte: KUNZ; ZAMORA (2002).

A grande motivação dos pesquisadores envolvidos com estudos de biodegradação pode ser expressa pela busca contínua de microrganismos versáteis, capazes de degradar de maneira eficiente um grande número de poluentes a um baixo custo operacional. As pesquisas de degradação de compostos químicos têm mostrado vários microrganismos capazes de degradar substâncias recalcitrantes, incluindo fungos, bactérias, leveduras e algas capazes de descolorir até mesmo mineralizar completamente corantes em determinadas condições ambientais (BANAT et al. 1996).

A utilização de fungos degradadores de lignina tem se mostrado eficientes na remoção de vários compostos e corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados. Contudo, às vezes a mineralização total destes compostos torna-se muito difícil, principalmente em função da diversidade, concentração e composição de espécies químicas presentes em cada efluente (KUNZ; ZAMORA, 2002; KAMIDA; DURRANT, 2005).

2.4.1 Biodegradação de corantes utilizando fungos

Devido aos fungos muitas vezes diferirem somente em características sutis, tais como detalhes da estrutura, dos pigmentos e de complexos compostos orgânicos, é provável que muitos ainda não tenham sido reconhecidos como espécies distintas. Atualmente encontram-se descritas cerca de 60 mil espécies de fungos, mas estima-se que existam mais de 1,5 milhões de espécies, sendo que a maioria ainda está por ser identificada e descrita pelos micologistas (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001).

Pesquisadores da área de biotecnologia têm avaliado uma série de fungos ligninolíticos utilizados para descoloração e mineralização de corantes e efluentes têxteis. Estes microrganismos são reconhecidos por sua capacidade de se adaptar e crescer em condições ambientais desfavoráveis e têm sido amplamente utilizados, principalmente por apresentarem como característica, a produção de enzimas extracelulares capazes de degradar moléculas complexas (KUMARAN; DHARANI, 2011; GUPTA; TRIPATHI; HARSH, 2011). Espécies como *Aspergillus* sp, *Phanerochete chrysosporium*, *Pleurotus sajor caju*, entre outras, já foram utilizadas

como biorremediadores de corantes têxteis e apresentaram grande potencial para o tratamento biológico (KUNZ; REGINATTO; DURÁN, 2001; KAMIDA; DURRANT, 2005).

Apesar de não se conhecer exatamente o mecanismo de descoloração de corantes, as enzimas lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases tem sido relatadas como principais responsáveis por estes processos. Contudo, a contribuição para descoloração por estas enzimas pode ser diferente, variando para cada fungo, devido a diferenças qualitativas e quantitativas destas enzimas (FU; VIRARAGHAVAN; 2001; BANAT et al. 1996).

Dentre as três citadas anteriormente, a lacase tem sido descrita como a principal enzima que promove a oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos (NYANHONGO et al. 2001). Esta enzima ligninolítica tem a capacidade de catalisar reações de desmetilação, que é um inicial e importante passo em processos de biodegradação de cadeias poliméricas, com subsequente decomposição de macromoléculas de lignina pelo rompimento de anéis aromáticos em estruturas fenólicas. Em processos de oxidação de muitos compostos (principalmente de compostos fenólicos) esta enzima tem apresentado uma grande especificidade para um grande número de compostos xenobióticos e efluentes industriais (KUNZ; ZAMORA, 2002).

A maioria dos fungos produtores de enzimas necessárias à degradação de materiais lignocelulósicos (madeiras, palhas, cascas, etc.) pertencem aos grupos *Ascomycetos*, *Deuteromicetos* e *Basidiomicetos*. Os fungos que vivem em madeira morta, geralmente degradam um ou mais componentes da madeira e causam três tipos de degradação: branca, marrom e macia. Os fungos de degradação marrom e macia são capazes de degradar lignina em alguma extensão, embora preferencialmente ataquem a celulose na madeira. Fungos de podridão branca pertencem principalmente ao grupo basidiomicetos, mas também, podem incluir alguns ascomicetos (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010; GUPTA; TRIPATHI; HARSH, 2011).

Dentre os fungos ascomicetos ligninolíticos, um isolado de *Botryosphaeria* (MAMB-5), caracterizado como *Botryosphaeria rhodina* tem sido intensamente estudado quanto a sua produção de enzimas (lacases) e exopolissacarídeos (EPS) (SALDANHA et al., 2007; CUNHA et al. 2012). Além do isolado *Bothyosphaeria* (MAMB-5), Vasconcelos et al. (2001) constataram que outros dois fitopatógenos de

Botryosphaeria: *Botryosphaeria ribis* e *Lasiosiplodia theobromae* MMPI produzem lacases tanto intra quanto extracelularmente. Saraiva 2009, também observou a produção de lacases e celulases pelo *L. theobromae*, além da produção de outros tipos de enzimas como as proteases, xilanases, lipases, uréases, amilases e pectinases.

Além dos processos de descoloração e biodegradação, outros mecanismos importantes podem estar relacionados à remediação de efluentes têxteis industriais. Fu e Viraraghavan (2001) destacam que os processos de descoloração fúngica de águas residuárias de indústrias têxteis podem ser divididos de acordo com seu estado de vida: em células vivas para biodegradar e biossorver, e células mortas para adsorver corantes. Para células vivas, o principal mecanismo é a biodegradação de corantes e, conforme mencionado anteriormente, a produção de enzimas oxidativas como as lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase. No caso de células mortas, o mecanismo é a adsorção e envolve interações físico-químicas, deposição e troca iônica.

Até onde se sabe, não foram realizados estudos utilizando o fungo *L. theobromae* MMPI para o tratamento de efluentes têxteis. Nesse sentido, este fungo pode apresentar-se como uma alternativa para o tratamento destes resíduos, seja pela sua capacidade de produção de enzimas como a lacase, bem como pela possível capacidade de adsorção de corantes pela biomassa celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente buscou-se avaliar o comportamento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI com relação à sua capacidade de remoção de cor em efluente sintético formulado com um corante Azul Reativo. Os ensaios foram conduzidos em incubadora orbital (*shaker*) e posteriormente realizados em biorreator de bancada. Em seguida, o tratamento em biorreator foi realizado utilizando o efluente têxtil, oriundo das etapas do processo produtivo industrial.

Os experimentos efetuados nesta pesquisa foram realizados nos Laboratórios de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná e no Laboratório de Bioprocessos junto a Central de Análises, localizados no município de Pato Branco - PR.

3.1 MICRORGANISMO

O fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*) utilizado nesta pesquisa, foi mantido em tubos de ensaio com meio ágar-batata-dextrose (BDA) e mantido sob-refrigeração a 4° C até sua utilização, sendo feito repiques periódicos do micélio fúngico para tubos com meio BDA novo.

3.1.1 Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo em meio líquido, transferiu-se uma alçada do micélio fúngico armazenado nos tubos de ensaio para placas de petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28° C por 96 horas. O micélio crescido na superfície das placas foi transferido para frascos de erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizados, contendo 90 mL de Sais Minerais Mínimo de Vogel (Tabela 1) e 10 mL de solução de glicose na concentração de 5 g L⁻¹. Os

frascos foram cultivados em *shaker* de bancada, durante um período de 48 horas a 28° C sob agitação constante de 180 RPM, para obtenção da biomassa.

A biomassa produzida foi extraída em uma centrífuga (Nova Técnica modelo NT 820) durante 20 minutos a 3500 RPM, lavada com água destilada estéril e transferida asépticamente a um triturador esterilizado. Posteriormente, foi adicionada água destilada estéril para homogeneização deste material, com o propósito de originar uma solução padrão com absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm - conforme descrito por Steluti et al. (2004) com adaptações - utilizada na realização dos ensaios de descoloração do corante têxtil em efluente sintético e do efluente industrial.

Tabela 1 – Composição do Meio Mínimo de Vogel

Nutrientes	Quantidade
Meio Mínimo de Vogel*	-
Citrato de Sódio pentahidratado	150 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g L ⁻¹
NH ₄ NO ₃ anidro	100 g L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	10 g L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	5 g L ⁻¹
Solução de elementos traços**	5 mL L ⁻¹
Solução de biotina (0,1 mg L ⁻¹)	2,5 mL L ⁻¹
**Solução de elementos traços	-
Ácido Cítrico.monohidratado	5 g L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5 g L ⁻¹
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	1 g L ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25 g L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05 g L ⁻¹
H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05 g L ⁻¹

Fonte – VOGEL (1956).

(*) Para o uso, este meio é diluído cinquenta vezes com água destilada.

3.2 CORANTE TÊXTIL

O corante Azul Reativo empregado no preparo do efluente sintético foi adquirido de uma indústria têxtil localizada na Região Sudoeste do Estado do Paraná, município de Dois Vizinhos. Para o preparo da solução estoque do corante Azul Reativo dissolveu-se 50 mg do corante sólido em água destilada, completando

o volume para 1000 mL, originando uma solução com concentração final de 50 mg L⁻¹, sendo armazenada em frascos sob refrigeração a 4° C até posterior utilização.

3.2.1 Obtenção dos espectros ultravioleta visível

Os espectros ultravioleta visível do efluente sintético e do efluente bruto foram obtidos através de varredura espectral, em duplicata, entre os comprimentos de onda de $\lambda = 190-1100$ nm em espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 45. As interpretações espectrais foram qualitativas e relativas à comparação entre o espectro obtido das soluções sintéticas e do efluente antes e após os tratamentos realizados. Em todas as determinações as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos a 3.500 RPM e avaliados em espectrofotômetro, utilizando água destilada como referência.

3.2.2 Testes de estabilidade em função do pH

Os testes de estabilidade com as amostras do efluente sintético foram realizados em seis valores de pH (2,5, 4,5, 6,5, 7,5, 8,5 e 12,5) para verificação de possíveis alterações da absorção espectral do corante em função de diferentes concentrações do íon H⁺. As soluções foram preparadas em duplicata, em tubos de ensaio contendo 9 mL da solução estoque de corante sintético e 1 mL de solução HCl ou NaOH ajustada com conforme necessidade. Após a homogeneização as soluções foram analisadas em espectrofotômetro ultravioleta visível em cubetas de quartzo para varredura espectral das amostras entre os comprimentos de onda de $\lambda = 190-1100$ nm (SANTOS, 2011).

3.3 EFLUENTE TÊXTIL

A amostra correspondente ao efluente bruto foi coletada de forma intermitente, composta de várias e pequenas alíquotas obtidas em intervalos de uma hora durante um período de oito horas de produção, recolhidas na caixa de entrada da estação de tratamento de efluente da indústria têxtil. Os frascos contendo o efluente bruto coletado foram mantidos sob refrigeração até sua utilização. A Figura 5 apresenta a caixa de entrada da estação de tratamento de efluentes e uma imagem geral do sistema utilizado pela empresa.



Figura 5 – Imagem da estação de tratamento de efluentes têxteis a) caixa de entrada; b) vista parcial do sistema de tratamento.

3.3.1 Caracterização Físico-química do Efluente Têxtil

Para verificar a carga poluidora e a toxicidade do efluente têxtil, foram caracterizados os parâmetros: Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO_5), Potencial Hidrogeniônico, Sólidos Totais, Sólidos Sedimentáveis, Sólidos Dissolvidos Totais, Sólidos Suspensos Totais, Cloretos, Sulfatos, Turbidez, Fenóis e Toxicidade utilizando *Artemia sp.*, com o propósito de avaliar o efeito do tratamento utilizado na remediação do efluente em questão. Os ensaios foram determinados por metodologias propostas por American Health

Association Methods (APHA, 1998) e a análise de toxicidade conforme descrito no item 3.3.2.

3.3.2 Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade do efluente bruto sobre *Artemia salina* foram realizados de acordo com metodologia proposta por Meyer et al. (1982), com adaptações, que consiste na mistura de 23 g de NaCl, 11 g de MgCl₂.6H₂O, 4 g de Na₂SO₄, 1,3 g de CaCl₂.2H₂O e 0,7 g de KCl, completando-se o volume para 1 L com água destilada e ajustando-se o pH para 9, utilizando uma solução de Na₂CO₃. Esta solução preparada foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia* e no preparo das demais diluições.

Os ovos foram colocados para eclodir em um béquer contendo a solução salina preparada e mantidos sob aeração e iluminação constantes, a 25° C por um período de 48 horas. Após a eclosão dos cistos, dez náuplios de *Artemia sp* foram transferidos para tubos contendo a solução de Meyer e o efluente industrial em diferentes diluições (1,5%, 3,1%, 6,2%, 12,5%, 25% v / v). Os ensaios foram realizados em triplicata, com iluminação artificial e temperatura constante a 25° C, durante 48 horas, sendo o controle negativo em solução salina conduzido paralelamente.

Após o período de exposição foi efetuada a contagem do número de larvas mortas ou imobilizadas. Para cada concentração de efluente testado, foi calculado o valor médio da mortalidade. Com estes valores foi verificada a CL₅₀, através das curvas de toxicidade construídas (mortalidade em função da concentração do efluente) (LOPES; CAVASOTTO; ROCHA, 2012).

3.4 ENSAIOS EM INCUBADORA SHAKER DE BANCADA

3.4.1 Estudos preliminares

Os processos de descoloração por fungos, utilizando células vivas ou mortas, podem ser influenciados por diversos fatores e estão relacionados principalmente com as condições de crescimento celular e as características da solução do corante ou das águas residuárias. Qualquer que seja o modo de nutrição, os fungos devem absorver os nutrientes necessários para seu crescimento em um substrato disponível, ou em situações de condições adversas, encontrarem mecanismos para tal, destacando-se como principais fatores do crescimento, as fontes de carbono, nitrogênio, nutrientes essenciais, pH, temperatura, tempo de incubação e quantidade de oxigênio disponível (FU; VIRARAGHAVAN, 2001; ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010).

Baseados nestas informações, os primeiros ensaios propostos com *L. theobromae* MMPI, foram realizados em *shaker* de bancada, com o tempo de incubação de sete dias, a temperatura e agitação constantes, contendo apenas o efluente têxtil e o fungo, sem a adição de substratos e nutrientes, buscando avaliar ao final do processo o crescimento de biomassa e a possível descoloração do efluente em questão. Neste ensaio teste, foi verificado que não ocorreu o crescimento de biomassa e tampouco pôde ser observado mudanças visuais na coloração do efluente, sendo necessário incrementar ao sistema as condições favoráveis para o seu desenvolvimento, adicionando-se ao meio os macro e micronutrientes essenciais (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Considerando o fato de não terem sido encontrados relatos em trabalhos anteriores sobre a capacidade de remoção de cor e tratamento de efluentes têxteis utilizando o fungo *L. theobromae* MMPI, a escolha das variáveis experimentais foram feitas levando em consideração as condições de crescimento deste fungo observadas em estudos anteriores. As demais variáveis que não foram selecionadas e que poderiam influenciar no sistema foram fixadas durante todo o experimento.

Os ensaios preliminares foram realizados em batelada, duplicata, sendo conduzidos em frasco erlenmeyer de 250 ml contendo 90 ml da solução sintética preparada do corante (item 3.2), suplementado com os sais $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g L^{-1} , K_2HPO_4 2 g L^{-1} , acrescido de sacarose comercial (açúcar) e nitrato de amônio conforme a Tabela 2. O efluente sintético preparado foi autoclavado a 121° C durante 15 minutos, resfriado a temperatura ambiente, encaminhado para cabina de fluxo laminar (VECO, FUV-09) adicionado o inóculo padronizado (10% (v / v), conforme descrito no item 3.1.1) e acondicionado em *shaker* de bancada, mantendo-

se agitação orbital a 125 RPM, temperatura constante a 28° C e tempo de incubação para retirada das amostras de 72 horas. Em todas as determinações o pH do meio foi previamente ajustado para 7,0.

Tabela 2 – Concentração de nutrientes utilizados nos experimentos preliminares

Experimento	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g L ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	Sacarose (g L ⁻¹)	NH ₄ NO ₃ (g L ⁻¹)
I	2	2	40	*
II	2	2	*	2
III	2	2	40	2

3.4.2 Planejamento de experimentos

O estudo de remoção de cor do corante sintético em *shaker* de bancada ocorreu de acordo com os procedimentos experimentais descritos no item 3.4.1. A partir dos ensaios preliminares, foram investigadas as influências das variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação nas respostas, sendo utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três fatores (k=3) e cinco níveis, resultando em 17 ensaios: o planejamento fatorial 2^k (08 ensaios), os pontos axiais 2k (06 ensaios) e três repetições no ponto central (GILONI-LIMA, et al. 2010). As variáveis empregadas foram à concentração de sacarose [X₁], a concentração de nitrato de amônio [X₂] e a velocidade de agitação [X₃] (RPM). Os níveis e os fatores independentes foram selecionados com base nos valores obtidos nos experimentos preliminares e podem se observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Níveis e fatores estudados no Delineamento Composto Central Rotacional

Variáveis Independentes	Unid.	Símbolo	Níveis codificados e reais				
			-α	-1	0	+1	+ α
Sacarose	g L ⁻¹	X ₁	5	20	40	60	75
Nitrato de amônio	g L ⁻¹	X ₂	0,1	0,7	1,5	2,3	2,9
Velocidade de agitação	RPM	X ₃	35	80	125	170	215

O valor de alfa foi calculado e ajustado em função do número de variáveis independentes (k=3) através da Equação 1:

$$\alpha = (2^k)^{1/4} = 1,68 \quad (1)$$

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar numericamente a qualidade de ajuste dos modelos matemáticos obtidos (Equação 2). Os resultados experimentais foram avaliados utilizando o programa *Statistica 8.0* e a análise gráfica foi feita através de Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) (SCARMÍNIO; BRUNS, 2002; GILONI-LIMA et al., 2010; NETO).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 + e \quad (2)$$

Onde:

Y = resposta das variáveis

b_0, b_1, b_2 = coeficientes de regressão

x_1, x_2 = variáveis em estudo

3.4.3 Determinação de Cor

Segundo Giordano (1999), a cor da água pode ser medida basicamente por três métodos, baseados na comparação visual: colorímetros com calibração interna; leitura de absorvância em espectrofotômetro utilizando a curva de calibração com padrões de Platina (PT); leitura direta por comparação de padrões de lentes coloridas. Existem diversas metodologias que foram padronizadas com o propósito de determinação de cor águas residuárias e efluentes. Para se medir de forma absoluta a cor em efluentes industriais, é necessário o conhecimento prévio do comprimento de onda na qual ocorre a maior absorvância.

Dessa forma, a partir das varreduras espectrais realizadas entre os comprimentos de onda de 190 a 1100 nm, o comprimento de onda utilizado para análise de descoloração correspondeu ao pico de maior absorvância em 622 nm.

Ao final do período de tratamento, as amostras foram retiradas, centrifugadas durante vinte minutos e o sobrenadante utilizado para leituras. A descoloração do corante sintético e do efluente ocorreu com a diminuição do valor de absorvância no comprimento de onda determinado e a porcentagem de descoloração, calculada através da Equação 3 (GUPTA; TRIPATHI; HARSH, 2011).

$$\% \text{descoloração} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \quad (3)$$

Sendo que:

$\text{Abs}_{\text{controle}}$ – valor da absorvância encontrada da solução referência

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$ – valor da absorvância encontrada após o tratamento

3.4.4 Determinação de Biomassa

A quantidade de biomassa produzida foi determinada gravimetricamente após ser centrifugada (100 mL) durante 20 minutos em 3500 RPM e separada do efluente sintético ou efluente, lavada com água, recuperada por centrifugação, sendo encaminhada para estufa de secagem a 50° C até obtenção de massa constante. O resultado obtido foi determinado pela diferença da massa inicial e final, convertido em gramas por litro, conforme Equação 4.

$$\text{Biomassa final (g L}^{-1}\text{)} = \text{massa (antes secagem)} - \text{massa (após secagem)} \times 10 \quad (4)$$

3.4.5 Determinação de Exopolissacarídeo (EPS)

O biopolímero produzido (EPS) foi determinado por gravimetria conforme descrito por Stelluti et al. (2004) com adaptações. Após a remoção da biomassa por meio de centrifugação, tomou-se uma alíquota de 10 ml do sobrenadante em proveta de 50 ml, adicionando-se 30 ml de etanol 92,8° GL, sendo mantido refrigerado por 24 horas. O precipitado recuperado foi filtrado e encaminhado para estufa de secagem a 50° C até obtenção de massa constante. O resultado obtido foi determinado pela diferença da massa inicial e final, convertido em gramas por litro, conforme Equação 5.

$$\text{EPS final (g L}^{-1}\text{)} = \text{massa (antes secagem)} - \text{massa (após secagem)} \times 100 \quad (5)$$

3.4.6 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática de lacase foi realizada concomitante com o tratamento do efluente sintético nos testes realizados em incubadora orbital *shaker* e em biorreator, de acordo com protocolo descrito por Cunha et al., (2003). A quantificação foi realizada após separação da biomassa celular por centrifugação, adicionando-se ao sobrenadante o substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), em pH 3,0, tampão citrato-fosfato 120 mM, temperatura de ensaio de 50° C e tempo reacional de 5 minutos.

3.5 ENSAIOS EM BIORREATOR

Após análise dos resultados obtidos para remoção de cor do efluente sintético nos experimentos realizados em incubadora orbital *shaker*, os ensaios foram realizados em biorreator de bancada (Biostat B, B. Braun C. Germany),

utilizando uma cuba com volume útil de 5 litros. O meio foi suplementado com sacarose, nitrato de amônio e velocidade de agitação definidas pelos ensaios do item 3.4.2. O volume de trabalho utilizado foi de 4 litros, com temperatura de 28° C e aeração de 0,8 vvm constantes durante o processo.

As amostras do efluente sintético preparado foram retiradas em intervalos de tempo de 24 horas por um período de sete dias, buscando avaliar a influência do tempo de retenção hidráulica sobre a remoção de cor, DQO e fenóis totais. Os resultados obtidos de produção de biomassa e EPS foram determinados de acordo com procedimentos descritos nos itens 3.4.4 e 3.4.5. A determinação da atividade enzimática (item 3.3.6) e a variação de pH do efluente sintético preparado foram avaliadas diariamente em intervalo de tempo de 24 horas. Posteriormente o mesmo estudo cinético sobre a descoloração do efluente sintético foi realizado com o efluente bruto industrial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS ULTRAVIOLETA VISÍVEL

As análises de espectrofotometria ultravioleta visível possibilitam visualizar a redução de concentração de um corante em solução, assim como alterações nos espectros dos corantes. A absorbância relativa determinada a partir da espectrofotometria UV-Vis possibilita a identificação de indícios de biodegradação.

De acordo com Glen e Gold (1983) um composto apresenta sinais de biodegradação quando os valores de absorbância relativa dos tratamentos variam muito em relação à absorbância relativa do controle. Isso ocorre porque as absorbâncias das amostras nos comprimentos de onda considerados, não diminuem nas mesmas proporções. Porém, no caso das absorbâncias relativas se manterem constantes, o processo predominante pode ser a biossorção, não havendo mudança na estrutura do corante. Para melhor avaliar estas colocações, foram realizadas varreduras espectrais da solução do corante preparado em diversas diluições (100, 75, 50, 25, 12,5 e 6,2%) as quais geraram os espectros apresentados na Figura 6.

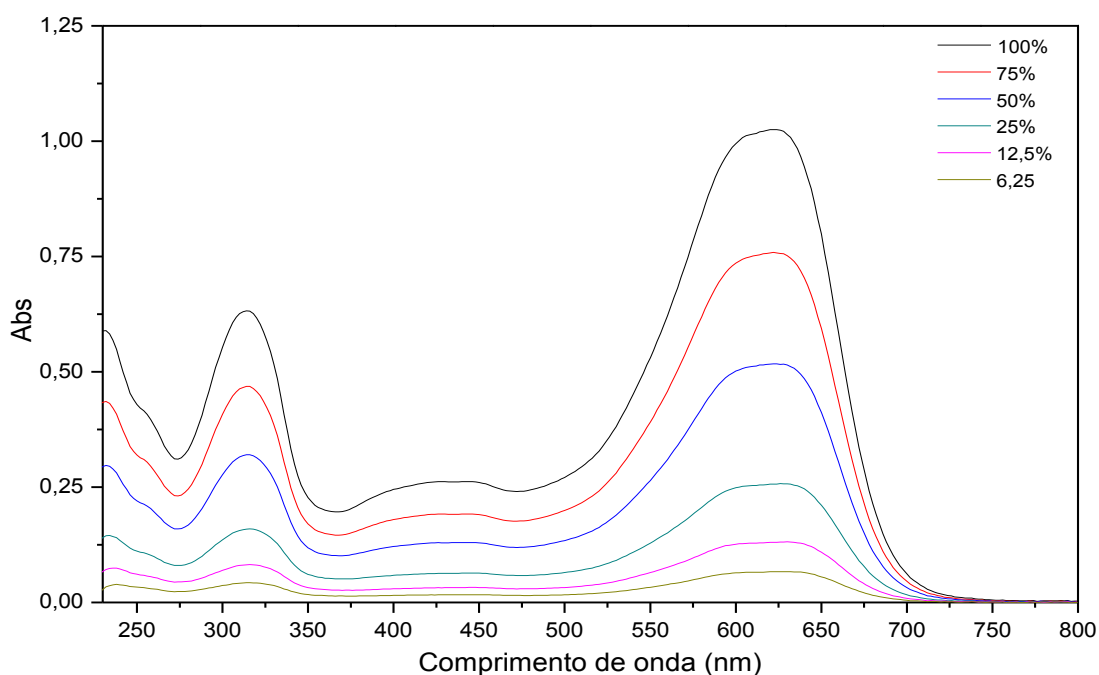


Figura 6 – Espectro de absorção ultravioleta visível do corante sintético preparado em diferentes concentrações (100, 75, 50, 25, 12,5 e 6,25%).

Pouquíssimos espectros eletrônicos são reproduzidos na literatura científica, a maioria é descrita por indicações de comprimento de onda de máxima absorção e absorvidades dos principais picos de absorção (PAVIA et al., 2010). Através da análise do espectro da solução do corante azul reativo preparado foi possível identificar o comprimento de onda de maior absorção em 622 nm e outro pico característico em 313 nm, conforme pode ser observado na Figura 6.

Por vezes, é difícil extrair muitas informações apenas de um espectro UV. Isto se torna mais útil quando já se tem, pelo menos, uma ideia geral da estrutura; contudo várias generalizações podem servir para guiar o uso dos dados UV. Essas generalizações são muito mais relevantes quando combinadas com dados de infravermelho e de RMN – que podem, por exemplo, identificar com certeza grupos carbonila, sistemas aromáticos, grupo nitro e outros importantes grupos cromóforos. Porém, na ausência de dados de infravermelho ou RMN, algumas suposições podem ser feitas, com base nas absorções de cromóforos isolados simples (PAVIA et al., 2010).

De acordo com Pedrosa (2009) o surgimento de uma cor em determinada substância se deve à existência ou à formação, na molécula, de um ou mais grupos cromóforos, sendo necessário que estes sejam ligados a substância rica em átomos de carbono. Introduzindo-se um cromóforo na molécula de um composto aromático a absorção se realiza na direção da parte visível do espectro e se obtém uma substância mais ou menos colorida, perceptível ao olho humano.

O corante azul reativo utilizado nestes estudos é classificado como um corante azo, que em sua estrutura geralmente apresenta pelo menos um grupo azo, mas pode conter dois, três, quatro ou até mais grupamentos, que estão ligados a estruturas aromáticas, como o benzeno e naftaleno (MUKESH, 2005). Diante do fato de não se conhecer exatamente a estrutura do corante utilizado, atribuiu-se a forte absorbância na região do visível (575 a 650 nm) a parte cromófora da molécula enquanto os compostos aromáticos aparecem na região UV (190 a 380 nm) (SILVERSTEIN et al. 1994 apud SANTOS; 2011).

Os valores de absorbância relativa referentes às curvas espectrais da Figura 6 foram determinados pela razão entre os picos máximos de absorção do corante sintético na região do ultravioleta visível e estão apresentados na Figura 7.

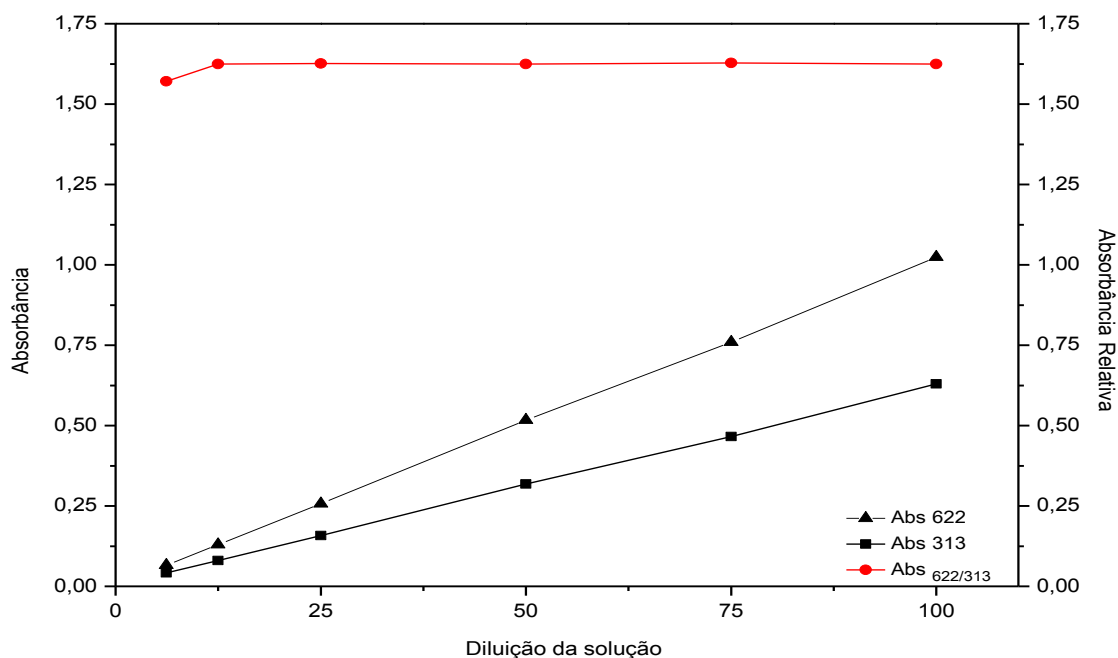


Figura 7– Absorbâncias do efluente sintético diluído (100, 75, 50, 25, 12,5 e 6,2%) em 622 nm -▲- e 313 nm -■- e absorbância relativa para cada diluição A 622/313 -●-.

Conforme pode ser observado, as absorbâncias relativas referentes às diluições do efluente sintético mantiveram-se constantes para qualquer proporção. De maneira geral este resultado já era esperado, considerando que o efluente sintético não foi submetido a nenhum tipo de tratamento. Estes dados serviram para corroborar as colocações feitas anteriormente.

4.2 TESTES DE ESTABILIDADE EM FUNÇÃO DO PH

Apesar de a absorção de radiação ultravioleta resultar na excitação de elétrons do estado fundamental, os núcleos que os elétrons unem em ligações têm um papel importante na determinação de quais comprimentos de onda da radiação são absorvidos. Quando ocorrem alterações estruturais em um cromóforo, espera-se que a energia exata e a intensidade da absorção sejam alteradas de acordo (PAVIA et al. 2010).

A ligação de grupos substituintes no lugar do hidrogênio, em uma estrutura básica de um cromóforo altera a posição e a intensidade de uma banda de absorção

do cromóforo. Pode ser que os grupos substituintes não gerem, eles mesmos, a absorção da radiação ultravioleta, mas sua presença modifica a absorção do cromóforo principal (PAVIA et al. 2010).

O objetivo deste teste foi verificar se a mudança de pH do meio, e conseqüentemente a presença de grupos hidroxila ou H^+ pudessem modificar a estrutura e / ou a intensidade de absorção do corante estudado. Como pode ser observado na Figura 8, o espectro de absorção do corante reativo não sofreu alterações em condições de neutralidade e também em condições ácidas (os espectros abaixo de pH 6,5 foram retirados do gráfico para melhor visualização), permanecendo inalterado. Em contrapartida em valores mais elevados de pH (8,5 e 12,5) foi constatado uma mudança na absorvidade e um deslocamento no comprimento de onda de maior absorção. Isto foi atribuído aos chamados auxocromos, ou seja, substituintes que alteram a intensidade de absorção e possivelmente o comprimento de onda. Entre os auxocromos típicos, estão os grupos metila, hidroxila, alcoxi, halogênio e amina (PAVIA et al. 2010).

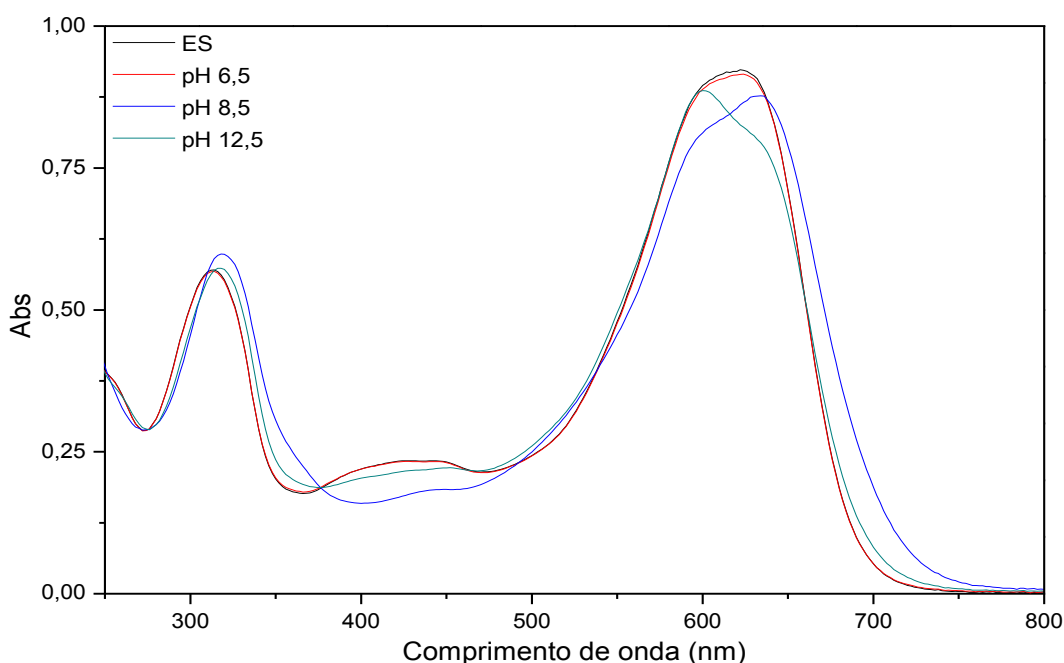


Figura 8 – Espectro de absorção ultravioleta visível do corante reativo em solução em diferentes valores de pH — ES, — pH 6,5 — pH 8,5 — pH 12,5.

Comparando os espectros nos diferentes valores de pH, percebe-se que a solução referência (ES) e em pH 6,5 os valores de absorvidade (0,919 e 0,915) e comprimento de onda (622 e 616 nm), respectivamente, permaneceram praticamente inalterados. Em pH 12,5 observa-se um deslocamento hipsocrômico, caracterizado pela diminuição do comprimento de onda em que ocorre a maior absorção da molécula do corante (600 nm, abs – 0,886). Da mesma maneira, em pH 8,5 também ocorreu uma pequena mudança na absorvidade e comprimento de onda, sendo descrito como um deslocamento batocrômico (comprimento de onda maior, 634 nm, abs - 0,877).

Estes resultados indicam que pequenas variações estruturais podem ocorrer na molécula do corante reativo quando modifica-se o pH do meio para valores mais elevados, deslocando assim o espectro de absorção e provavelmente interferindo na cor.

4.3 CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE TÊXTIL

A qualidade do efluente gerado nas etapas de produção industrial foi caracterizada mediante a escolha de alguns parâmetros indicadores de poluição considerados mais significativos e serão discutidos individualmente, de acordo com os resultados obtidos na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição física e química do efluente têxtil

Parâmetros	unid.	Resultados	Limite de Lançamento**
Demanda Química de Oxigênio – DQO	mg L ⁻¹	659	50
Demanda Bioquímica de Oxigênio – DBO ₅ dias	mg L ⁻¹	328	200
pH	-	5,15	5 a 9
Nitrogênio Amoniacal Total	mg L ⁻¹	2,24	20
Fenóis Totais	mg L ⁻¹	6,64*	0,5
Turbidez	NTU	37	-
Cloretos	mg L ⁻¹	362	-
Sulfato	mg L ⁻¹	51,67	-
Sólidos Totais	mg L ⁻¹	1187	-
Sólidos Sedimentáveis	mL L ⁻¹	3,5	1
Sólidos Dissolvidos Totais	mg L ⁻¹	862	-
Sólidos Suspensos Totais	mg L ⁻¹	474	-
Condutividade	µS/cm 25 ^o C	808	-

* compostos fenólicos totais expressos como equivalentes ácido gálico

** De acordo com os padrões de lançamento de efluente líquidos industriais, art. 34 da Resolução 357/2005 e Anexo 7 - Resolução CEMA 070/2009 (BRASIL, 2006; PARANÁ, 2013).

Em uma primeira análise observou-se que o efluente foi caracterizado por valores elevados de DBO_5 (328 mg L^{-1}) e DQO (659 mg L^{-1}), indicando a presença de uma quantidade significativa de material orgânico. Em seu trabalho sobre a remoção de cor e nitrificação de efluentes têxteis, Tunussi e Sobrinho (2003) obtiveram valores entre 205 e 415 mg L^{-1} para o parâmetro DBO_5 e resultados entre 515 a 1800 mg L^{-1} de DQO. Trombini e Dói (2012), obtiveram valores entre 270 mg L^{-1} e $1219,94 \text{ mg L}^{-1}$ de DQO, semelhantes aos resultados aos obtidos neste trabalho.

Conceitualmente a DBO_5 , indica a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica biodegradável, mediante processos bioquímicos aeróbicos, por um período de incubação de cinco dias, a 20° C . Por outro lado a DQO (que também determina o nível de oxigênio existente no meio) é o resultado da oxidação da matéria orgânica e inorgânica através de um oxidante químico extremamente forte. Estes parâmetros em conjunto podem ser muito úteis para indicar a biodegradabilidade de um efluente ou despejo industrial. Quanto mais o valor da DBO_5 se aproximar da DQO, significa que maior é a biodegradabilidade do despejo (CETESB, 2009).

Neste contexto, apesar da amostra em questão ser constituída por diversos compostos descritos na literatura como recalcitrantes e tóxicos, o efluente apresentou-se com potencial para o tratamento biológico, pois a fração biodegradável elevada sugere este tipo de tratamento como uma opção. Os níveis elevados de DBO_5 podem estar associados à presença de detergentes, sabões, amido e outros compostos orgânicos biodegradáveis oriundos das etapas de lavagem de vestuário. Os valores de DQO indicam que além das impurezas obtidas nas etapas de lavagem, o processo de tingimento contribui com a elevação deste parâmetro, incorporando as águas residuárias os corantes e demais aditivos utilizados nesta etapa produtiva. A DQO pode ainda ser um indicador de substâncias capazes de consumir oxigênio, tais como $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$, $\text{Mg}^{2+}_{(\text{aq})}$, $\text{NH}_4^+_{(\text{aq})}$ e elevados teores de cloretos (Fenzl (1988) apud Machado (2006)). A análise dos resultados de DBO_5 e DQO sob o aspecto legal para o descarte deste efluente em corpo receptor, se encontram em desacordo com padrão de lançamento exigido pela legislação vigente no estado do Paraná, redigida pela Resolução 070/2009 do Conselho Estadual do Meio Ambiente, fixadas em 50 mg L^{-1} (DBO_5) e 200 mg L^{-1} (DQO) (PARANÁ, 2013).

O valor de pH relativamente baixo da amostra coletada (5,15) difere dos valores obtidos na grande maioria dos trabalhos descritos na literatura. Geralmente as águas residuárias de indústrias têxteis possuem uma elevada alcalinidade oriunda da grande quantidade de alcalinizantes utilizadas na fixação dos corantes. Entretanto, grandes variações no pH final do efluente podem ocorrer devido a mudanças no processo produtivo. Semelhante aos resultados obtidos nesta pesquisa, Ntulli et al. (2009) observaram valores de pH entre 5,2 e 11,8. Apesar do pH do efluente estar situado dentro da faixa de lançamento previsto na legislação brasileira que estabelece valores entre 5 a 9, a proximidade do valor limite inferior, sugere a correção desta acidez a valores próximos a neutralidade (BRASIL, 2006).

O elevado teor de sólidos sedimentáveis presentes no efluente é resultado do material particulado originado de pedaços de tecidos, jeans e abrasivos. Estes valores estão acima do limite permitido pela legislação para o descarte em corpo receptor, fixado em 1 mL L^{-1} (BRASIL, 2006). Similarmente, os valores de sólidos dissolvidos totais (862 mg L^{-1}) foram atribuídos a presença de sais dissolvidos, utilizados em grande quantidade nas etapas de produção, como os sulfatos, sódio, carbonatos e os cloretos (NIEWEGLOWSKI, 2006). Estes sais, quando dissociados no meio aquoso na forma de íons, expressam a condutividade elétrica, e, segundo a Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina (Fatma) (1998), existe a possibilidade de estabelecer uma correlação entre a quantidade de sólidos dissolvidos e a condutividade da amostra, onde $1000 \mu\text{S / cm}$ correspondem a cerca de 1000 mg L^{-1} de sólidos dissolvidos. Neste caso, o teor de sólidos dissolvidos totais (862 mg L^{-1}) foi semelhante aos valores de condutividade da amostra ($808 \mu\text{S / cm}$) o que vai de encontro com a correlação proposta.

De acordo com Sen e Demirer (2003), um efluente têxtil típico deve apresentar em sua composição um teor de cloretos de aproximadamente 550 mg L^{-1} , valores acima dos encontrados nesta pesquisa (362 mg L^{-1}), os quais encontram-se fora dos valores exigidos para rios de classe II, fixados em 250 mg L^{-1} (BRASIL, 2006; CETESB, 2009). A presença do íon Cl^- é característico de efluentes têxteis e está associado à grande quantidade de cloreto de sódio utilizado para fixação do corante ao tecido. Neste sentido, de acordo com dados informados pela empresa, são utilizados cerca de 40% de cloreto de sódio em peso de roupa seca.

O efluente apresentou baixos valores de nitrogênio total ($2,24 \text{ mg L}^{-1}$) e turbidez (37 NTU). Apesar da Resolução 357/05 do Conama não apresentar um

padrão de lançamento para o parâmetro turbidez, o teor de nitrogênio amoniacal total encontra-se dentro dos limites de descarte para efluentes líquidos industriais (20 mg L^{-1}). Cabe salientar, que grande quantidades de nitrogênio, podem contribuir com os processos de eutrofização em rios e lagos e sempre que possível é importante minimizar o aporte deste nutriente nos ambientes aquáticos, de forma a não contribuir para a proliferação excessiva de algas e conseqüentemente o desequilíbrio do ambiente (VON SPERLING, 1996).

O teor de fenóis presentes no efluente ($6,64 \text{ mg L}^{-1}$) encontra-se acima do padrão de lançamento exigido pela legislação brasileira (valor $0,5 \text{ mg L}^{-1}$). Estes compostos caracterizados pela presença de hidroxila (OH^-) ligada a um anel benzênico e que fazem parte da composição de diversos efluentes industriais, estão diretamente ligados a estrutura química dos corantes utilizados em indústrias têxteis e devem ser tratados corretamente antes do descarte no meio ambiente.

O efluente apresentou visualmente intensa coloração azul, a qual pode ser atribuída à presença de corantes oriundos dos processos de tingimento e lavagem do jeans. O espectro de varredura ultravioleta visível ilustrado na Figura 9 demonstra que a maior absorção foi de 0,777 e ocorreu na região do espectro visível, em comprimento de onda de 674 nm.

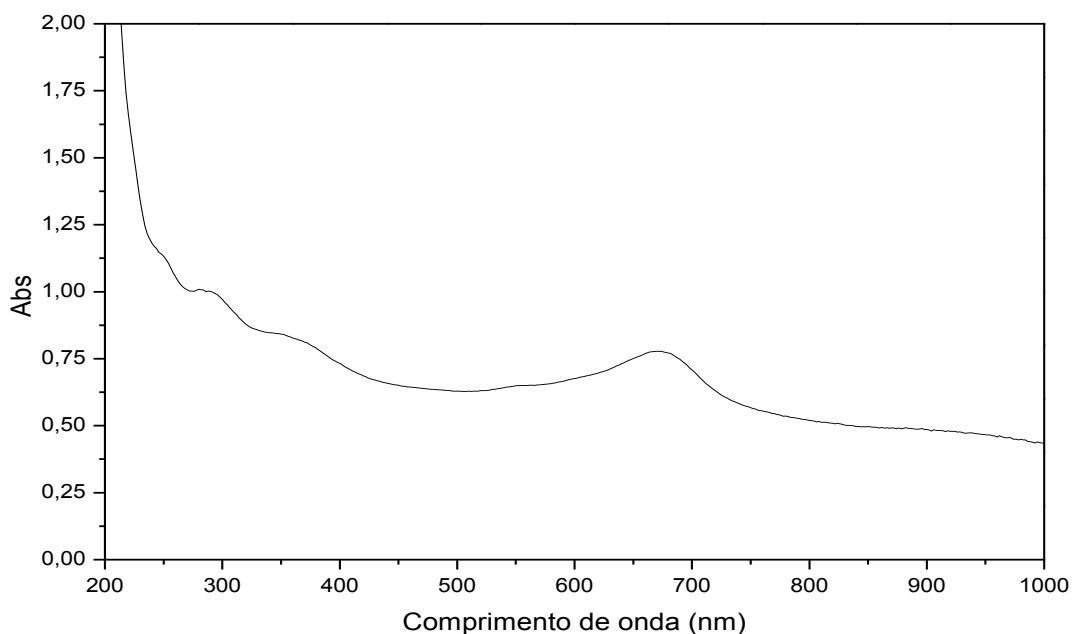


Figura 9– Espectro de absorção ultravioleta visível do efluente bruto industrial

De acordo com os resultados obtidos na caracterização deste efluente têxtil, os parâmetros de DQO, DBO₅, fenóis totais e sólidos sedimentáveis encontram-se em desacordo com padrões de lançamento em corpo hídrico, estipulados pela Resolução do Conama 357/05 e a Resolução 070/2009 do Conselho Estadual do Meio Ambiente (Cema), enquadrando-se dentro dos critérios exigidos apenas o valor de pH e nitrogênio amoniacal total. Os demais parâmetros avaliados, apesar da legislação vigente não estipular limites de lançamento – que geralmente são condicionados na licença de operação industrial – fornecem dados importantes para avaliação do potencial poluidor deste efluente, demonstrando a necessidade de tratamento adequado antes do descarte em corpo receptor (BRASIL, 2006; PARANÁ, 2013).

4.4 ENSAIOS EM INCUBADORA *SHAKER* DE BANCADA

4.4.1 Resultados preliminares

Os ensaios iniciais utilizando o fungo *L. theobromae* MMPI em meio líquido sintético tiveram o propósito de fornecer um ponto de partida e direcionamento das próximas etapas realizadas nesta pesquisa. O percentual de remoção de cor foi determinado comparando-se o valor de absorvância do efluente sintético bruto e do efluente sintético após o tratamento e centrifugação, no comprimento de onda de maior absorção (622 nm) obtido pela análise espectral do corante.

Conforme pode ser observado na Tabela 5, os testes iniciais com o corante azul reativo demonstraram que o fungo foi capaz de promover algum tipo de remoção de cor do efluente sintético preparado. É possível observar ainda uma variação no crescimento de biomassa e o decréscimo do valor de pH em todos os ensaios. A Figura 10 ilustra o aspecto visual do efluente no início e término do período de incubação de 72 horas.

Tabela 5 – Remoção de cor, biomassa produzida e pH final após 72 horas de tratamento

Experimento	Remoção de cor (%)		Média	Biomassa (g L ⁻¹)		Média	pH final		Média
I – AR*	40	43	41,5	2,16	1,93	2,04	3,68	3,65	3,66
II – AR*	30	27	28,5	0,73	0,65	0,69	3,70	3,86	3,78
III – AR*	93	89	91	4,97	3,99	4,48	3,40	3,25	3,32

*AR-Azul Reativo

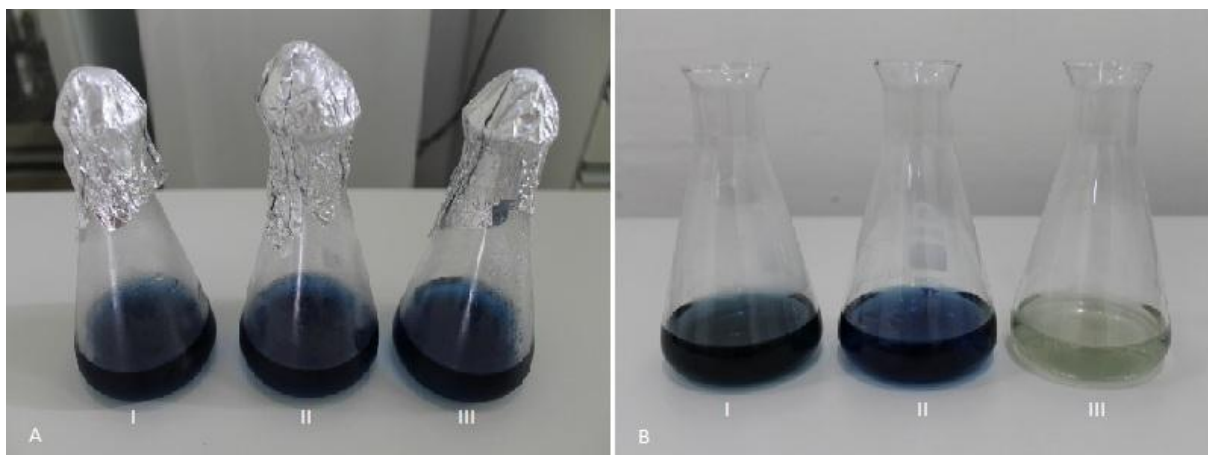


Figura 10 – Efluente sintético do corante Azul Reativo preparado a) antes do tratamento b) após o tratamento 72 horas.

De acordo com os dados da Tabela 5, a menor taxa de remoção de cor verificada (28,5%) ocorreu no experimento 2 que continha apenas o nitrato de amônio. Nestas condições, a quantidade de biomassa produzida também foi muito pequena em ambos os casos, 0,73 g L⁻¹ e 0,65 g L⁻¹, respectivamente. Este pequeno crescimento do fungo deve-se ao fato de que na ausência de carbono de fácil assimilação, que é um dos elementos químicos mais importantes e necessários para os microrganismos, o fungo não se desenvolveu de maneira adequada.

No resultado obtido no experimento 1 que continha sacarose, observou-se um aumento na remoção de cor pelo fungo para 41,5%. Com a adição de sacarose no meio e conseqüentemente o incremento de uma fonte de carbono de fácil assimilação, ocorreu também o aumento no crescimento do *L. theobromae* MMPI, produzindo ao final do processo 2,16 g L⁻¹ e 1,93 g L⁻¹ de biomassa, observando-se também um acréscimo de aproximadamente 13% na descoloração, comparando-se ao experimento 2.

Contudo, a melhor condição na remoção de cor ocorreu nos ensaios em que foram adicionados a sacarose e o nitrato de amônio. Nestes casos, a eficiência

média na remoção de cor foi de aproximadamente 91%. Além do aumento na remoção de cor, este experimento proporcionou um acréscimo significativo de biomassa fúngica produzida $4,97 \text{ g L}^{-1}$ e $3,99 \text{ g L}^{-1}$, dobrando a quantidade em relação ao experimento 1. Outra observação importante resultante deste ensaio é que nestas condições, o fungo *L. theobromae* MMPI foi capaz de produzir para o meio líquido uma pequena quantidade de EPS, não observada nos outros dois experimentos realizados.

Uma interpretação inicial destes resultados sugeriu que a adição em conjunto de uma fonte de carbono e nitrogênio, apresentou as melhores condições para remoção de cor do corante têxtil pelo fungo *L. theobromae* MMPI. Dessa forma, para uma melhor discussão dos resultados obtidos, a escolha dos níveis e variáveis experimentais do planejamento fatorial adotado, foi definida com base no experimento 3, buscando assim avaliar as possíveis interações e os efeitos de cada variável escolhida sobre a remoção de cor do efluente em questão.

4.4.2 Planejamento de experimentos

Neste planejamento experimental estudou-se como a remoção de cor, o crescimento de biomassa, a produção de EPS e o valor de pH são afetados pela concentração de sacarose [X_1], pela concentração de nitrato de amônio [X_2] e pela velocidade de agitação do meio [X_3]. O resultado da remoção de cor ao final do processo estudado anteriormente foi o requisito essencial para definição das variáveis e condições de tratamento do efluente sintético e efluente bruto industrial.

É importante destacar que o conhecimento e informação sobre a utilização do fungo *L. theobromae* MMPI avaliado nesta pesquisa como proposta para o tratamento de efluentes têxteis limitou-se as experiências e informações bibliográficas obtidas sobre o crescimento de biomassa e produção de EPS por este microrganismo.

Considerando ainda os diversos fatores envolvidos em sistemas de tratamento biológicos, foi necessário limitar as variáveis que a princípio poderiam influenciar na resposta. É fato bem conhecido que o desenvolvimento de um novo processo ou produto é, em geral, dependente de um grande número de variáveis e

muitas vezes é necessário mais de um delineamento experimental para se atingir o objetivo desejado (NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2002; RODRIGUES; IEMA, 2009).

Dessa forma, a partir dos testes preliminares, foram selecionados os fatores considerados mais importantes resultantes destes ensaios. As variáveis temperatura, pH inicial do meio, concentração de corante e tempo de incubação foram fixadas. Os diversos estudos que obtiveram resultados significativos com relação à variável tempo de incubação sobre a remoção de cor de corantes sintéticos também foram levados em consideração, e posteriormente após verificar os efeitos dos parâmetros selecionados sobre a variável resposta remoção de cor, foi realizado o estudo cinético da influência do tempo de incubação x descoloração do meio.

Tendo selecionado os fatores importantes, o próximo passo foi avaliar quantitativamente sua influência sobre a resposta de interesse e as possíveis interações de uns fatores com os outros através do planejamento fatorial.

A Tabela 6 apresenta a matriz do delineamento composto central, os níveis codificados, os valores reais correspondentes as configurações codificadas, as combinações de tratamento e as respostas de remoção de cor (RC), biomassa produzida (BIO), EPS e pH final.

Tabela 6 – Matriz do delineamento composto central, valores codificados, reais e respostas

Ensaio	Níveis codificados			Valores reais			RC (%)	BIO (g L ⁻¹)	EPS (g L ⁻¹)	pH
	X ₁	X ₂	X ₃	Sacarose (g L ⁻¹)	NH ₄ NO ₃ (g L ⁻¹)	Agitação (RPM)				
1	-1	-1	-1	20	0,7	80	45,92	1,18	0,96	3,02
2	1	-1	-1	60	0,7	80	88,11	2,95	1,92	2,62
3	-1	1	-1	20	2,3	80	50,64	1,18	1,44	2,99
4	1	1	-1	60	2,3	80	91,26	3,14	2,18	2,56
5	-1	-1	1	20	0,7	170	31,58	2,34	1,58	4,48
6	1	-1	1	60	0,7	170	73,48	7,61	9,70	3,06
7	-1	1	1	20	2,3	170	38,61	3,29	1,64	4,22
8	1	1	1	60	2,3	170	88,06	8,70	1,00	2,51
9	-1,68	0	0	5	1,5	125	63,65	0,40	0,91	3,49
10	1,68	0	0	75	1,5	125	91,60	5,40	2,78	2,31
11	0	-1,68	0	40	0,1	125	42,88	3,30	3,59	3,47
12	0	1,68	0	40	2,9	125	75,83	3,02	1,87	2,90
13	0	0	-1,68	40	1,5	35	76,88	2,33	2,00	2,77
14	0	0	1,68	40	1,5	215	78,55	4,31	3,10	2,95
15	0	0	0	40	1,5	125	85,53	3,62	0,66	2,52
16	0	0	0	40	1,5	125	87,12	3,48	0,75	2,58
17	0	0	0	40	1,5	125	85,95	3,94	0,87	2,47

RC – remoção de cor (%), BIO – biomassa produzida (g L⁻¹), EPS – exopolissacarídeo (g L⁻¹), pH – potencial hidrogeniônico.

De acordo com os resultados da Tabela 6 e o aspecto visual dos tratamentos realizados (Figura 11), a eficiência na remoção de cor variou de 31,58% (experimento 5) para 91,60% (experimento 10) e a produção de biomassa de 0,40 g L⁻¹ (ensaio 09) até 8,70 g L⁻¹ (ensaio 8). O menor e o maior resultado de produção de EPS observados, 0,66 g L⁻¹ e 9,70 g L⁻¹ ocorreram nos experimentos 15 e 6, respectivamente. Em termos de pH, os valores obtidos variaram entre 2,31 (experimento 10) e 4,48 (experimento 5). Observa-se também que os pontos centrais apresentaram uma pequena variação para todas as respostas analisadas, indicando uma boa repetibilidade do processo.

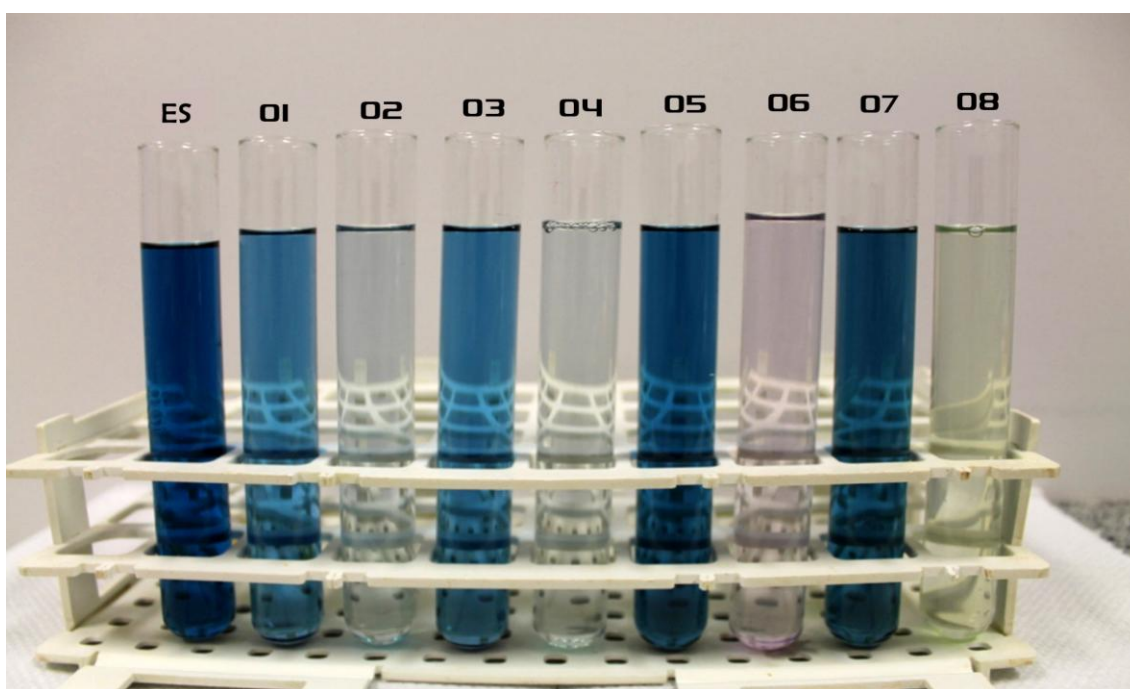


Figura 11 – Solução do corante sintético nos diferentes ensaios realizados de acordo com o planejamento central ES (efluente sintético)

A partir dos valores apresentados na Tabela 6 foi possível analisar estatisticamente o resultado de cada variável resposta, com base na evidência experimental da região estudada. Dessa forma para melhor compreensão do sistema, os efeitos de interação, os coeficientes de regressão e os modelos empíricos descritos serão discutidos a seguir.

4.4.2.1 Remoção de cor

Na Tabela 7 podemos observar os valores dos efeitos estimados, coeficientes de regressão, as interações com parâmetros significativos e não significativos, além do erro associado aos efeitos e aos coeficientes e o valor de p, para a variável dependente, remoção de cor. Na análise das estimativas dos efeitos foram considerados os fatores significativos para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os fatores que exerceram influência significativa estão destacados em negrito.

Tabela 7 – Efeitos, coeficientes de regressão e interações para a variável remoção de cor

Fatores	Efeitos	Erro efeitos	t_{calc}	p-valor	Coeficientes	Erro coeficiente
Média*	86,679	6,951	12,471	0,000*	86,679	6,951
Sacarose (L)* [X₁]	32,410	6,532	4,962	0,002*	16,205	3,266
Sacarose (Q) [X ₁]	-9,283	7,196	-1,290	0,238	-4,642	3,598
NH ₄ NO ₃ (L) [X ₂]	12,435	6,532	1,904	0,099	6,217	3,266
NH₄NO₃(Q)* [X₂]	-22,230	7,196	-3,089	0,018*	-11,115	3,598
RPM (L) [X ₃]	-6,067	6,532	-0,929	0,384	-3,034	3,266
RPM (Q) [X ₃]	-9,220	7,196	-1,281	0,241	-4,610	3,598
X ₁ X ₂	1,495	8,531	0,175	0,866	0,748	4,265
X ₁ X ₃	2,135	8,531	0,250	0,810	1,068	4,265
X ₂ X ₃	3,435	8,531	0,403	0,699	1,718	4,265

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

Este teste mostrou que para a variável resposta remoção de cor o efeito linear (L) da concentração de sacarose [X₁] e o efeito quadrático (Q) da concentração de nitrato de amônio [X₂] foram significativos com $p < 0,002$ (L) e $p < 0,018$ (Q) respectivamente. No entanto, a análise estatística mostrou que a interação entre os fatores foi insignificante em todos os casos ($p > 0,05$), assim como a variável velocidade de agitação [X₃]. Como resultado, apenas o efeito linear e quadrático dos fatores independentes [X₁] e [X₂] foram capazes de provocar variações consideráveis sobre a resposta. Utilizando os valores dos coeficientes da Tabela 7 foi possível gerar os modelos codificados que descrevem os processos de

remoção de cor do efluente sintético dentro das faixas estudadas e examiná-los em termos de qualidade do ajuste.

De acordo com Neto, Scarmínio e Bruns (2002), a maneira mais confiável para se avaliar numericamente a qualidade de ajuste de um modelo é através da Análise de Variância (ANOVA). Na Tabela 8 estão apresentados os valores resumidos da ANOVA de acordo com o delineamento proposto.

Tabela 8 – Análise de variância para a remoção de cor (RC)

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F _{calc}
Modelo	1	5699,12	5699,12	83,91
Resíduo	15	1018,80	67,92	
Total	16	6717,92		

$$R^2 = 0,8483; F_{\text{tab}} 0,05;1;15 = 4,54$$

Apesar da grande variabilidade inerente aos processos biológicos, o modelo foi considerado satisfatório por apresentar altos valores de regressão para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), indicando que 84,83% da variabilidade dos dados podem ser explicadas pelo modelo, sendo atribuído 15,17% para os resíduos. O valor de F_{calc} foi 18,48 vezes maior que o valor de F_{tab} , demonstrando que a regressão obtida não é apenas significativa, mas também, útil para fins preditivos (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

A Equação 6 apresenta a expressão matemática da concentração de sacarose e concentração de nitrato de amônio sobre a remoção de cor, considerando os parâmetros significativos e não significativos. A superfície de resposta e as curvas de contorno originadas desta equação encontram-se ilustradas na Figura 12. Neste caso, a variável velocidade de agitação [X_3] foi fixada no ponto central.

$$RC (\%) = 86,679 + 16,205 X_1 - 4,642 X_1^2 + 6,217 X_2 - 11,115 X_2^2 + 0,748 X_1 X_2 \quad (6)$$

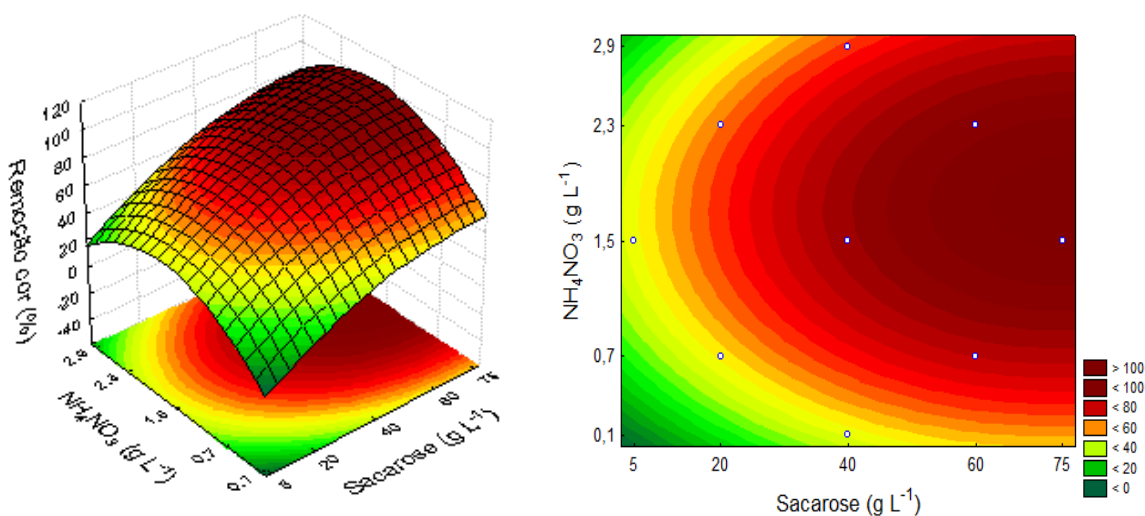


Figura 12 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 6, em função das variáveis independentes concentração de nitrato de amônio e concentração de sacarose.

A Equação 7 corresponde a Figura 13 e ilustra a superfície de resposta e as curvas de contorno relacionadas com a concentração de sacarose $[X_1]$ e a velocidade de agitação $[X_3]$, fixando-se a variável $[X_2]$ ao nível zero.

$$RC (\%) = 86,679 + 16,205 X_1 - 4,642 X_1^2 - 3,034 X_3 - 4,610 X_3^2 + 1,068 X_1 X_3 \quad (7)$$

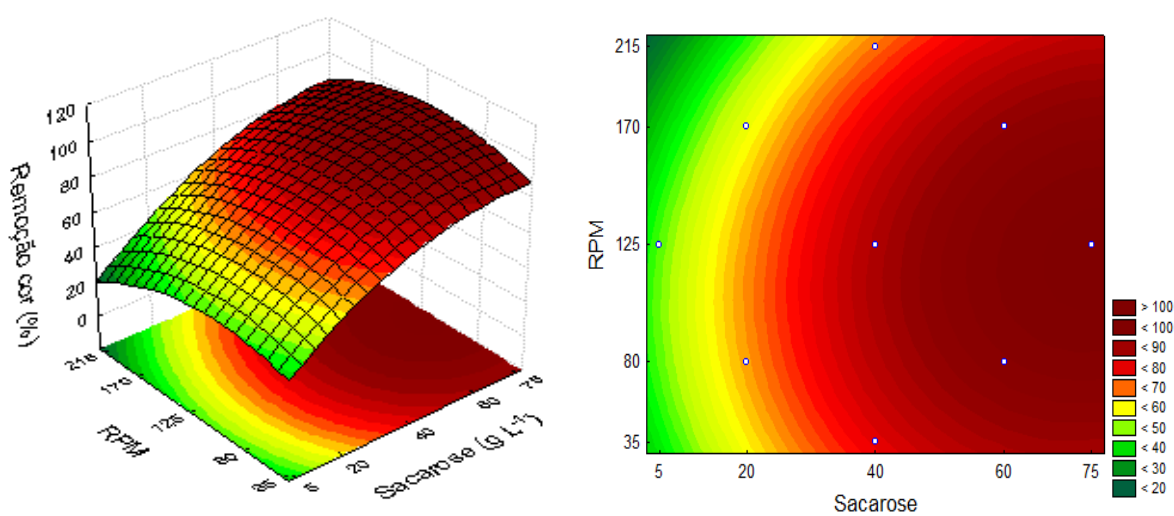


Figura 13– Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 7, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de sacarose.

As curvas de nível traçadas na Figura 12 e Figura 13 indicam que, de maneira geral, as melhores respostas para remoção de cor do efluente sintético foram obtidas nas concentrações de sacarose em valores entre 60 e 75 g L⁻¹. Esta ampla faixa de concentração utilizada (5 g L⁻¹ a 75 g L⁻¹) foi baseada na hipótese de que maiores concentrações de carbono como fonte de nutriente essencial para o desenvolvimento fúngico pudesse proporcionar um maior crescimento celular e como consequência, maior remoção de cor. Em contrapartida, baixos teores de carbono poderiam induzir o fungo a utilizar compostos mais complexos, sugerindo a degradação do corante através da produção de enzimas, por exemplo.

O que pôde se observar na Figura 12 é que a remoção de cor foi mais intensa quando a concentração de sacarose foi superior a 60 g L⁻¹ e em concentração de nitrato de amônio na faixa intermediária (1,5 g L⁻¹). A variável resposta foi influenciada negativamente pela concentração de nitrato de amônio no limite superior e inferior da faixa estudada, mostrando em ambos os casos uma tendência a diminuir. Da mesma maneira a velocidade de agitação (Figura 13) proporcionou menor eficiência na remoção de cor no nível superior e inferior do planejamento estudado, caracterizando uma maior descoloração na faixa de 125 RPM e em concentrações de sacarose acima de 60 g L⁻¹.

A Equação 8 corresponde às curvas de contorno e superfície de resposta da Figura 14 e representa o efeito da concentração de nitrato de amônio em sinergismo com a velocidade de agitação (RPM). Observando a superfície de contorno pode-se inferir que o maior percentual de redução de cor em relação ao controle, coincidentemente, foi obtido na faixa intermediária de ambas as variáveis. Este intervalo corresponde a valores próximos de 1,5 g L⁻¹ até 2,0 g L⁻¹ para a concentração de nitrato de amônio e 100 a 125 RPM para a velocidade de agitação.

$$RC (\%) = 86,679 + 6,217 X_2 - 11,115 X_2^2 - 3,034 X_3 - 4,610 X_3^2 + 1,718 X_2X_3 \quad (8)$$

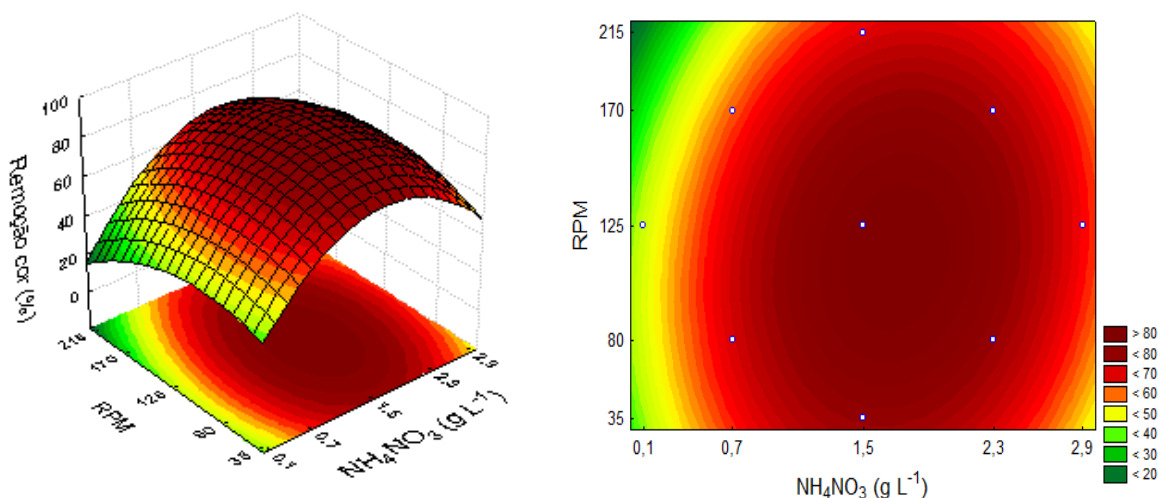


Figura 14 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 8, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de nitrato de amônio.

Analisando a Figura 12 que relaciona a concentração nitrato de amônio com a concentração de sacarose e a Figura 13 que mostra a interação entre a velocidade de agitação e a concentração de sacarose, pode-se observar que em ambas as situações a faixa para otimização do processo foi de encontro aos valores demonstrados na Figura 14. Portanto, esta é a faixa que satisfaz ambos os efeitos combinados, ou seja, é possível afirmar que para a maximização da remoção de cor do efluente sintético preparado, dentro da região experimental ensaiada a concentração de nitrato de amônio deve estar entre $1,5 \text{ g L}^{-1}$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$ e a velocidade de agitação entre 100 e 125 RPM.

Geralmente os valores dos níveis correspondentes ao ponto central são fixados na região onde se esperam obter os melhores resultados, para então se fazer uma análise nos demais níveis (PASTORE; HASAN; ZEMPULSKI; 2011). Esta suposição foi avaliada nos ensaios preliminares e confirmada através dos resultados deste planejamento fatorial, indicando que os valores escolhidos do ponto central para a concentração de nitrato de amônio e a velocidade de agitação estão situados em uma região de máxima remoção de cor.

Entretanto, não foi possível definir a faixa exata da concentração de sacarose que maximize a resposta, considerando que esta variável teve efeito linear, ou seja, quanto maior a concentração utilizada maior foi a resposta obtida. Esses

resultados sugerem que um deslocamento para uma nova região experimental pode ser realizado para valores acima do limite estudado.

De maneira geral foi possível concluir que as condições que mais contribuíram para a remoção de cor foram aquelas que utilizaram um teor de nitrogênio na faixa de $1,5 \text{ g L}^{-1}$, velocidade de agitação entre 100 e 125 RPM e a concentração de sacarose acima de 60 g L^{-1} . Contudo, para realização do estudo cinético em biorreator a escolha da concentração de sacarose foi fixada em 40 g L^{-1} , pelo fato de ter sido removido aproximadamente 86% da cor nestas condições, frente aos 91,6% (experimento 10).

Finalmente, através das equações geradas pelos ensaios foi possível realizar um novo experimento (triplicata) em condições diferentes dos níveis do planejamento, buscando a validação dos modelos obtidos ($1,0 \text{ g L}^{-1}$ nitrato de amônio, 30 g L^{-1} sacarose e 150 RPM), obtendo-se assim a média de remoção de cor de 73,8%. Considerando a Equação 8 a qual apresentou a maximização dos resultados, o valor predito pelo modelo da remoção de cor nestas condições é de 74,8%, que representa uma excelente correlação com o resultado observado, indicando aproximadamente 98,6% de exatidão. Dessa forma, os modelos gerados foram utilizados para executar as simulações da remoção de cor, conforme demonstrado na Figura 15 e Figura 16. Os gráficos de simulações das demais variáveis respostas encontram-se apresentados nos APÊNDICES (A a I).

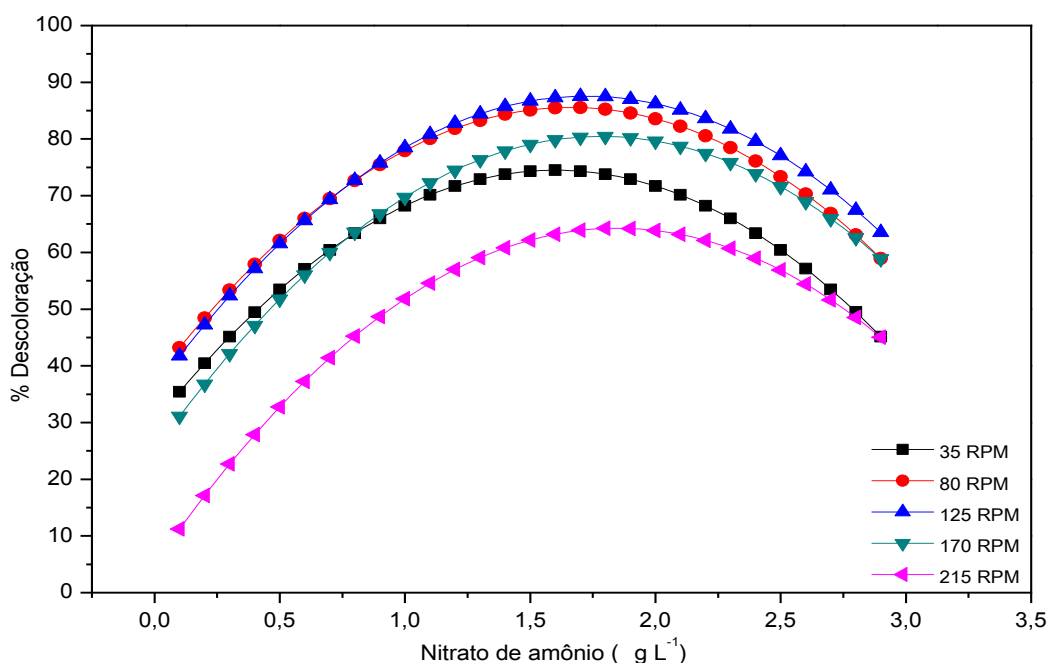


Figura 15 – Simulações de remoção de cor com base nos parâmetros do modelo que foram estimadas a partir dos dados experimentais.

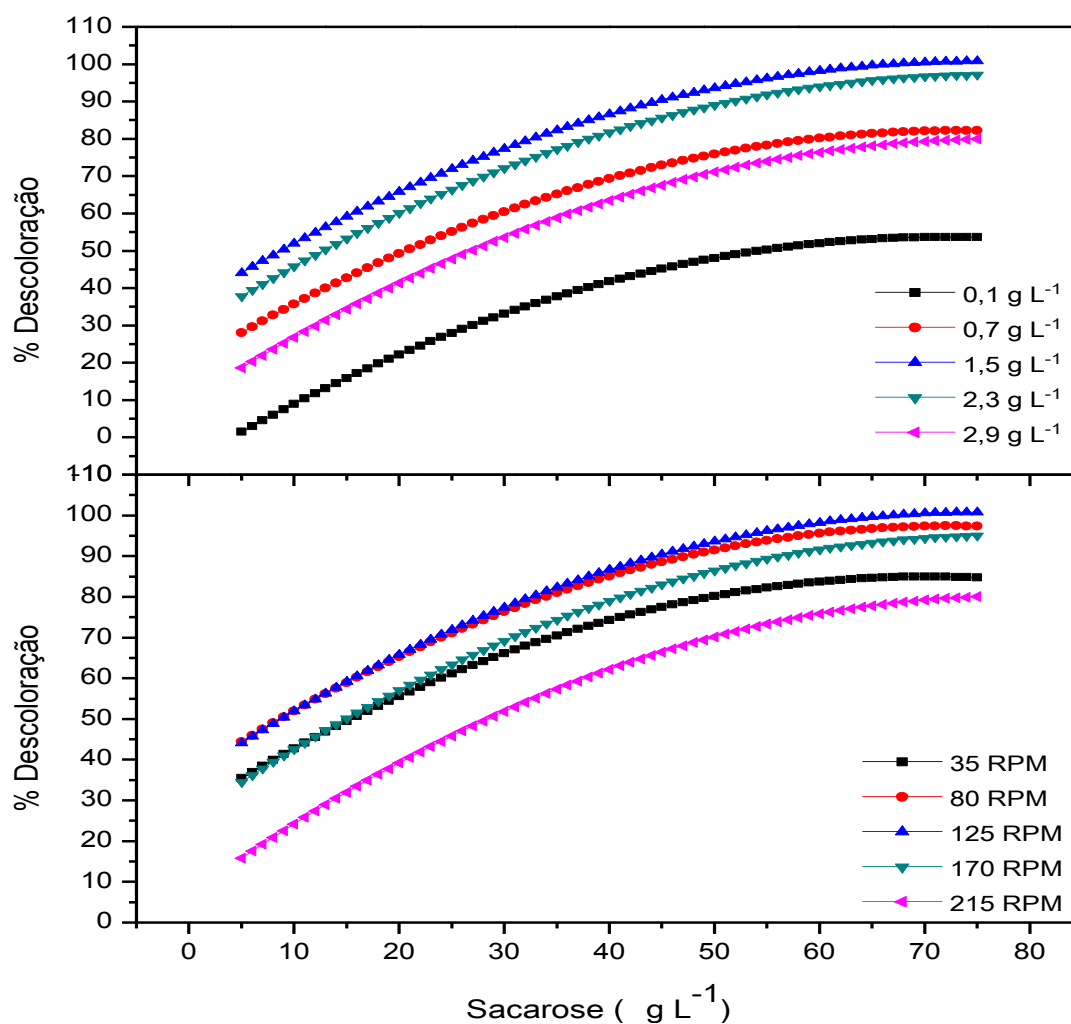


Figura 16 – Simulações de remoção de cor com base nos parâmetros do modelo que foram estimadas a partir dos dados experimentais.

4.2.2.2 Produção de biomassa

A Tabela 9 mostra os valores dos efeitos estimados, coeficientes de regressão, as interações com parâmetros significativos e não significativos, além do erro associado aos efeitos e aos coeficientes e o valor de p , para a variável dependente biomassa. Na análise das estimativas dos efeitos foram considerados os fatores significativos para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os fatores que exerceram influência significativa estão destacados em negrito.

Tabela 9 – Efeitos, coeficientes de regressão e interações calculadas para a variável biomassa

Fatores	Efeitos	Erro	t _{calc}	p-valor	Coeficientes	Erro coeficiente
Média	3,631	0,552	6,581	0,000	3,631	0,552
Sacarose (L)* [X₁]	3,341	0,518	6,445	0,000	1,671	0,259
Sacarose (Q) [X ₁]	-0,236	0,571	-0,414	0,692	-0,118	0,286
NH ₄ NO ₃ (L) [X ₂]	0,253	0,518	0,488	0,640	0,127	0,259
NH ₄ NO ₃ (Q) [X ₂]	-0,052	0,571	-0,090	0,930	-0,026	0,286
RPM (L)* [X₃]	2,466	0,518	4,756	0,002	1,233	0,259
RPM (Q) [X ₃]	0,061	0,571	0,107	0,917	0,031	0,286
X ₁ X ₂	0,084	0,677	0,124	0,905	0,042	0,339
X₁ X₃*	1,733	0,677	2,560	0,038	0,867	0,339
X ₂ X ₃	0,459	0,677	0,678	0,520	0,229	0,339

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Pela análise individual dos fatores da Tabela 9 pode-se observar que o efeito linear (L) da concentração de sacarose [X₁] mostrou-se altamente significativo (p<0,000) bem como o efeito linear (L) da variável velocidade de agitação [X₃] p<0,002. Novamente verifica-se que a concentração de sacarose exerceu efeito linear positivo sobre a variável resposta, semelhantemente ao resultado obtido para a remoção de cor. Neste caso, apenas o efeito de interação entre estes dois fatores [X₁X₃] apresentaram-se significativos sobre a produção de biomassa. A partir dos coeficientes da Tabela 9 foi possível gerar os modelos codificados para a variável produção de biomassa e avaliar a adequação dos modelos gerados a partir da ANOVA (Tabela 10).

Tabela 10 – Análise de variância para a produção de biomassa (BIO)

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F _{calc}
Modelo	2	65,69	32,85	71,41
Resíduo	14	6,42	0,46	
Total	16	72,11		

R² = 0,9110; F_{tab} 95% = 3,74

O elevado valor do coeficiente de correlação R² de 0,911 demonstra que 91,10% da variabilidade da resposta pode ser explicada pelo modelo indicando que a equação empírica proposta reproduz com fidelidade os resultados obtidos experimentalmente para o intervalo de confiança de 95% (p<0,05). O valor de F_{calc}

foi 19 vezes maior que o valor de F_{tab} , demonstrando que a regressão obtida não é apenas significativa, mas, útil para fins preditivos (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

A Equação 9 apresenta a expressão matemática da concentração de sacarose e a concentração de nitrato de amônio sobre a produção de biomassa, considerando os parâmetros significativos e não significativos. A superfície de resposta e as curvas de contorno originadas desta equação encontram-se ilustradas na Figura 17. Neste caso, a variável velocidade de agitação $[X_3]$ foi fixada no nível zero.

Como pode ser visto o aumento na concentração de sacarose teve influência positiva sobre a produção de biomassa, independente da concentração de nitrato de amônio utilizada. As curvas de nível da Figura 17 apresentam de maneira mais clara o efeito linear da concentração de sacarose sobre a produção de biomassa, caracterizando nestas condições maiores produções em valores mais elevados. Apesar de ser um dos elementos mais importantes (juntamente como carbono), constituindo aproximadamente 12 a 16% da matéria seca da biomassa fúngica (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010), neste caso a concentração de nitrato de amônio não exerceu influência significativa sobre o crescimento celular.

$$\text{BIO} = 3,631 + 1,671 X_1 - 0,118 X_1^2 - 0,127 X_2 - 0,026 X_2^2 + 0,042 X_1 X_2 \quad (9)$$

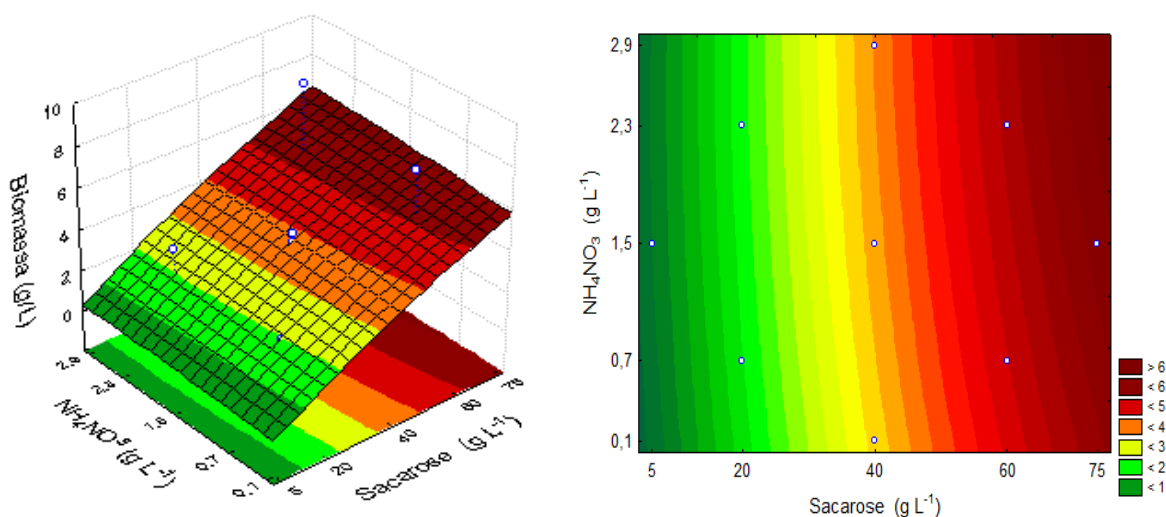


Figura 17 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 9, em função das variáveis independentes concentração de nitrato de amônio e concentração de sacarose.

A Equação 10 corresponde a Figura 18 e ilustra a superfície de resposta e as curvas de contorno relacionadas com concentração de sacarose $[X_1]$ e a velocidade de agitação $[X_3]$, fixando-se a variável $[X_2]$ ao nível zero.

$$\text{BIO} = 3,631 + 1,671 X_1 - 0,118 X_1^2 + 1,123 X_3 + 0,031 X_3^2 + 0,867 X_1 X_3 \quad (10)$$

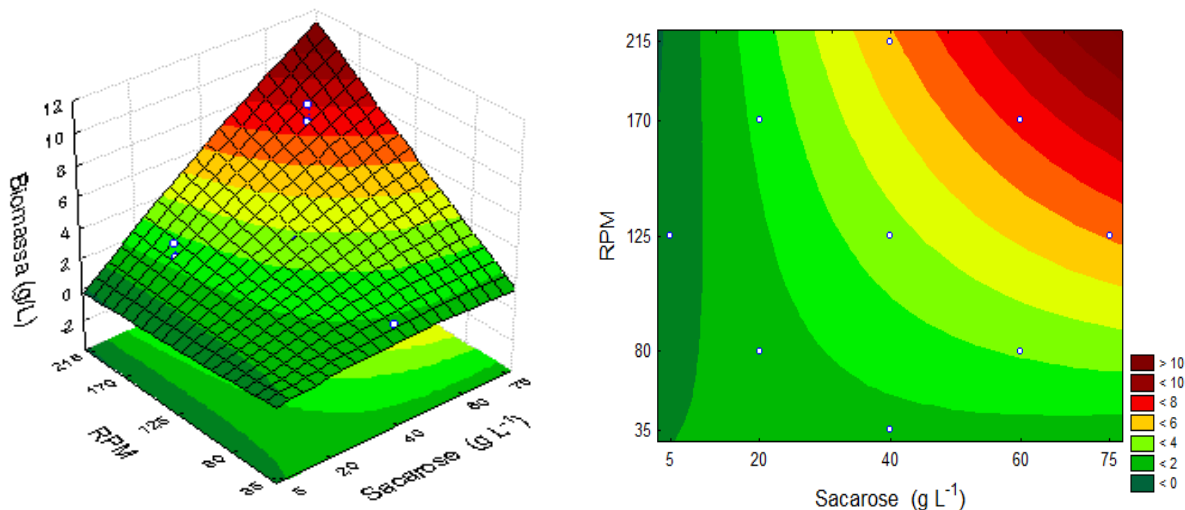


Figura 18– Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 10, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de sacarose.

A Equação 11 corresponde às curvas de contorno e superfície de resposta da Figura 19 e representa o efeito da concentração de nitrato de amônio e a velocidade de agitação (RPM).

$$\text{BIO} = 3,631 + 0,127 X_2 - 0,026 X_2^2 + 1,123 X_3 + 0,031 X_3^2 + 0,031 X_1 X_3 \quad (11)$$

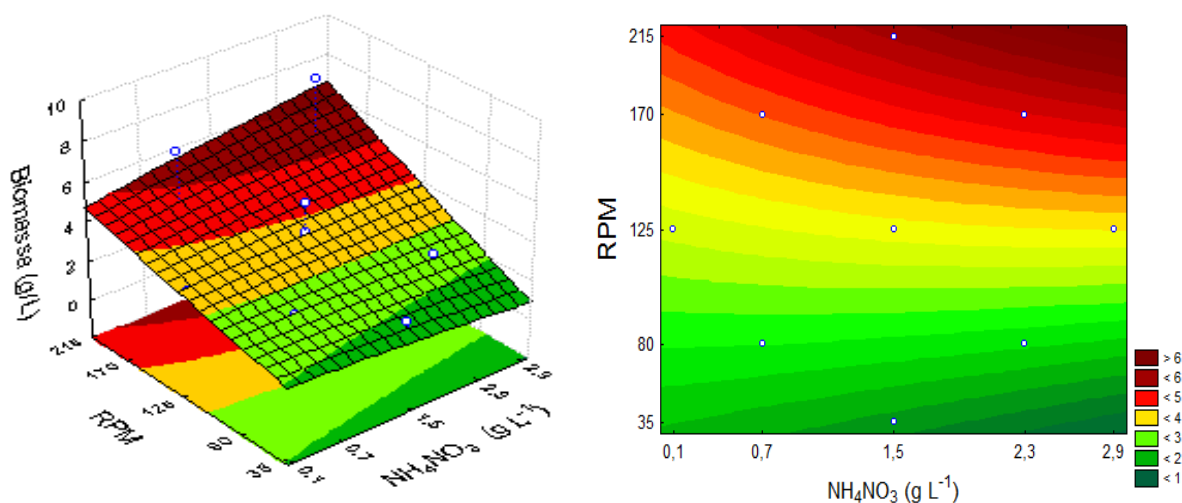


Figura 19– Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 11, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de nitrato de amônio.

Na análise das curvas de contorno e da superfície de resposta da Figura 19, é possível observar que quando o meio foi submetido a maiores velocidades de agitação - o que provavelmente aumentou o teor de oxigênio dissolvido - ocorreu um aumento de biomassa fúngica produzida, independente da concentração de nitrato de amônio utilizado. Outro aspecto observado foi o aumento na viscosidade do meio devido à produção de EPS, que pode ter contribuído para a redução de transferência de oxigênio as células microbianas e conseqüentemente a redução do crescimento celular.

Diferentemente dos resultados da variável remoção de cor, as superfícies de resposta obtidas para a produção de biomassa não sugerem uma região ótima dentro dos limites estudados. Apesar disso a concentração de biomassa obtida neste estudo foi semelhante a outros trabalhos utilizando o fungo *L. theobromae* (IVANOV et al. 2009; BARROSO; CUNHA, 2010; CUNHA et al. 2012).

4.2.2.3 Produção de EPS

A Tabela 11 mostra os valores dos efeitos estimados, coeficientes de regressão, as interações com parâmetros significativos e não significativos, além do erro associado aos efeitos e aos coeficientes e o valor de p, para a variável dependente produção de EPS. Na análise das estimativas dos efeitos foram considerados os fatores significativos para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os fatores que exerceram influência significativa estão destacados em negrito.

Tabela 11 – Efeitos, coeficientes de regressão e interações calculadas para a variável EPS

Fatores	Efeitos	Erro	tcalc	p-valor	Coeficientes	Erro coeficiente
Média	0,755	0,763	0,989	0,356	0,755	0,763
Sacarose (L)* [X₁]	1,805	0,717	2,516	0,040	0,903	0,359
Sacarose (Q) [X ₁]	0,806	0,790	1,020	0,342	0,403	0,395
NH ₄ NO ₃ (L) [X ₂]	-1,581	0,717	-2,204	0,063	-0,790	0,359
NH ₄ NO ₃ (Q) [X ₂]	1,432	0,790	1,811	0,113	0,716	0,395
RPM (L) [X ₃]	1,359	0,717	1,894	0,100	0,680	0,359
RPM (Q) [X ₃]	1,302	0,790	1,648	0,143	0,651	0,395
X1 X2*	-2,244	0,937	-2,395	0,048	-1,122	0,469
X1 X3	1,444	0,937	1,541	0,167	0,722	0,469
X2 X3*	-2,346	0,937	-2,504	0,041	-1,173	0,469

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

Da mesma forma que os resultados obtidos anteriormente para as outras duas variáveis resposta, observou-se que o efeito linear da concentração de sacarose também foi significativo ($p < 0,04$). Neste caso, a interação entre as variáveis $[X_1X_2]$ e $[X_2X_3]$ demonstraram-se significativas para o intervalo de confiança de 95%. O sinal negativo a frente dos coeficientes de interação destas variáveis demonstram que o efeito combinado destes fatores contribuiu para uma diminuição na produção de EPS. O modelo foi validado pela ANOVA (Tabela 12) onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,8287 (82,87%) e o F_{calc} foi de 9,0 vezes maior que o F_{tab} , os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas nos APÊNDICES J, K e L.

Tabela 12 – Análise de variância para a produção de EPS

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F_{calc}
Modelo	2	59,45	29,73	33,78
Resíduo	14	12,29	0,88	
Total	16	71,75		

$R^2 = 0,8287$; $F_{tab} 95\% = 3,74$

4.2.2.4 Variação de pH

A Tabela 13 apresenta os valores dos efeitos estimados, coeficientes de regressão, as interações com parâmetros significativos e não significativos, além do erro associado aos efeitos e aos coeficientes e o valor de p , para a variável dependente, valores de pH. Na análise das estimativas dos efeitos foram considerados os fatores significativos para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os fatores que exerceram influência significativa estão destacados em negrito.

Tabela 13 – Efeitos, coeficientes de regressão e interações calculadas para a variável pH

Fatores	Efeitos	Erro	tcalc	p-valor	Coeficientes	Erro coeficiente
Média	2,512	0,163	15,442	0,000	2,512	0,163
Sacarose (L)* [X₁]	-0,872	0,153	-5,703	0,001	-0,436	0,076
Sacarose (Q) [X ₁]	0,344	0,168	2,041	0,081	0,172	0,084
NH ₄ NO ₃ (L) [X ₂]	-0,271	0,153	-1,775	0,119	-0,136	0,076
NH₄NO₃(Q)* [X₂]	0,544	0,168	3,230	0,014	0,272	0,084
RPM (L)* [X₃]	0,498	0,153	3,258	0,014	0,249	0,076
RPM (Q) [X ₃]	0,315	0,168	1,873	0,103	0,158	0,084
X1 X2	-0,081	0,200	-0,407	0,696	-0,041	0,100
X1 X3*	-0,576	0,200	-2,886	0,023	-0,288	0,100
X2 X3	-0,181	0,200	-0,908	0,394	-0,091	0,100

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

A Tabela 13 demonstra que para a variável resposta pH o efeito linear (L) da concentração de sacarose [X₁] e velocidade de agitação [X₃] apresentaram-se significativos para o intervalo de confiança de 95%, assim como o efeito quadrático (Q) da concentração de nitrato de amônio [X₂] e a interação entre as variáveis [X₁X₃]. Os efeitos de interação [X₁X₂], [X₂X₃], o efeito quadrático de [X₁] e o efeito linear de [X₃] não foram significativos.

Utilizando os coeficientes da Tabela 13 foram gerados os modelos codificados e avaliados a partir da ANOVA (Tabela 14), onde se obteve um coeficiente de correlação R² 0,9062 (90,62%).

Tabela 14 – Análise de variância para os valores de pH (pH)

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F _{calc}
Modelo	3	5,41	1,80	0,08
Resíduo	13	0,56	23,21	
Total	16	5,97		

R² = 0,9062; F_{tab} 95% = 3,41

A Equação 12 apresenta a expressão matemática da concentração de sacarose e concentração de nitrato de amônio em função dos valores de pH. A superfície de resposta e as curvas de contorno originadas desta equação encontram-se ilustradas na Figura 20. Novamente, a variável velocidade de agitação [X₃] foi fixada no nível zero.

$$\text{pH} = 2,512 - 0,436 X_1 + 0,172 X_1 - 0,136 X_2 + 0,272 X_2 - 0,041 X_1 X_2 \quad (12)$$

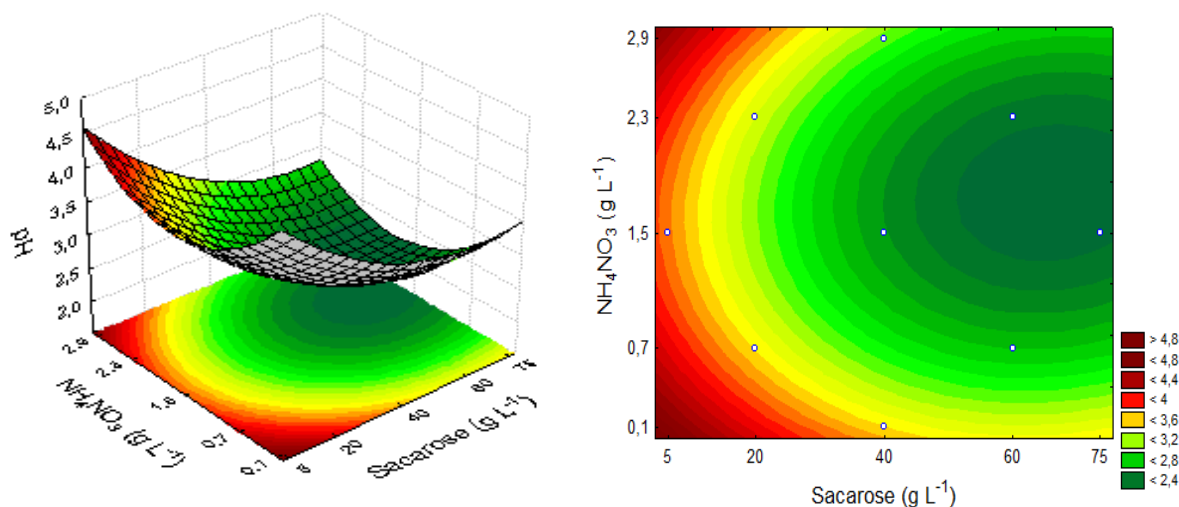


Figura 20– Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 12, em função das variáveis independentes concentração de nitrato de amônio e concentração de sacarose.

A Figura 20 mostra que a região correspondente aos menores valores de pH encontram-se situados em maiores quantidades de sacarose e em concentração de nitrato de amônio situada na faixa aproximada de 1,5 e 2,0 g L⁻¹. Esta diminuição de pH do efluente sintético preparado pode ser devido a produção de ácidos orgânicos produzidos durante os processos de metabolismo fúngico (COHRANE, 1963 apud ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010).

Outro fator que pode ter induzido a redução de pH do meio foi a fonte de nitrogênio orgânica utilizada. Segundo Espósito e Azevedo (2010) qualquer que seja a fonte de nitrogênio adicionada em um meio, em última instância, deve ser gerada por via enzimática NH₄⁺ ou NH₃ para poder se assimilada. Quando fungos crescem em meio contendo NH₄NO₃, ocorre um aproveitamento diferenciado de ambos os íons. Enquanto a utilização de NO₃⁻ precisa da indução de uma NO₃ redutase, a absorção de NH₄⁺ se produz constitutivamente, ocorrendo maior utilização deste íon frente ao NO₃⁻, explicando em parte a queda do pH.

A Equação 13 corresponde a Figura 21 e ilustra a superfície de resposta e as curvas de contorno relacionadas com concentração de sacarose [X₁] e a velocidade de agitação [X₃], fixando-se a variável [X₂] ao nível zero.

$$\text{pH} = 2,512 - 0,436 X_1 + 0,172 X_2 + 0,249 X_3 + 0,158 X_3 - 0,288 X_1 X_3 \quad (13)$$

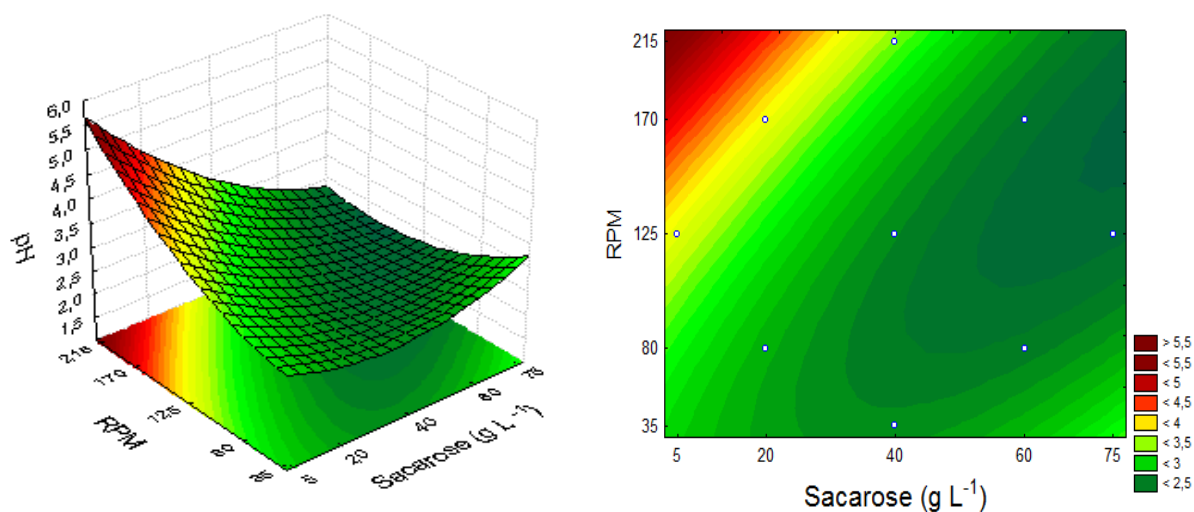


Figura 21– Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 13, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de sacarose.

A Equação 14 corresponde às curvas de contorno e superfície de resposta da Figura 22 e representa o efeito da concentração de nitrato de amônio e a velocidade de agitação (RPM), sendo fixada a concentração de sacarose no nível zero.

$$\text{pH} = 2,512 - 0,136 X_2 + 0,272 X_2 + 0,249 X_3 + 0,158 X_3 + 0,249 X_2 X_3 \quad (14)$$

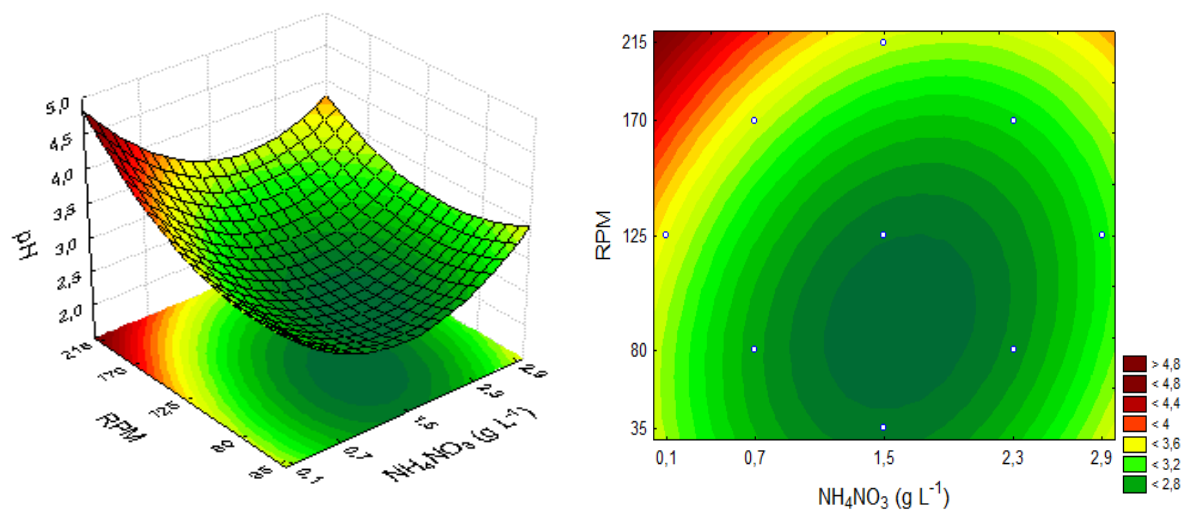


Figura 22– Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação 14, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de nitrato de amônio.

Conforme pode ser observado na Figura 22 os menores valores de pH obtidos nestes ensaios encontram-se situados na região intermediária de nitrato de amônio e em valores mais baixos de velocidade de agitação. Neste caso, a faixa de concentração de nitrato de amônio que resultou nos menores valores de pH situou-se em $1,5 \text{ g L}^{-1}$ e velocidade de agitação entre 40 e 125 RPM. Da mesma maneira que na análise da variável resposta remoção de cor, foi possível observar uma região ótima para a variável resposta pH. Contudo, ao contrário da remoção de cor, onde se encontrou um ponto de maximização da resposta, neste caso, observou-se uma região de mínimo.

As formas iônicas do corante em um meio aquoso e a carga elétrica da superfície da biomassa são dependentes do pH da solução. A interação entre um corante e o bioadsorvente é afetada principalmente por estados de ionização dos grupos funcionais da molécula de corante e a superfície da biomassa. Uma vez que a molécula do corante pode apresentar diversas cargas negativas quando em solução aquosa, os sítios positivos da biomassa fúngica se tornam favoráveis a bioadsorção do corante. Entretanto, em condições alcalinas, a diminuição da capacidade de bioadsorção pode ocorrer devido ao aumento do número de cargas negativas, distribuídas na superfície da biomassa fúngica, que resultaria em repulsão eletrostática entre o adsorvente e moléculas de corante (BAYRAMOGLU; ÇELIK; ARICA, 2006; XIONG; MENG; ZHENG, 2010).

A análise em conjunto das curvas de nível e superfície de resposta da Figura 14 (item 4.4.2.1) e a Figura 22 demonstram um comportamento bastante semelhante e de certa forma, sugestivo, com relação aos processos de remoção de cor do efluente sintético. Ao que tudo indica, a maior eficiência de descoloração da solução corante ocorreu em menores valores de pH. Isto pode ser suposto analisando a faixa da região ótima observada para a remoção de cor contrastando com a região de mínimo obtida para os valores de pH.

4.2.2.5 Atividade enzimática

Apesar de alguns autores mencionarem em seus estudos a presença de enzimas extracelulares produzidas por *L. theobromae* (lacase, celulase, protease,

urease), nas condições dos ensaios experimentais deste planejamento fatorial não foi observado à produção de lacase em nenhum dos tratamentos realizados. (VASCONCELOS et al. 2001; SALDANHA; 2009).

Da mesma forma que Taskin e Erdal (2010), o presente estudo demonstrou que o crescimento dos fungos e a descoloração do efluente sintético ocorreram apenas quando uma fonte de carbono e nitrogênio estava disponível no meio de crescimento. Quando o meio contém fontes de carbono e nitrogênio de fácil assimilação, os microrganismos preferem estes compostos em vez de corantes ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010). O fato é que neste estudo, não se observou qualquer crescimento de biomassa ou a descoloração das soluções preparadas quando o corante foi usado como única fonte de carbono e de nitrogênio (ensaios preliminares).

Dessa forma, atribuiu-se a remoção de cor do efluente sintético preparado basicamente a fixação do corante a biomassa produzida, que apresentou-se bastante colorida ao final do período de incubação (Figura 23).

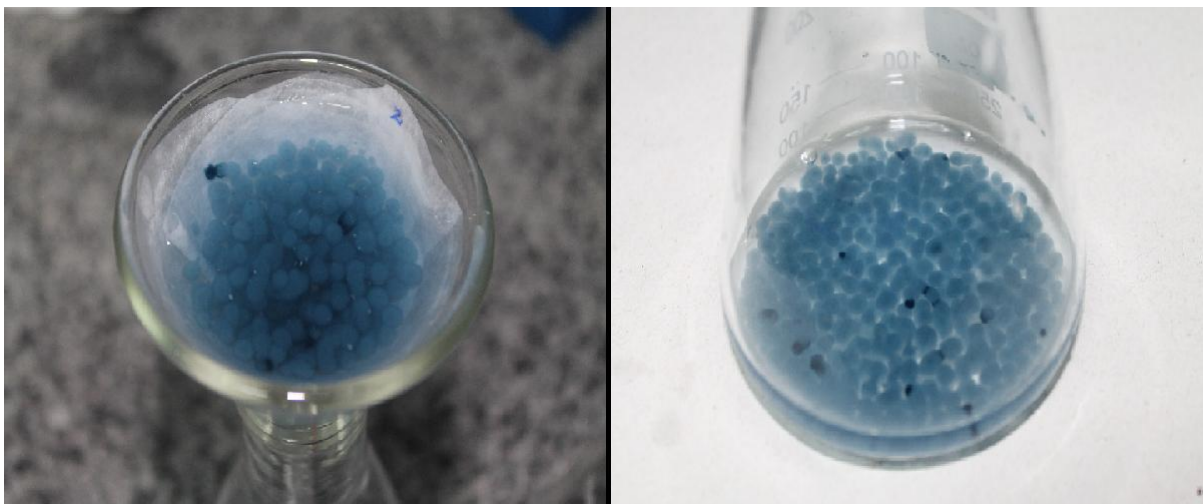


Figura 23– Biomassa fúngica *L. theobromae* MMPI após o tratamento

A suposição de que a lacase estaria atuando diretamente sobre as estruturas fenólicas por meio da oxidação destes compostos foi refutada diante da falta de atividade de lacase nos ensaios do planejamento fatorial. As diferentes condições nutricionais e principalmente de agitação do meio proporcionaram características diferentes na morfologia fúngica. Em condições de agitação mais

elevadas observou-se que os *pellets* formados eram menores e mais finos, ao passo em que menores rotações ocorreram o contrário. Esta mudança na característica da biomassa proporciona diferentes superfícies de contato e quando vinculada a descoloração, pode influenciar diretamente na remoção de cor da solução. Vale ressaltar ainda, que nem sempre a maior quantidade de biomassa promoveu maior eficiência na remoção de cor das soluções preparadas.

Neste caso, maiores estudos deveriam ser feitos a cerca da capacidade de bioadsorção do fungo *L. theobromae* MMPI, avaliando os diversos fatores inerentes aos processos de bioadsorção, tais como a influência da temperatura, concentração inicial de corante e pH do meio, por exemplo. É importante salientar ainda que a capacidade de adsorção de biomassa pode ser aumentada quando são realizados alguns tratamentos físico-químicos como secagem, autoclavagem e a utilização de produtos químicos (KAUSHIK; MALIK, 2008).

4.5 ENSAIOS EM BIORREATOR

Nesta etapa da pesquisa, foram realizados os ensaios em biorreator de bancada com o objetivo de reproduzir o comportamento observado nos experimentos em incubadora orbital *shaker* e também avaliar a influência do tempo de retenção hidráulica sobre a remoção de cor, DQO, fenóis totais e atividade de lacase do efluente sintético preparado e do efluente bruto industrial. As condições experimentais foram definidas levando-se em consideração os melhores resultados da remoção de cor avaliados anteriormente sendo, portanto, o requisito essencial para definição destes valores.

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, o ponto máximo de remoção de cor ocorreu em concentrações mais elevadas de sacarose, concentrações de nitrato de amônio na faixa aproximada de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$ e velocidade de agitação acima de 80 RPM até valores próximos a 125 RPM. Dessa forma, optou-se por preparar o efluente sintético e o efluente bruto industrial suplementando-os com os sais $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g L^{-1} , K_2HPO_4 2 g L^{-1} , acrescido de 40 g L^{-1} de sacarose, $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de amônio, velocidade de agitação em 100 RPM, com temperatura ($28 \text{ }^\circ\text{C}$) e aeração (0,8 vvm) mantidas constantes durante o

tratamento. O tempo para retirada de amostras ocorreu a cada 24 horas com término do processo ao final de 168 horas (sete dias) para o efluente sintético e 192 horas (08 dias) para o efluente bruto.

4.5.1 TRATAMENTO DO EFLUENTE SINTÉTICO

4.5.1.1 Remoção de cor

O comportamento observado nas curvas da Figura 24 demonstra que houve uma eficiência de 94,8% de remoção do corante pelo fungo *L. theobromae* MMPI após 72 horas de incubação. Este resultado ratifica o comportamento observado em incubadora orbital *shaker*, que apresentou aproximadamente 86% de descoloração do efluente sintético nas condições intermediárias dos níveis estudados para o mesmo intervalo de tempo, exercendo também forte correlação com os valores preditos pelo modelo da Equação 8 (87%).

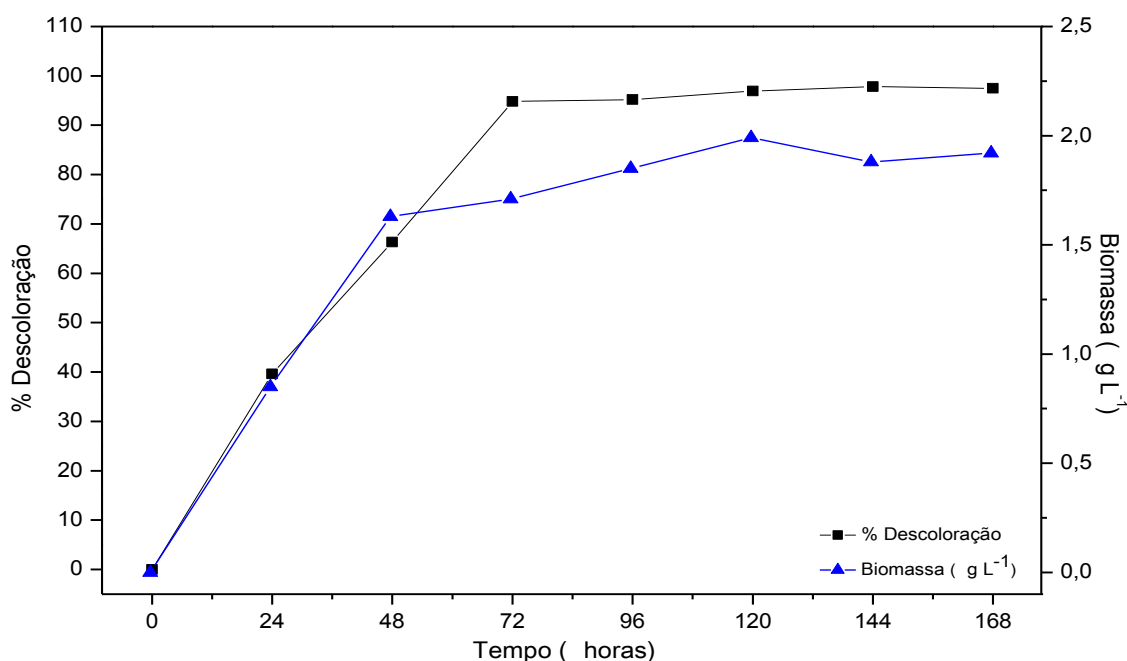


Figura 24– Porcentagem de descoloração do corante reativo em biorreator e produção de biomassa fúngica durante 07 dias de tratamento

De maneira geral, a curva de crescimento fúngica apresentou grande similaridade à curva de remoção de cor do efluente sintético. Durante as primeiras 48 horas ocorreu a maior variação no crescimento de biomassa produzindo-se aproximadamente $1,63 \text{ g L}^{-1}$. A partir de 72 horas os valores de biomassa permaneceram constantes, não sofrendo grandes variações até o final do período de tratamento ($1,92 \text{ g L}^{-1}$). Estes valores são semelhantes aos resultados obtidos por Taskin e Erdal (2010), que utilizaram *Aspergillus niger* para o tratamento e obtiveram 88% de descoloração do corante *Reactive Black-5* em $2,98 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa produzida.

Da mesma forma que nos ensaios do planejamento fatorial, não foi possível identificar a presença de lacase nas primeiras 96 horas de incubação. Contudo, nos últimos três dias de ensaios observou-se uma pequena atividade enzimática resultando em $0,0105 \text{ U / mL}$, $0,0338 \text{ U / mL}$ e $0,0563 \text{ U / mL}$ respectivamente. Geralmente na fase inicial de crescimento, os fungos consomem e se multiplicam em fontes de carbono prontamente disponíveis e então produzem metabólitos secundários e enzimas extracelulares (KAPDAM et al. 2000)

Estes resultados reforçam a hipótese levantada no planejamento fatorial de que o principal mecanismo de descoloração deste estudo ocorreu por meio da biossorção do corante a biomassa fúngica. Apesar do fungo ter produzido uma pequena quantidade de enzimas nos últimos dias de incubação, as maiores taxas de remoção de cor ocorreram nas primeiras 96 horas de tratamento, o que indica que não houve correlação entre a produção de lacase e a descoloração do meio, sendo portanto, atribuída esta eficiência ao crescimento celular e a fixação do corante no micélio. A Figura 25 apresenta o sobrenadante do efluente sintético após a centrifugação em diferentes níveis de tratamento, no intervalo do tempo zero a 168 horas.

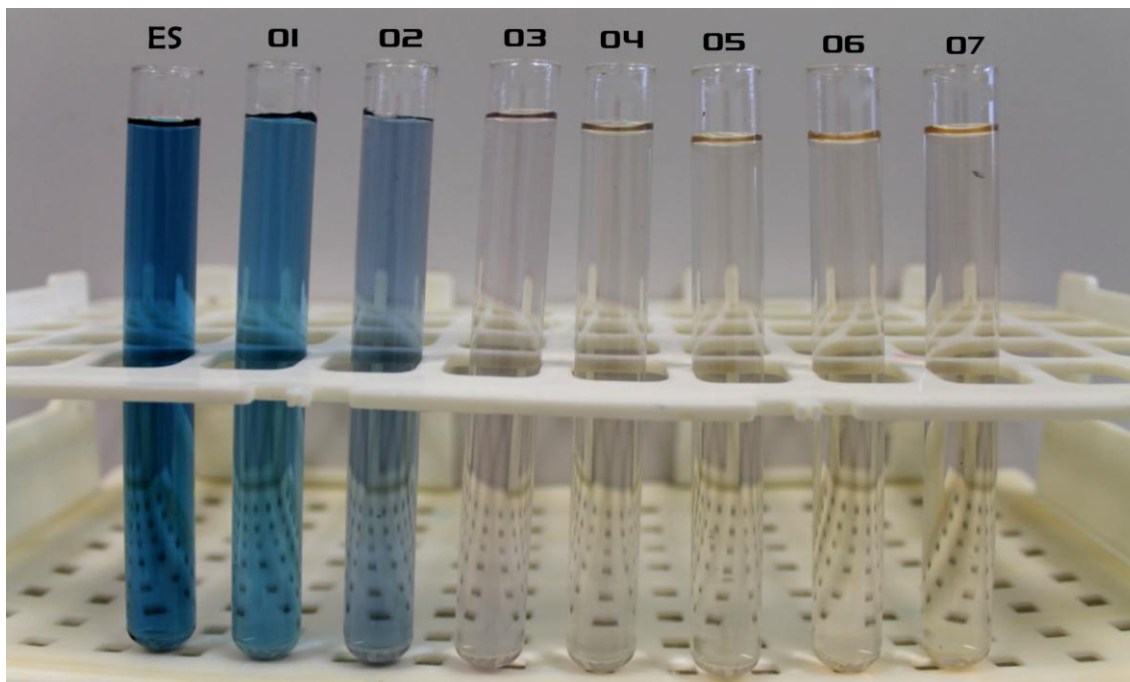


Figura 25– Solução controle do corante sintético (ES) e solução do corante após o período de tratamento em 24 h (1), 48 h (2), 72 h (3), 96 h (4), 120 h (5), 144 h (6) e 168 h (7).

O fato é que os processos de descoloração utilizando biomassa viva envolvem mecanismos bastante complexos e estão intimamente ligados as condições operacionais. A parede celular, constituída principalmente de polissacarídeos, proteínas e lipídeos, possui muitos grupos multifuncionais, possibilitando a interação através de processos físicos e químicos entre as moléculas do corante e estes grupos ativos da superfície celular (CRINI; 2005). Inclusive, alguns autores têm reportado que após o período de remoção e estabilização através de biossorção, as moléculas de corantes podem ser degradadas quando submetidas a longos períodos de tratamento (FU; VIRARAGHAVAN, 2001).

Embora tenham sido obtidos resultados expressivos e uma grande eficiência na remoção de cor do efluente sintético não se pode afirmar que esta descoloração está vinculada a degradação total do corante. Não obstante, os espectros de absorção originados nos diferentes tempos de tratamento (Figura 26) indicam que há uma variação da absorbância relativa das amostras quando comparadas ao controle (Figura 27). Esta variação sugere que a estrutura molecular do corante

pode ter sofrido alterações, mais evidente na faixa de comprimentos de onda abaixo de 350 nm, sendo possível que tenha ocorrido à degradação parcial deste corante.

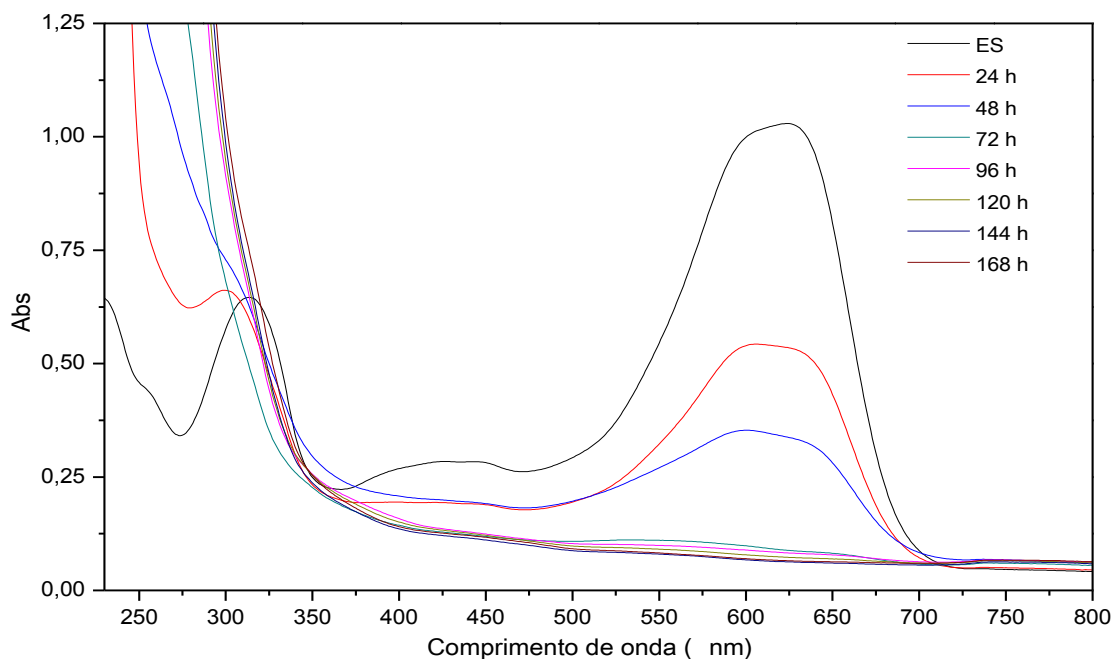


Figura 26– Espectros de absorção do corante reativo em solução após os diferentes tempos de tratamento ES (efluente sintético), 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h.

O gráfico demonstra também que a absorbância em 622 nm diminuiu gradativamente a cada intervalo de 24 horas, evidenciando que houve a remoção do corante em solução pelo fungo *L. theobromae* MMPI. Contudo, apesar da absorbância relativa fornecer indícios de biodegradação, este mecanismo só pode ser confirmado através de novas pesquisas, buscando avaliar a formação de compostos intermediários durante este processo.

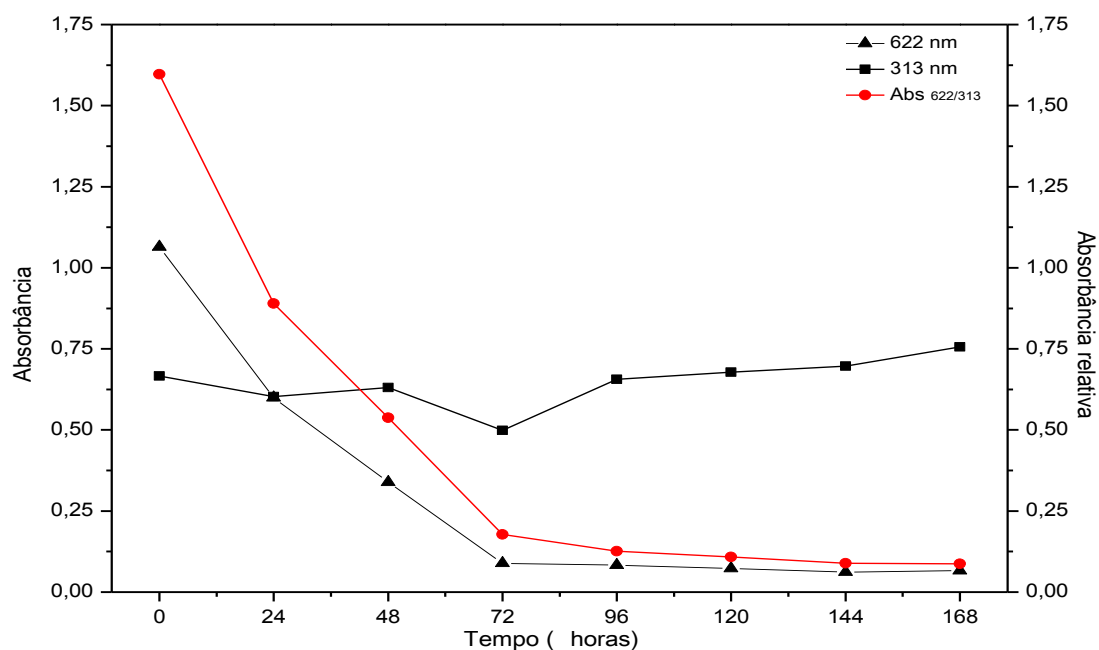


Figura 27 – Absorbância máxima do efluente sintético após os tratamentos (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h) em 622 nm -▲- e 313 nm -■- e a absorbância relativa para cada tratamento 622/313 -●-.

4.5.1.2 Determinação de DQO

Como pode ser visto no gráfico da Figura 28 o efluente sintético apresentou elevadas concentrações de DQO, tanto no início (44.430 mg L^{-1}) quanto ao término do processo de tratamento (18.180 mg L^{-1}). Este elevado teor de DQO pode ser atribuído a adição da sacarose a solução de corante e que provavelmente, durante o intervalo de tempo estudado não foi totalmente metabolizada pelo fungo *L. theobromae* MMPI. Apesar disso, ocorreu a redução de aproximadamente 60% da DQO inicial deste efluente durante o intervalo de tempo estudado.

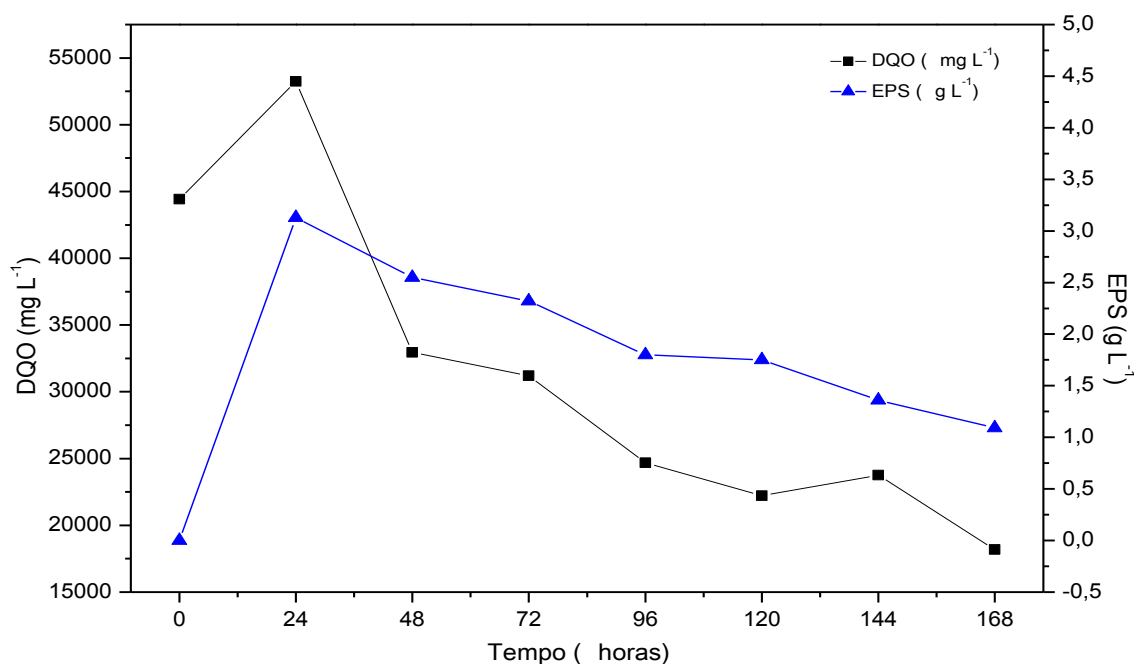


Figura 28—Resultados de DQO e acúmulo de EPS em diferentes períodos de tratamento: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 h.

Contrariamente ao que se é esperado de um processo de tratamento, cujo objetivo é a redução da carga orgânica do efluente, nas primeiras 24 horas de incubação foi verificado um aumento no teor de DQO do efluente sintético. Tal aumento é atribuído a produção extracelular de EPS, característica de cultivos com o *L. theobromae* MMPI (CUNHA et al. 2012). Em 24 horas de tratamento foi verificado pico de DQO (53.240 mg L^{-1}) e a máxima concentração de EPS no meio ($3,13 \text{ g L}^{-1}$). Após 24 horas de cultivo ocorreu a redução na concentração de EPS e consequentemente redução paralela do valor de DQO, atingindo os menores resultados em 168 horas de cultivo.

Em seu estudo sobre a produção de EPS pelo fungo *L. theobromae* MMPI, Cunha et al. (2012) obtiveram $6,32 \text{ g L}^{-1}$ de EPS em 72 horas de incubação, ao utilizar 60 g L^{-1} glicose e a velocidade de agitação de 200 RPM. Da mesma forma Barroso e Cunha (2012) obtiveram $7,41 \text{ g L}^{-1}$ de EPS em 24 horas de produção, ocorrendo uma pequena redução na concentração de biopolímero no caldo fermentado ao final do processo, semelhantemente aos resultados obtidos nesta pesquisa.

Comportamento similar foi descrito em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* (BES et al. 1987) e sugerida por Burs et al. (1994) com *Pleurotus sp.*

florida. De acordo com estes autores, esse tipo de fenômeno ocorre quando o meio de cultivo ainda contém glicose (sacarose), ou seja, não está limitado em fonte de carbono, porém, como uma camada de polímero circunda os *pellets* de biomassa, a transferência de massa pode ser prejudicada induzindo o microrganismo a utilizar outras fontes de nutrientes. Neste caso, a presença de sacarose no meio não significa necessariamente que estava disponível para o consumo (BARROSO; CUNHA, 2010). Dessa forma, a redução do conteúdo de EPS no meio de cultivo após 24 horas pode estar associada à possível hidrólise do polímero, provavelmente por ação de β -glucanases secretadas pelo próprio fungo, sendo posteriormente utilizado como substrato para o seu desenvolvimento (CUNHA et al., 2012)..

4.5.2 TRATAMENTO DO EFUENTE BRUTO INDUSTRIAL

Na Figura 29 estão demonstrados os dados referentes ao crescimento celular (aumento de biomassa micelial) e a remoção de cor do efluente. Semelhante ao que ocorreu durante o processo de remoção de cor do efluente sintético houve boa correlação entre descoloração e crescimento micelial ao longo do bioprocessamento, com remoção máxima de 91,3% em 168 horas de cultivo e 7,6 g L⁻¹ de biomassa. Contudo, este índice foi obtido apenas ao sétimo dia de inoculação e com uma quantidade maior de biomassa quando comparado ao efluente sintético.

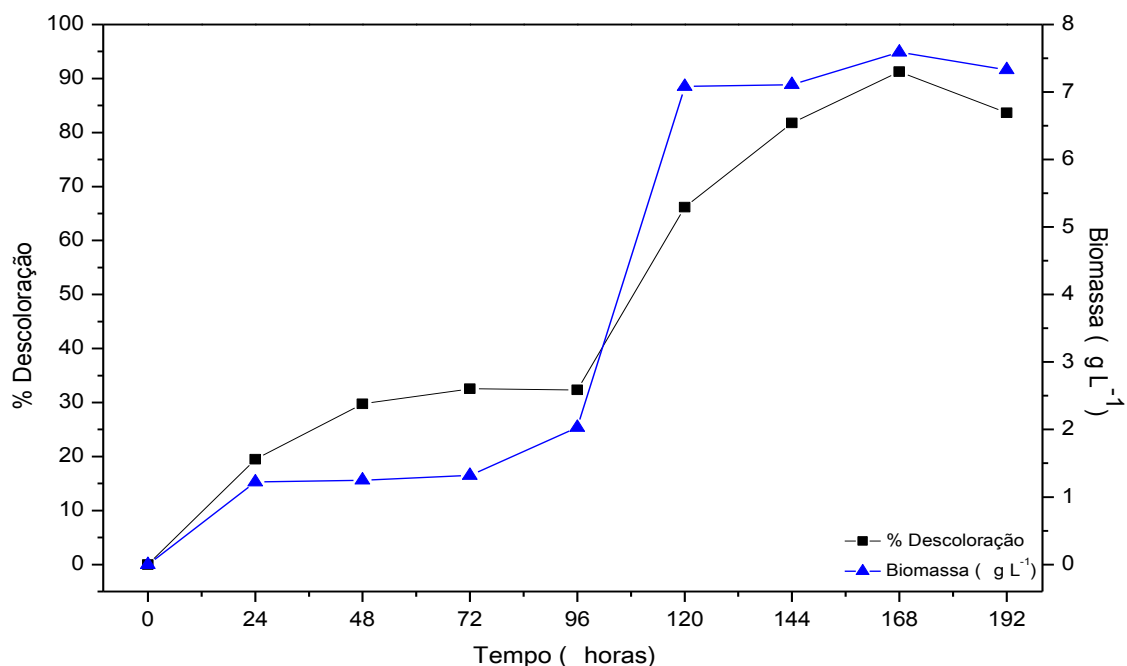


Figura 29 - Porcentagem de descoloração do efluente bruto em biorreator e produção de biomassa fúngica durante 08 dias de tratamento

Durante as primeiras 24 horas de cultivo foram obtidos 19,5% de remoção de cor chegando a 32,3% ao final de 96 horas de tratamento. Neste intervalo, a produção de biomassa manteve-se constante entre $1,23 \text{ g L}^{-1}$ (24 horas) e $2,04 \text{ g L}^{-1}$ (96 horas). Comparando-se a produção de biomassa e o percentual de descoloração do efluente sintético com o efluente industrial, é possível observar que em quantidades semelhantes de biomassa – $1,71 \text{ g L}^{-1}$ (efluente sintético) e $2,03 \text{ g L}^{-1}$ (efluente industrial) – a eficiência na remoção de cor foi muito diferente (94,8% de descoloração do efluente sintético e 32,4% de descoloração do efluente industrial).

Como o efluente industrial utilizado apresenta em sua composição diversos compostos iônicos oriundos de sais, íons metálicos, ácidos e outras impurezas, a presença de tais íons pode ter aumentado a força iônica do meio e afetado a bioadsorção do corante na biomassa (KAUSHIK; MALIK, 2009). Estes resultados quando analisados em conjunto com os espectros de absorção e absorvância relativa, sugerem que poderia estar ocorrendo uma interação química entre a biomassa e o corante, a chamada quimissorção. Tais interações são mais fortes e mais específicas que as forças da adsorção física e provavelmente devido a esta interação química, tenham ocorrido as mudanças observadas nos espectros de

absorção do corante sintético, principalmente na região do ultravioleta (GONÇALVES, 2001).

Outro fator que pode ter influenciado na diferença de adsorção é formato da biomassa fúngica. Quando fungos que formam hifas crescem em meio líquido, o micélio, quando submergido com agitação, geralmente forma enovelados miceliais ou pequenas esferas uniformes, os chamados *pellets* (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010). Da mesma maneira que nos ensaios conduzidos em incubadora orbital *shaker* quando submetido a velocidades mais elevadas, foi observado que ocorreu um maior cisalhamento da biomassa fúngica, resultando em um formato diferente dos *pellets* comparando-os com os ensaios em efluente sintético.

De fato esta diferença na descoloração pode estar relacionada à interação corante / adsorvente, e neste caso, a construção de isotermas de adsorção auxiliaria nas discussões e também para poder determinar a quantidade de substância adsorvida por unidade de peso adsorvente (KAUSHIK; MALIK, 2009).

A Figura 30 apresenta o sobrenadante do efluente bruto após a centrifugação em diferentes níveis de tratamento, no intervalo do tempo zero a 192 horas (oito dias).

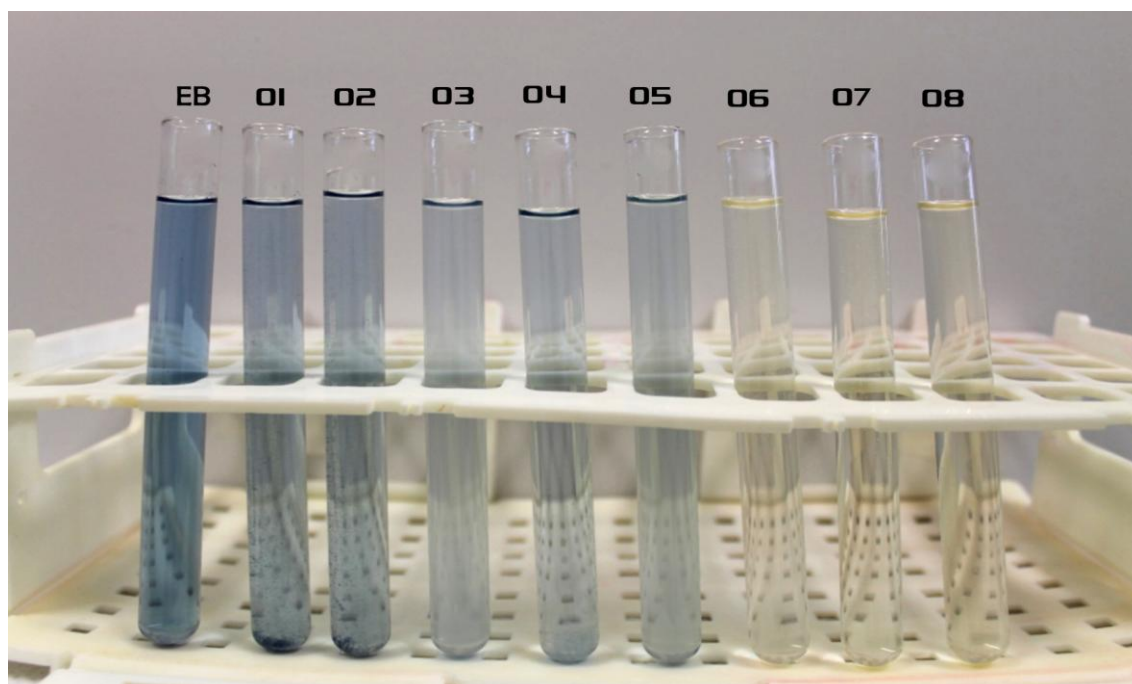


Figura 30– Efluente bruto EB (padrão de referência) e efluente bruto após o período de tratamento: 24 h (1), 48 h (2), 72 h (3), 96 h (4), 120 h (5), 144 h (6) e 168 h (7) e 192 h (8).

O ensaio em biorreator utilizando o efluente industrial possibilitou a observação de outro dado interessante. Durante a retirada das primeiras amostras, foi constatado que a diminuição do pH do meio pelo fungo *L. theobromae* MMPI proporcionou a formação de compostos insolúveis macroscópicos, suspensos no efluente, sendo observada posterior remoção através do processo de filtração. Ao submeter o efluente industrial sem o tratamento ao processo de filtração este comportamento não foi observado. Isto sugere, no caso deste efluente específico, que a diminuição de pH com posterior filtração destas águas residuárias antes da inserção em sistema de tratamento mais avançados é uma boa alternativa para o tratamento primário.

Os resultados de DQO do efluente industrial (Figura 31) mantiveram a mesma tendência que os valores observados para o efluente sintético. O efluente bruto apresentou valor de DQO de 659 mg L^{-1} , no entanto, tal parâmetro sofreu aumento expressivo após a suplementação do efluente com a sacarose e demais sais inorgânicos, atingindo valor de 21.940 mg L^{-1} antes do início do tratamento. O aumento observado após 24 h e 48 h novamente foi atribuído a produção de EPS pelo fungo atingindo o pico máximo de 61.750 mg L^{-1} (DQO) e $4,28 \text{ g L}^{-1}$ (EPS), entretanto, a pequena variação da DQO ocorrida no quinto dia de tratamento não pode ser explicada. Observou-se ainda, especialmente nas primeiras horas de cultivo que o elevado teor de EPS contribuiu para um intenso aumento da viscosidade do efluente.

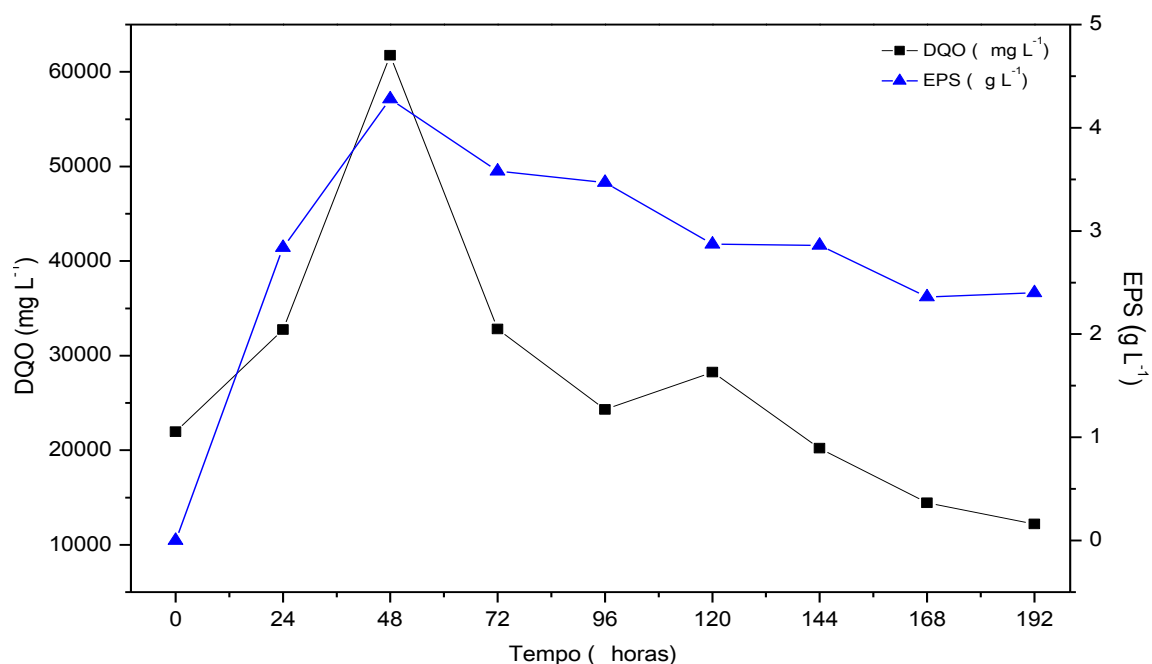


Figura 31- Resultados de DQO e EPS produzido em diferentes tempo de tratamento, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h e 192 h.

Nos ensaios em biorreator com o efluente bruto industrial, não foi possível quantificar durante o intervalo de tempo de incubação resultado de atividade enzimática pelo fungo *L. theobromae* MMPI.

A Tabela 15 apresenta os dados referentes ao pH das soluções e o teor de compostos fenólicos em diferentes tempos de tratamento. Em ambas as situações, os resultados mostram que o pH do meio diminuiu consideravelmente nas primeiras 24 horas de incubação. Durante o período de tratamento ocorreu também um aumento considerável no teor de compostos fenólicos em ambas as situações.

Tabela 15 – Valores de pH e compostos fenólicos em diferentes tempos de tratamento

Tempo	pH (ES)	pH (EB)	Fenóis totais mg L ⁻¹ (ES)	Fenóis totais mg L ⁻¹ (EB)
0	6,90	5,15	49,51	6,64
24 h	3,36	3,12	52,83	62,79
48 h	3,42	3,13	79,33	61,20
72 h	2,73	3,08	112,84	62,39
96 h	2,79	2,43	114,49	86,58
120 h	2,62	1,93	108,97	122,73
144 h	2,55	2,48	106,45	120,04
168 h	2,61	2,93	100,82	111,39
192 h	-	3,09	101,26	126,86

Como pode ser visto nas Figuras 25 e 30 e conforme foi observado nos ensaios realizados em incubadora orbital *shaker*, em ambos os casos o sobrenadante do efluente após o tratamento apresentou leve coloração amarela. Diversas pesquisas têm relatado a produção de pigmentos marrom-escuros ou pretos, encontrados frequentemente em sistemas microbianos e associados à patogênese fúngica, geralmente tem sido caracterizado como melaninas (GOMEZ et al 2001 apud ESPOSITO pag 289).

Segundo Espósito (2009) uma série de metabólitos secundários produzidos por fungos tem sido estudados e caracterizados industrialmente. Ao contrário de plantas, já utilizadas pela biotecnologia moderna para obtenção de alguns metabólitos secundários como, por exemplo, o linalol, alizarina, índigo, ácido carmínico, algas e fungos são mais adequados para a produção biotecnológica de pigmentos devido ao fato de crescerem usando técnicas de cultura conhecidas.

Por meio de técnicas biotecnológicas, antraquinonas têm sido estudadas e isoladas de inúmeros fungos (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Drechslera* e *Curvuralia*), apresentando propriedades idênticas quando comparadas aos corantes convencionais. Estes pigmentos e metabólitos secundários produzidos podem estar associados à produção de compostos fenólicos. Babitskaya e Shcherba (1999) apud Esposito (2010) observaram que a produção de compostos fenólicos por *Pleurotus ostreatus* e *Crinipellis schevczenkovi* pode ser estimulada por aminoácidos aromáticos, ácido naftilacético, ácido indolacético e cinetina e, dessa forma, aumentada consideravelmente.

Ao avaliar os metabólitos produzidos por *Lasiodiplodia theobromae*, Aldridge (1971), isolaram seis metabólitos diferentes, entre eles um composto fenólico. É difícil mensurar se o aspecto amarelado da solução após o tratamento está vinculado aos processos de descoloração fúngica ou se ocorreu à produção de um pigmento característico de *L. theobromae* MMPI.

Entretanto, considerando os diversos estudos que comprovaram a produção de metabólitos secundários por *Lasiodiplodia theobromae* (ácido jasmônico, macrolactanas, ergosterol, isocumarina e sesquiterpenos) (NAKAMORI; et al. 1993; YANG et al.; 2000; NUNES et al. 2006) o aumento do conteúdo de compostos fenólicos no efluente tratado em relação ao bruto poderia estar associado à síntese de novos compostos e pigmentos que não foram identificados no presente trabalho.

4.5.3 Ensaio de Toxicidade com *Artemia salina*

O resultado referente ao teste de toxicidade aguda usando o microcrustáceo *Artemia salina* foi baseado na concentração letal média (CL₅₀) na qual 50% das larvas foram mortas durante 48 horas de exposição ao efluente. Os resultados obtidos do efluente bruto industrial antes e após o biotratamento (192 horas) em diferentes concentrações estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina* após 48 h de incubação em diferentes concentrações do efluente

Concentração do efluente (v / v)	Mortalidade (%)	
	Efluente bruto	Efluente tratado
1,5	0	0
3,1	0	26,7
6,2	0	63,3
12,5	33,3	96,7
25	100	100
Resultado final	CL ₅₀ EB ~ 14,72%	CL ₅₀ ET ~ 4,98%

CL₅₀ = concentração que causou letalidade a 50% da população exposta. EB = efluente bruto. ET = efluente tratado

O estudo da toxicidade do efluente têxtil tratado buscou avaliar a eficiência do biotratamento em relação à toxicidade aguda do efluente frente à organismos vivos, bem como avaliar se o tratamento empregado poderia gerar compostos mais tóxicos que o efluente *in natura*. O valor numérico de toxicidade aguda, expresso como CL₅₀, obtidos a partir de curvas de toxicidade, exprime uma relação inversa à toxicidade, ou seja, menores valores numéricos indicam maiores toxicidades (LOPES; CAVASOTTO; ROCHA, 2012). Conforme pode ser observado, a concentração letal que causou a mortalidade de 50% dos organismos (CL₅₀) foi de aproximadamente 14,72% (v / v) no efluente bruto, enquanto que no efluente tratado foi verificado uma CL₅₀ de 4,98% (v / v). Estes resultados demonstram que o efluente em questão apresentou toxicidade elevada em ambas as situações, apresentando mortalidade total do microcrustáceo acima de 25%.

Após o tratamento utilizando o fungo *L. theobromae* MMPI, o efluente industrial apresentou maior toxicidade quando comparado ao efluente bruto. O

aumento de toxicidade observado após o tratamento pode ser atribuído a diversos fatores, entre eles a possível formação de novos produtos oriundos do metabolismo fúngico, a degradação parcial do corante e conseqüentemente a formação de compostos intermediários e a diminuição de pH do meio para valores extremamente baixos. Neste caso, novos estudos devem ser feitos para confirmação e maiores explicações acerca destas suposições.

5 CONCLUSÃO

- Considerando os elevados índices de descoloração do corante têxtil obtidos nesta pesquisa, a proposta de utilização do fungo fitopatogênico *Lasiodiplodia theobromae* MMPI para a remoção de cor do efluente sintético e do efluente bruto industrial utilizado, apresentou-se como uma nova alternativa para os processos de remediação de efluentes têxteis utilizando biomassa fúngica.
- Os resultados de caracterização do efluente bruto industrial apresentaram-se em sua grande maioria em desacordo com os padrões de lançamento exigidos pela legislação brasileira.
- Os estudos preliminares utilizando apenas o fungo *L. theobromae* MMPI e o efluente sintético preparado demonstraram que não ocorreu a descoloração da solução, sendo necessária a adição de substratos e nutrientes para que isto viesse a ocorrer.
- O comportamento observado em incubadora orbital *shaker* indicou que possivelmente o processo de descoloração ocorreu através da fixação do corante a biomassa fúngica, apresentando 91,6% de eficiência quando foram utilizados 75 g L⁻¹ de sacarose, 1,5 g L⁻¹ de nitrato de amônio e velocidade de agitação de 125 RPM.
- A validação do modelo experimental realizada através de ensaios *a posteriori*, indicou excelente correlação entre o valor preditivo e o valor observado, reproduzindo com fidelidade os resultados obtidos dentro do intervalo estudado.
- A descoloração do corante conduzida em biorreator ratificou o comportamento observado em incubadora orbital *shaker*. Contudo, mesmo obtendo-se uma boa eficiência na remoção da DQO inicial, os resultados finais da DQO e de compostos fenólicos aumentaram consideravelmente no intervalo de tempo estudado.
- O nível de toxicidade do efluente industrial frente *Artemia salina* foi menor para o efluente bruto comparado ao efluente tratado.

- Apesar da mudança observada nos espectros UV-Vis do efluente após o tratamento, a biodegradação do efluente em questão não pôde ser comprovada apenas com as informações deste estudo. Neste aspecto, alguns pontos necessitam de maiores avaliações para serem mais bem discutidos e elucidados. Ao que tudo indica, o principal mecanismo de descoloração observado ocorreu através de biossorção.

REFERÊNCIAS

ABIQUIM, Associação Brasileira da Indústria Química. Corantes e pigmentos. Disponível em: www.abiquim.org.br/corantes. Acesso em 08/06/2012.

ALDRIDGE, D. C. et al.; Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of the Chemical Society**. p. 1623-1627, 1971.

ALI, Naeem; HAMEED, Abdul; AHMED, Safia; Physicochemical characterization and bioremediation perspective of textile effluent, dyes and metals by indigenous bacteria. **Journal of Hazardous Materials**. 164, p. 322-328, 2009.

APHA. American Public Health Association / American Water Works Associations / Water Environment Federation. **Standard Methods for the Examinations of Water and Wastewater**. 20. ed. Washington DC: [s.n.], 1998.

BARROSO, Roney; CUNHA, Mário A. A.; Avaliação da influência do pH de cultivo na produção de biopolímero pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* em biorreator de bancada. **Relatório de atividades PIBIC / CNPQ**, p. 21, 2010.

BAIRD, Colin; CANN, Michael; **Química Ambiental**. 4ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.

BANAT, Ibrahim M. et al; Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.

BAYRAMOGLU, Gülay; ÇELIK, Gökce; ARICA, Yakup M.; Biosorption of reactive blue 4 dye native and treated fungus *Phanerochaete chrysosporium*: batch and continuous flow system studies. **Journal of Hazardous Materials**, p. 1689-1697, 2006.

Bes, B., Pettersson, B., Lennholm, H., Iversen, T. and Eriksson, K. E. Synthesis, structure and enzymic degradation of an extracellular glucan produced in nitrogen-starved cultures of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Applied Biochem*. 1987, 9, 310-318

BRAILE, Pedro M.; CAVALCANTI, José Eduardo W. A.; **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, 1993, p. 764.

BRASIL, CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resoluções do Conama. Resoluções vigentes publicadas entre julho de 1984 e maio de 2006**. 1ª Ed. Brasília, DF, 2006.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building**. Nova York: Editora Wiley, 1978

BURNS, P. J.; YEO, P.; KESHAVARZ, S. Roller; EVANS, C. S.; Physiological studies of exopolysaccharide production from *Basidiomycete Pleurotus* sp. Florida. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16, 1994

CETESB, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo – Série de relatórios**. Governo do estado de São Paulo – Secretaria do Meio Ambiente. 2009. 44p.

COSTA, Ana C. R.; ROCHA, Érico R. P.; Panorama da cadeia produtiva têxtil e de confecções e a questão da inovação. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro, n.29, p. 159-202, março 2009.

CRINI, Gregório; Non-conventional low-cost absorbents for dye removal: a review. **Bioresource Technology**. v. 97, nº 9, p. 1061-1085, 2005.

CUNHA, Mário A. A. et al; Lasiodiplodan, na exocellular (1-6)-B-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal Industrial Microbiol Biotechnol**. 2012.

CUNHA, Mário A. A. et al; The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible lacases by *Botryosphaeria sp.* **Journal Basic Microbial**. 43, p. 385-392, 2003.

DELLAMATRICE, Priscila M.; **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP**. 2005. 136 f. Tese – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

ESPÓSITO, Elisa; AZEVEDO, João L.; **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed. revisada e ampliada. Caxias do Sul, RS: EDUCS – Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010. 638 p.

FATMA, FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE DE SANTA CATARINA. **Relevância de parâmetros de qualidade das águas aplicados à águas correntes. Parte I: Características gerais, nutrientes, elementos-traço e substâncias nocivas inorgânicas, características biológicas**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 1998 p.108.

FREIRE, Francisco C. O. et al; Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará. **Comunicado Técnico – EMBRAPA**, Fortaleza – CE. 91, 2004.

FU, Yuzhu; VIRARAGHAVAN, T ; Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technology**. 79, p. 251-262, 2001.

GAYLARDE, Cristine C.; BELLINASSO, Maria L.; MANFIO, Gilson P.; Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biociência & Desenvolvimento**. n. 34, 2005.

GILONI-LIMA, Patrícia C. et al.; A study of the effects of chromium exposure on the growth of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) hindak evaluated by Central Composite Design and Response Surface Methodology. *Ecotoxicology*, v. 19, p. 1095-1101, 2010.

GIORDANO, Gandhi; Remoção de cor em efluentes industriais. **ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**. p 612-620, 1999.

GLEN, Jeffrey K.; GOLD, Michael H.; Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 45, n. 6, p. 1741-1747, 1983.

GONÇALVES, G. C.; **Clarificação do caldo de cana-de-açúcar utilizando processos com membranas e adsorção com carvão ativado proveniente do bagaço de cana**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR. 2001.

GUARATINI, Cláudia C. I.; ZANONI, Maria V. B.; Corantes Têxteis. **Química Nova**. v. 23, n.1, p. 71-78, 2000.

GUPTA, Nutan; TRIPATHI, A. K.; HARSH N. S. K.; Bioremediation of cotton-textile effluent using fungi. **BEPLS – Bulletin of Environment, Pharmacology & Life Sciences**. v. 1, n.1, p. 15-19, 2011.

HUNGER, Klaus; **Industrial Dyes: chemistry, properties, applications**. Frankfurt, Germany. Weinheim: Wiley-VHC, 2003. 660 p.

IMHOFF, Karl; IMHOFF, Klaus. **Manual de tratamento de águas residuárias**. 26ª Ed. São Paulo, SP: Edgard Blücher Ltda, 1986. 301 p.

IVANOV, Raphael C. et al.; Produção de biopolímero sintetizado pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* em fermentação submersa. **XIV SICITE – UTFPR**, v. 2, 2009.

KAMIDA, Hélio M. **Biodegradação e toxicidade de efluente contendo corantes, tratado com *Pleurotus sajor-caju***. 2004. 150 f. Tese – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2004.

KAMIDA, Hélio M.; DURRANT, Lucia R.; Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KAPDAN, Ilgi K. et al.; Effect of environmental conditions on biological Decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*. **Enzyme and microbial technology**. v. 26, p. 381-387, 2000.

KAUSHIK, Prachi; MALIK, Anushree. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. **Environment International**. v. 35, p. 127-141, 2009.

KUMARAN, N. S.; DHARANI, G.; Decolorization of textile dyes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. **Journal of Applied Technology in environmental Sanitation**. v. 1, n. 4, p. 361-370, 2011.

KUNZ, Airton; REGINATTO, Valéria; DURÄN, Nelson; Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium-ozone*. **Chemosphere** v. 44, p. 281-287. 2001.

KUNZ, Airton; ZAMORA, Patrício P.; Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**. v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LIBANIO, Marcelo. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2005. 444 p.

LOPES, Aline C.; CAVASOTTO, Thiago; ROCHA, Raquel D. C.; Teste preliminar de toxicidade aguda de efluente de galvanoplastia utilizando *Artemia salina*. I Simpósio de Tecnologia Química - UTFPR, setembro, 2012.

MACHADO, William C. P.; **Indicadores da qualidade da água na bacia hidrográfica do rio Pato Branco**. 315 f. Tese de Doutorado. Pós-graduação em Geologia. Dpto. de Geologia, UFPR, Curitiba, 2006.

MARGULIS, Lynn; SCWARTZ, Karlene V.; **Cinco Reinos: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. 3ª Ed. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. 497 p, 2001.

MDIC; Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior. Desenvolvimento da produção – cadeias produtivas. Disponível em: www.mdic.gov.br/sitio. Acessado em 23/05/2012.

MOTA, Suetônio; **Preservação e conservação de recursos hídricos**. 2ª edição Rio de Janeiro: ABES, 1995. 200 p.

MEYER, B. N. et al.; Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.5, p. 31-34, 1982.

MUKESH, Doble; KUMAR, Anil; **Biotreatment of industrial effluents**. 336 p. fev, 2005.

NAKAMORI, Kaoru; Potato micro-tuber inducing substances from *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 35, n° 4, p. 835-839, 1994.

NETO, Benício B.; SCARMÍNIO, Ieda S.; BRUNS, Roy E.; **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª ed. Campinas, SP: Editora UNICAMP, 2002. 401 p.

NIEWEGLOWSKI, Ana M. A.; **Indicadores de qualidade da água na bacia hidrográfica do rio Toledo**. 218 f. Dissertação de tese de mestrado. Pós-graduação em Agronomia, Setor de Ciências Agrárias, UFPR, Curitiba, 2006.

NUNES, Fátima M. et al.; Metabólitos secundários do fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ**. 2006.

NYANHONGO, et al.; Decolorization of textile dyes by lacases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Water Research**. v. 36, p. 1449-1456, 2001.

NTULI et al.; Characterization of effluent from textile wet finishing operations. **Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science**. v. 1, 2009.

PARANÁ, Cema – CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 070/2009**. Disponível em <[http://www.cema.pr.gov.br/arquivos/File/resolucao_070_site\(1\).pdf](http://www.cema.pr.gov.br/arquivos/File/resolucao_070_site(1).pdf)> Acesso em 11/06/2013.

PASTORE, Neivair S.; HASAN, Salah M.; ZEMPUSLSKI, Denize A. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus Níger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **Engevista**. v. 13, nº 3, p. 149-159, 2011.

PÁVIA, Donald, L. et al; 2010. Introdução a espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte americana. Editora Cengage Learning. p. 699, 2010.

PEARCE, C. I.; LLOYD, J. R.; GUTHRIE, J. T.; The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments**. v. 58, p. 179-196, 2003

PDB. Protein Data Bank. Disponível em:< www.rcsb.org/pdb/home/home.do> Acesso em 10/06/2012.

PEDROSA, Israel; **Da cor à cor existente**. 10 edição. Rio de Janeiro, SENAC Nacional – SENAC Editoras, p. 256, 2009.

PEREIRA, Aurenice L.; SILVA, Gilson S.; RIBEIRO, Valdenir Q.; Caraterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. *Fitopatologia Brasileira*. v. 31, no 6, 2006.

RODRIGUES, Maria I.; IEMA, Antonio F.; **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª ed. Campinas, SP: Cárita Editora, AMIC - Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

SALDANHA, Roze L. et al.; Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 259-264, 2007.

SALGADO, Bruno C. B et al; Descoloração de efluentes aquosos sintéticos e têxtil contendo corantes índigo e azo via processos Fenton e foto-assistidos (UV e UV/H₂O₂). **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 14, n. 1, p. 1-8, 2009.

SANTOS, Graziely C.; **Análise comparativa da capacidade de remoção do corante direct blue 71 em solução pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus oryzae***. Dissertação. Instituto de Biociências. Rio Claro – SP. 2011.

SARAIVA, Márcia R. M.; **Enzimas extracelulares de fungos da família *Botryosphaeriaceae***. 1999 102 f. Dissertação. Universidade de Aveiro. Departamento de Biologia. Portugal. 2009.

SEN, S.; DEMIRER G. N.; Anaerobic treatment of real textile wastewater with a fluidized bed reactor, **Water Research**. v. 37, p. 1868-1878, 2003.

STELUTI, R.M., et al.; Comparison of *Botryosphaera* production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon source, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**. v.44, p. 480-486, 2004.

TASKIN, Mesut; ERDAL, Serkan; Reactive dye bioaccumulation by fungus *Aspergillus niger* isolated from the effluent of sugar fabric-contaminated soil. **Toxicology and Industrial Health**, v. 26, n° 4, p. 239-247, 2010

TROMBINI, Rosana B.; DÓI, Suely M. O.; Remoção de cor e análises físico-química de efluentes de indústrias têxteis tratados com *Ganoderma spp.* **Revista Fapciência**. v. 9, n° 12, p. 101-122, 2012.

TUNUSSI, Leandro; SOBRINHO, Pedro A.; Remoção de cor e nitrificação de efluentes de tinturaria têxtil através de processos biológicos anaeróbio-aeróbio. **Água Latinoamérica**. p. 1-7, 2003.

VASCONCELOS, Ana F. D. et al.; Comparison of the lacases, molecular marker proteins, and induction of pycnidia by three species of botryosphaeriaceous fungi. **Mycoscience**. v. 42, p. 543-548, 2001.

VOGEL, H.J.; **A convenient growth medium for *Neurospora crassa***. **Genetic Bulletin**, v.13, p. 42-47, 1956.

VON SPERLING, Marcos; **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 2ª edição. v. 1. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 1996, 243 p.

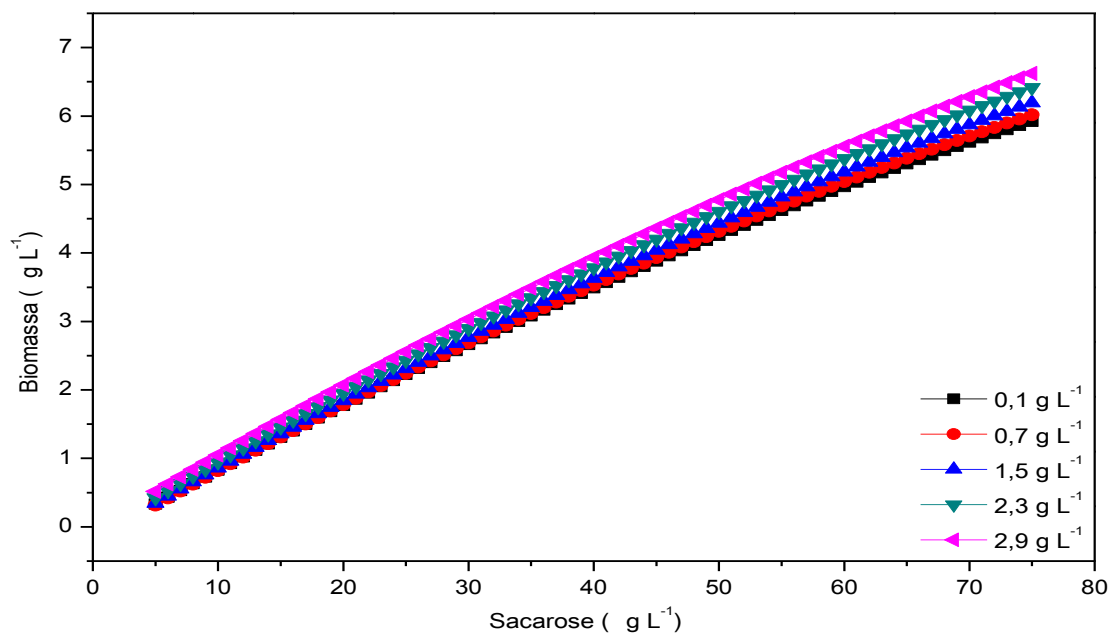
XIONG, Xiao-Jing; MENG, Xue-Jiao; ZHENG, Tian-Ling. Biosorption of C.I. Direct Blue 199 from aqueous solution by nonviable *Aspergillus niger*. **Journal of Hazardous Materials**. v. 175, p. 241-246, 2010.

YANG, Qing et al.; Potato micro-tuber inducing hydroxylasiodiplodins from *Lasiosiphonia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 489-494, 2000.

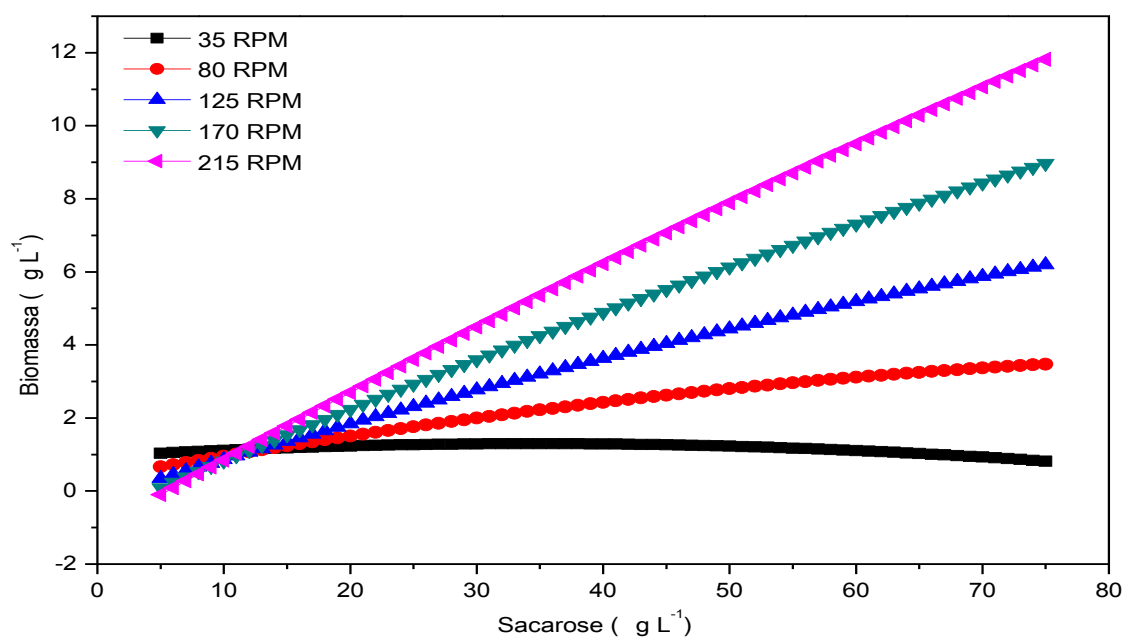
ZANONI, Maria V. B.; CARNEIRO, Patricia A.; O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**. v. 9, n. 174, p. 61-64, agosto 2001.

APÊNDICE

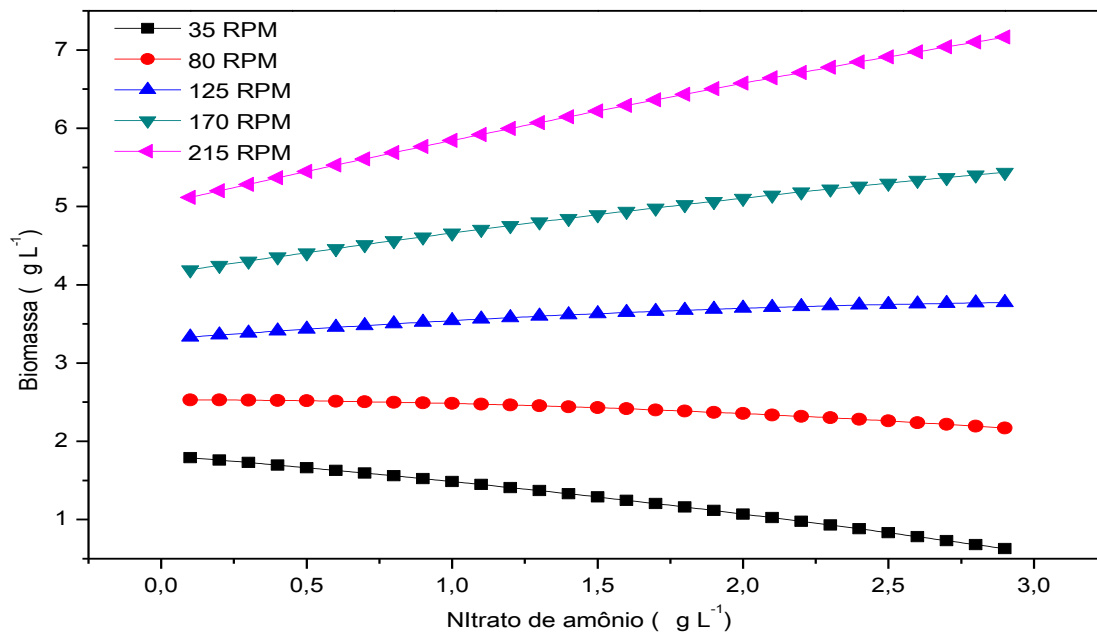
APÊNCIDE A – Simulação da produção de biomassa (fixado o fator RPM)



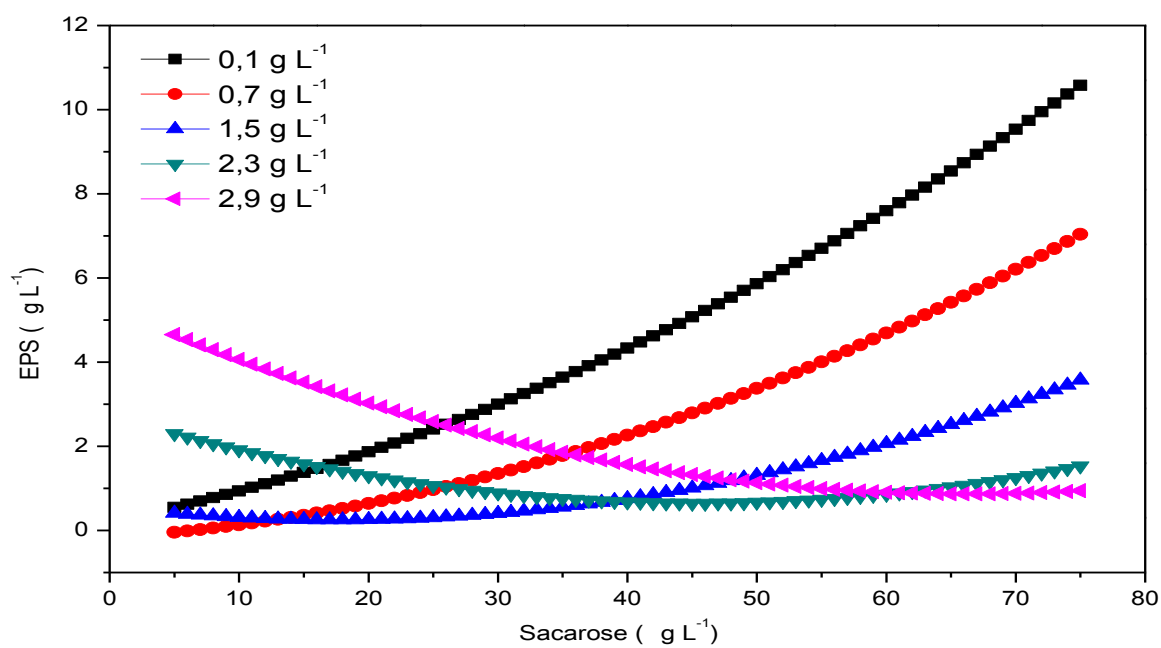
APÊNCIDE B – Simulação da produção de biomassa (fixado fator nitrato de amônio)



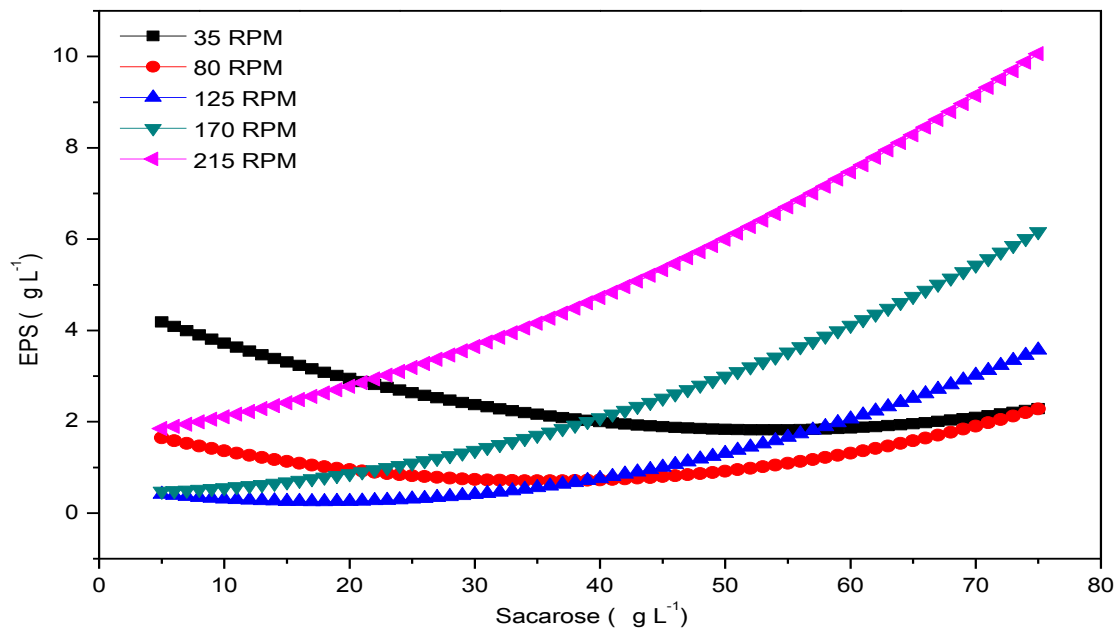
APÊNCIDE C – Simulação da produção de biomassa (fixado fator sacarose)



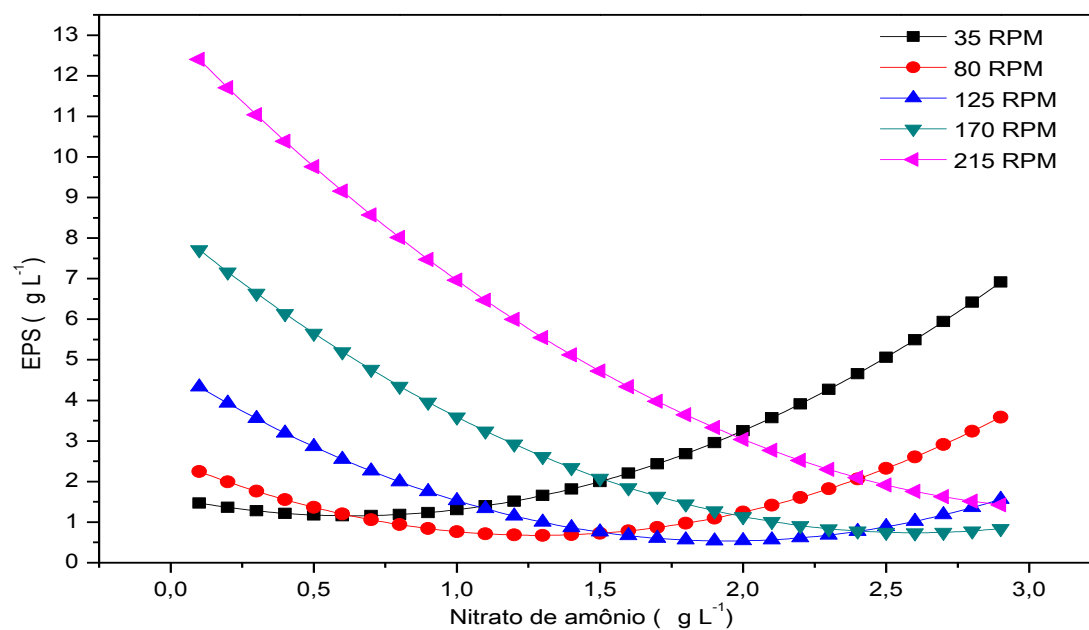
APÊNCIDE D – Simulação da produção de EPS (fixado fator RPM)



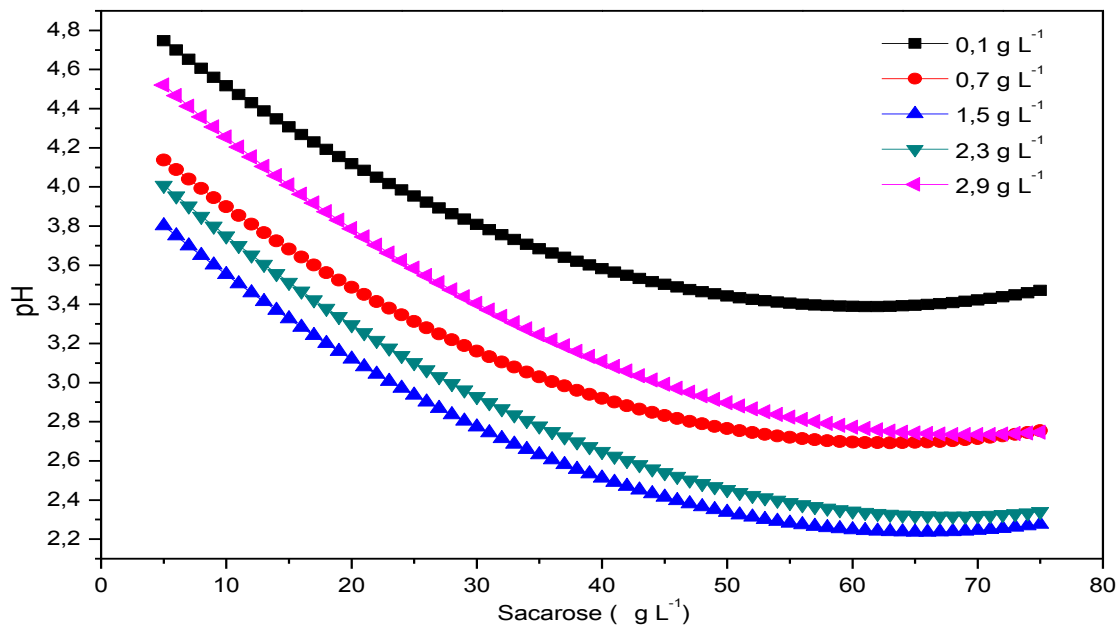
APÊNCIDE E – Simulação da produção de EPS (fixado fator nitrato de amônio)



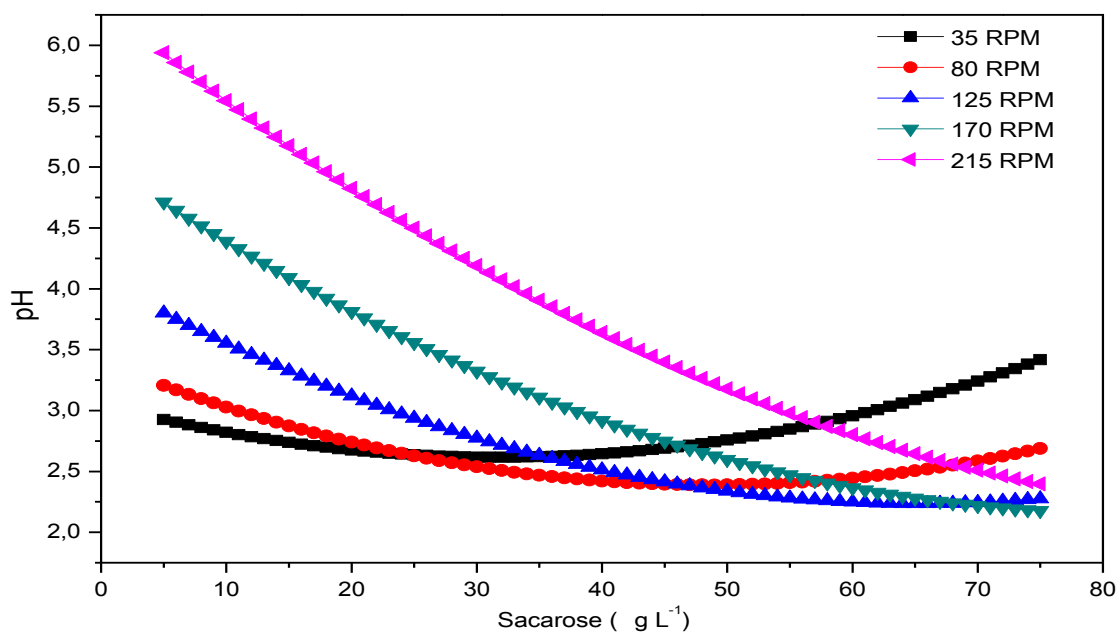
APÊNCIDE F – Simulação da produção de EPS (fixado fator sacarose)



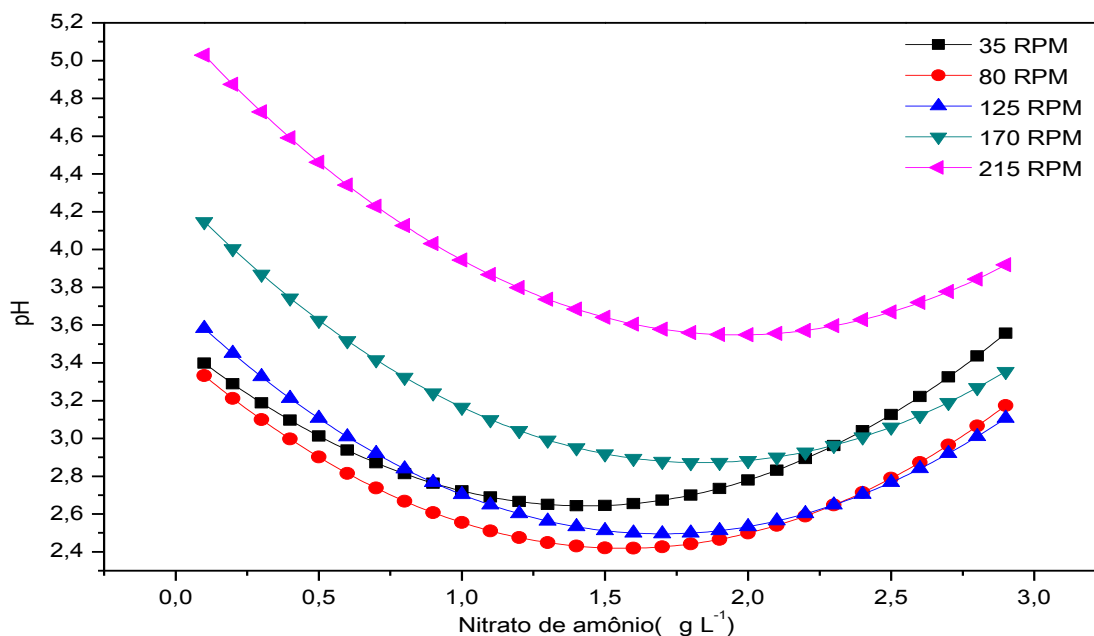
APÊNCIDE G – Simulação dos valores de pH (fixado fator RPM)



APÊNCIDE H – Simulação dos valores de pH (fixado fator nitrato de amônio)

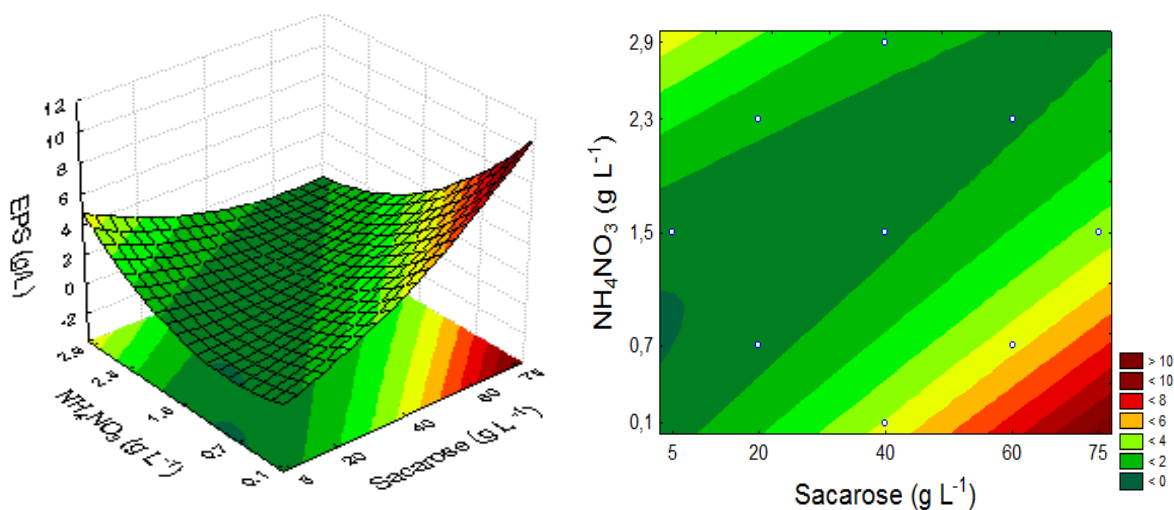


APÊNDICE I – Simulação dos valores de pH (fixado fator sacarose)



APÊNDICE J – Equação A

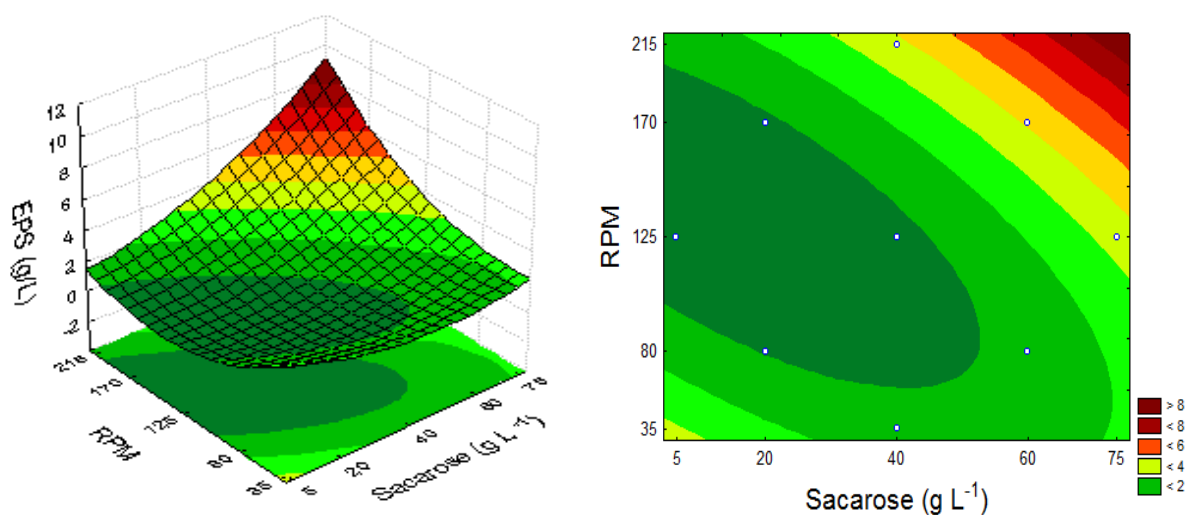
$$\text{EPS} = 0,755 + 0,903 X_1 + 0,403 X_1^2 - 0,790 X_2 + 0,716 X_2^2 - 1,122 X_1 X_2$$



Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação A, em função das variáveis independentes concentração de nitrato de amônio e concentração de sacarose.

APÊNDICE K – Equação B

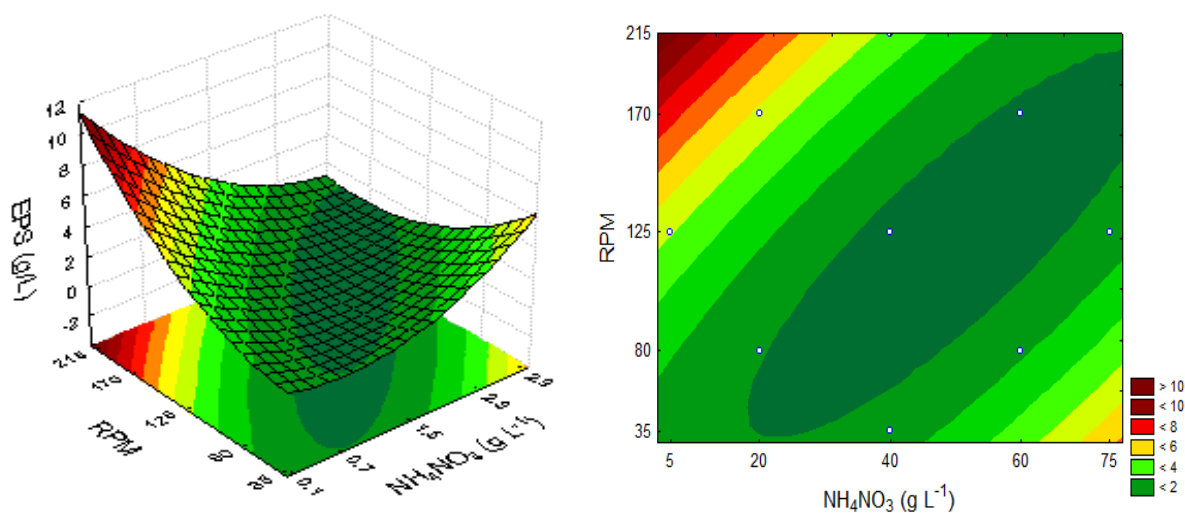
$$\text{EPS} = 0,755 + 0,903 X_1 + 0,403 X_1^2 + 0,680 X_3 + 0,651 X_3^2 + 0,722 X_1 X_3$$



Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação B, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de sacarose.

APÊNDICE L – Equação C

$$\text{EPS} = 0,755 - 0,790 X_2 + 0,716 X_2^2 + 0,680 X_3^2 + 0,651 X_3 - 1,173 X_2 X_3$$



Superfície de resposta e curvas de contorno para a equação C, em função das variáveis independentes velocidade de agitação (RPM) e a concentração de nitrato de amônio.