



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL

MARCUS VINICIUS FREIRE ANDRADE

BIODEGRADAÇÃO DE CORANTE TÊXTIL POR USO DE REATOR BIOLÓGICO
EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM BIOMASSA IMOBILIZADA DE
PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM

FORTALEZA – CEARÁ

2013



MARCUS VINICIUS FREIRE ANDRADE

**BIODEGRADAÇÃO DE CORANTE TÊXTIL POR USO DE REATOR BIOLÓGICO
EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM BIOMASSA IMOBILIZADA DE
*PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM***

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e
Gestão Ambiental do Instituto Federal do
Ceará como requisito para obtenção do título
de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa

Co-Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva

FORTALEZA – CEARÁ

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Instituto Federal do Ceará - IFCE
Sistema de Bibliotecas - SIBI
Ficha catalográfica elaborada pelo SIBI/IFCE, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A553b Andrade, Marcus Vinicius Freire.
 Biodegradação de corante têxtil por uso de reator biológico em bateladas sequenciais com biomassa
 imobilizada de *Phanerochaete Chrysosporium* / Marcus Vinicius Freire Andrade. - 2013.
 109 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal do Ceará, Tecnologia em Gestão Ambiental, Campus
Fortaleza, 2013.
 Orientação: Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa.
 Coorientação: Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva.
1. Cossustrato. 2. *Phanerochaete chrysosporium*. 3. Vermelho do congo. I. Título.
- CDD 628
-

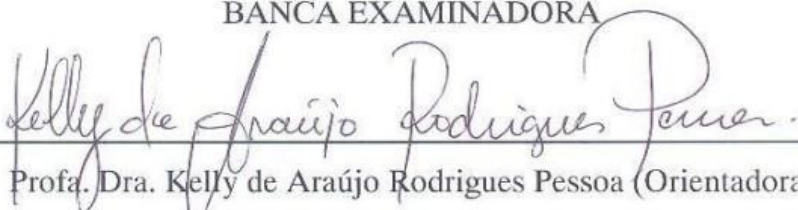
MARCUS VINICIUS FREIRE ANDRADE

**BIODEGRADAÇÃO DE CORANTE TÊXTIL POR USO DE REATOR BIOLÓGICO
EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM BIOMASSA IMOBILIZADA DE
*PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM***

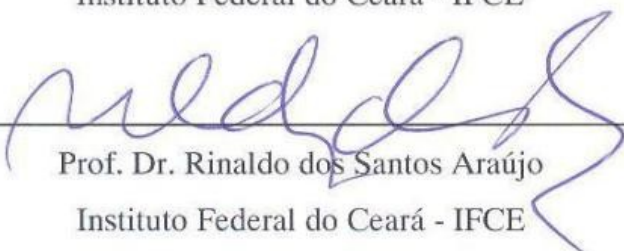
Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e
Gestão Ambiental do Instituto Federal do
Ceará como requisito para a obtenção do título
de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Aprovada em 18/02/2013

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa (Orientadora)
Instituto Federal do Ceará - IFCE



Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo
Instituto Federal do Ceará - IFCE



Profa. Dra. Ana Bárbara de Araújo Nunes
Universidade Federal do Ceará - UFC

*A Deus e as mulheres que encantam minha
vida, minha mãe Socorro Andrade e minha
mãe “adotiva” Kelly Rodrigues.*

“O Senhor é meu pastor, nada me faltará”.

Salmo 22:1

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar em busca da concretização dos meus objetivos.

A minha mãe, Socorro, por todo amor e carinho e pela dedicação, além de entender minha ausência.

A todos os meus familiares, pelo apoio e incentivo na vida estudantil, em especial aos meus irmãos Roberto e Rivelino, e as irmãs Kercya, Rafaela e Andréa.

A Kelly, por todos os anos maravilhosos de orientação, amizade, e amor. Obrigado por ter me guiado pelo caminho do conhecimento e da pesquisa, e por ter-me “escolhido”, entre, todos aqueles jovens no ano de 2005 que almejavam a bolsa PIBIC-Jr. Obrigado por ter tornado o LATAM um segundo lar e por ter permitido que eu tomasse de conta de um local muito especial em minha vida, no qual sei que sempre as portas estarão abertas pra mim.

A Profa. Dra. Glória Marinho, pela co-orientação, apoio e amizade, além de todo suporte para que a pesquisa seja desenvolvida no LATAM.

Ao prof. Dr. Rinaldo Araújo, pelas contribuições na qualificação, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pelos momentos de conhecimento.

A Profa. Dra. Ana Bárbara pelo aceite ao convite da banca de defesa e pelas contribuições sugeridas.

As minhas amigas, Crislayne, Amanda, Débora e Livia, por sempre entenderem minha ausência em muitos momentos e por todo o apoio nos momentos mais difíceis.

Aos amigos Ederson, Fellipe, Vitor e Ronaldo por sempre estarem presentes em minhas conquistas.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM): André, Helison, Luanna, Andreza, Alana, Joab, Jéssica, Lorena, Patricia, Lilian, Mayara, Luciane, Nathália, Igor, Camila, Demetrius, Márcia Gabriele, João Paulo, Sarapelo apoio na execução do trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos meus colegas de turma do PGTGA pelos momentos compartilhados, e em especial a Bárbara, pelo companheirismo, amizade e por todos os momentos de pesquisa e estudo.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Química (LTQ), em especial a Mira que sempre se dispôs a conversar e me auxiliar em análises, obrigado por todo carinho e amizade.

Aos professores do Departamento de Química e Meio Ambiente do Instituto Federal do Ceará por contribuírem em minha formação acadêmica.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro concedido.

RESUMO

A utilização de mananciais como corpo receptor pode acarretar em uma série de desvantagens ambientais à medida que se introduzem efluentes com poluentes, como os corantes. Geralmente, alguns destes poluentes conferem ao meio, recalcitrância e toxicidade, levando ao quadro de completa degradação do ambiente e possível impacto a saúde pública. Nesta perspectiva, o tratamento biológico surge como uma tecnologia inovadora que vem alcançando excelentes resultados na remoção de corantes industriais. Neste trabalho foi estudada a viabilidade de aplicação do fungo *Phanerochaete chrysosporium* para a remoção de corante azo vermelho do congo em reator biológico operado em regime de bateladas sequenciais, com ciclos de 48 horas. A pesquisa foi dividida em duas fases: operação de reator em batelada sequencial e operação de reatores em série operados em regime de batelada. A primeira fase abrigou duas etapas distintas, as quais foram diferenciadas pela concentração de glicose: 5g/L na Etapa I, e 1g/L na Etapa II. A segunda fase compreendeu 2 etapas diferenciadas pela concentração de glicose nos reatores: Etapa 1 (R1 – 1g/L; R2 – 1g/L) e Etapa 2 (R1 – 1g/L; R2 – 0,5g/L). Durante a Fase I o reator foi operado durante 189 dias e monitorado através das variáveis físico-químicas: potencial hidrogeniônico (pH), demanda química de oxigênio, corante, amônia, nitrato, nitrito e fósforo total. A atividade da enzima *manganês peroxidase* foi acompanhada durante todas as etapas. Registraram-se remoções percentuais médias de 86% e 97%, para o corante, correspondentes às Etapas I, e II. Na mesma ordem houve remoção percentual de matéria orgânica em 56% e 76%. Quanto às formas de nitrogênio presentes no meio mineral, amônia e nitrato, foi obtida remoção de 83% e 65% para amônia e 74%, e 56% para nitrato, respectivos às Etapas I e II. O pH afluente e efluente do reator manteve-se com valores característicos de meio ácido, variando entre pH 3 a pH 5. Durante todas as etapas houve registro da atividade da enzima *manganês peroxidase*. Para a Fase II houve remoção global de corante em 75% no reator R1 e 23% para o reator R2 durante a Etapa I e média de 92% para o reator R1 e 45% para o reator R2, na Etapa II. Em relação à matéria orgânica dissolvida houve remoção média de 71% para o reator R1 e 48% para o reator R2, durante a Etapa I, enquanto que para Etapa II houve remoção de 70% para o reator R1 e 60% para o reator R2. Foram registradas remoções percentuais de amônia em 33% e 65% para o reator R1, respectivamente, e 6% e 28% para o reator R2 durante as Etapas I e II. Na mesma ordem houve remoção de 40% e 29% no reator R1, e de 61% e 80% para o reator R2. A análise enzimática realizada durante as Fases I e Fase II desta pesquisa mostra que o comportamento e a liberação de enzimas para o meio extracelular é dependente de diversos fatores, e pode ser influenciada pela concentração de nitrogênio, carbono, quantidade de inóculo, presença de indutores, e micronutrientes. Em geral o emprego do micro-organismo foi satisfatório na remoção de corante vermelho do Congo, matéria orgânica e amônia endossando a aplicabilidade dos reatores biológicos no tratamento de efluentes têxteis.

Palavras-Chaves: cossustrato. *Phanerochaete chrysosporium*. vermelho do congo.

ABSTRACT

The use of wellsprings as receptors may result in a number of environmental disadvantages as they introduce effluents with pollutants such as dyes. Generally, some of these compounds confer recalcitrance and toxicity to the medium, leading to the complete picture of environmental degradation and potential impact on public health. In this perspective, the biological treatment emerges as an innovative technology that has achieved excellent results in the removal of industrial dyes. In this study, the feasibility of applying the fungus *Phanerochaete chrysosporium* for the removal of azo dye Congo red in biological reactor operated in sequencing batch system, with cycles of 48 hours. The research was divided into two phases: operation sequencing batch reactor and operation of reactors in series operated under batch. The first stage was housed two phases, which were differentiated by glucose concentration: 5 g / L in Step I and 1g / L in Step II. The second stage comprised two different stages in the concentration of glucose in reactors: Step 1 (R1 - 1g / L; R2 - 1g / L) and Step 2 (R1 - 1g / L; R2 - 0.5 g / L). During Phase I the reactor was operated for 189 days and monitored through the physico-chemical variables: hydrogen potential (pH), chemical oxygen demand, dye, ammonia, nitrate, nitrite, and total phosphorus. The activity of the enzyme manganese peroxidase was followed during all stages. Were recorded average percentage removals of 86%, and 97% of the dye, corresponding to Steps I and II. In the same order was removed percentage of organic matter in 56% and 76%. As for the forms of nitrogen present in the mineral, ammonia and nitrate removal was achieved in 83% and 65% for ammonia, and 74%, 56%, corresponding to Steps I and II. The pH influent and effluent of the reactor was maintained with characteristic values of acidic environment ranging from pH 3 to pH 5. During all stages there was no record of the activity of the enzyme manganese peroxidase. For Phase II global dye was removed by 75% in the reactor R1, and 23% for the reactor R2 during Phase I, and an average of 92% to 45% reactor R1 and R2 for the reactor, in Step II. In relation to dissolved organic matter it was removed average of 71% to 48% Reactor R1 and R2 to the reactor during Stage I, whereas for removal of Step II was 70% to 60% Reactor R1 and R2 to the reactor. Percentage removals were recorded in 33% ammonia and 65% to reactor R1, respectively, and 6% and 28% for the reactor R2 for ammonia removal Steps I and II. In the same order of removal was 40% and 29% in the reactor R1, and removing at 61% and 80% to reactor R2. The enzymatic analysis performed during Phase I and Phase II of this research shows that their behavior and their release into the extracellular medium is dependent on several factors, and can be influenced by the concentration of nitrogen, carbon, amount of inoculum, the presence of inducers, and micronutrients. And the use of micro-organism was satisfactory in removing dye, organic matter and ammonia indicating the applicability of biological reactors.

Keywords: cosubstrate. congo red. *Phanerochaete chrysosporium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do corante azo vermelho do congo.	8
Figura 2: Representação esquemática dos efeitos de efluentes têxteis no ambiente	10
Figura 3: Métodos para remoção de corantes têxteis em águas residuárias.	11
Figura 4: Ciclo catalítico da enzima <i>manganês – peroxidase</i>	22
Figura 5: Ciclo catalítico da enzima <i>lacase</i>	23
Figura 6: Fluxograma das atividades realizadas durante para os experimentos com reatores biológicos operados em bateladas sequenciais.	26
Figura 7: Remoção de corante no reator com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em bateladas sequenciais.	34
Figura 8: Espectro UV-Vis para as amostras retiradas após os ciclos de 48 horas ao longo das Etapas I, e II, respectivamente.	36
Figura 9: Crescimento do fungo no Reator em Batelada Sequencial durante a Etapa I.	37
Figura 10: Remoção de DQO no reator com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas.	38
Figura 11: Variação do pH efluente no reator com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas.	39
Figura 12: Remoção de amônia no reator com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas.	40
Figura 13: Esquema representativo da utilização de carboidratos até sua inserção no Ciclo de Krebs e uso em rota metabólica para produção de glutamina.	41
Figura 14: Remoção de nitrato no reator com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , operado em bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas.	42
Figura 15: Remoção de fósforo no reator com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , operado em bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas.	43
Figura 16: Comportamento da atividade da enzima <i>manganês peroxidase</i> liberada pelo fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , imobilizado em reator de bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas durante a Fase I.	45
Figura 17: Variação na concentração de corante nos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série.	47
Figura 18: Espectro UV-Vis para as amostras retiradas após os ciclos de 48 horas nos reatores R1 e R2.	48

Figura 19: Variação no pH dos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série.	49
Figura 20: Variação na concentração de DQO dissolvida nos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série.	50
Figura 21: Variação na concentração de amônia nos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série.	52
Figura 22: Variação na concentração de nitrato nos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série.	52
Figura 23: Esquema que demonstra a assimilação do nitrato em fungos filamentosos.	53
Figura 24: Atividade enzimática de <i>manganês peroxidase</i> e <i>lacase</i> nos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série.	54
Figura 25: Variação na concentração de corante nos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série, durante a 2º Fase.	56
Figura 26: Espectro UV-Vis para as amostras retiradas após os ciclos de 48 horas nos reatores R1 e R2.	57
Figura 27: Variação na concentração de DQO dissolvida nos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série, durante a 2º Fase	58
Figura 28: Variação na concentração de amônia nos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série, durante a 2º Fase.	59
Figura 29: Variação na concentração de nitrato nos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série, durante a 2º Fase.	60
Figura 30: Atividade da enzima <i>manganês peroxidase</i> nos reatores com biomassa imobilizada de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> operado em série, durante a 2º Fase.	61
Figura 31: Mecanismo proposto para degradação de corantes e a interação entre as enzimas <i>lacase</i> e <i>manganês-peroxidase</i>	62
Figura 32: Amostras afluentes e efluentes aos reatores R1 e R2 durante as Etapas I e II, respectivamente.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Características do corante vermelho do congo.	8
Tabela 2– Vantagens e desvantagens dos tratamentos físico-químicos utilizados para remoção de cor em efluentes têxteis.	12
Tabela 3 – Elementos requeridos para a célula fúngica	16
Tabela 4– Pesquisas com aplicação de fungos basidiomicetos na remoção de corantes	18
Tabela 5– Variáveis monitoradas durante o desenvolvimento da pesquisa.	29
Tabela 6 – Características químicas dos afluentes e efluentes utilizados durante as Etapas que compuseram o estudo na Fase I.	33
Tabela 7– Contagem de micro-organismos ao final de cada Etapa.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ε	Absortividade molar
kHz	Kilohertz
Lac	Lacase
LiP	Lignina Peroxidase
MHz	Megahertz
MnP	Manganês peroxidase
OH	Radical hidroxila
PAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
pH	Potencial Hidrogeniônico
POA	Processos Oxidativos Avançados
R1	Reator 1
R2	Reator 2
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Poluição ambiental por agentes xenobióticos	4
3.2 Corantes têxteis	5
3.3 Impactos ambientais do lançamento de corantes	8
3.4 Tecnologias para remoção de corantes	11
3.5 Fungos – aspectos fisiológicos	15
3.6 Fungos e o filo <i>Basidiomycota</i>	17
3.7 Mecanismos de remoção de corantes por fungos	20
3.8 Enzimas envolvidas no processo de biorremediação	21
3.9 Importancia do cossustrato na remoção e mineralização de corantes e outros poluentes	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Cultivo do micro-organismo e produção de esporos	27
4.2 Imobilização do <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	27
4.3 Meio aquoso	28
4.4 Operação dos reatores biológicos	28
4.4.1 Fase I	28
4.4.2 Fase I	28
4.5 Monitoramento dos reatores	29
4.6 Microbiologia do reator	30
4.7 Ensaio de adsorção do corante no biofilme	31
4.8 Ensaio de adsorção no meio suporte	31

4.9	Análise de subproduto da degradação via espectrofotometria UV-Vis	32
4.10	Tratamento matemático e estatística dos dados	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1	Fase I – Operação do reator em bateladas sequenciais (RBS)	33
5.2	Fase II – Operação do reator em bateladas sequenciais operados em série	48
5.2.1	<i>Etapas I</i>	48
5.2.2	<i>Etapas II</i>	56
5.3.	Ensaio de adsorção na faseII.....	62
5.4.	Comparação estatística entre as etapas I e etapas II.....	63
6	CONCLUSÕES	65
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXOS A	81
	ANEXOS B	87

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, atenção crescente tem sido dirigida à contaminação dos rios, lagos e reservatórios por compostos xenobióticos. Esta preocupação decorre principalmente dos riscos que estes compostos representam nos ambientes aquáticos sobre a biota, e nos prejuízos à qualidade de água destinada ao suprimento humano, em razão dos efeitos deletérios associados (MINILLO *et al.* 2009).

As atividades têxteis estão entre as que mais contribuem para a contaminação de ambientes aquáticos com compostos recalcitrantes e exigem grandes quantidades de água, corantes e produtos químicos ao longo de uma complexa cadeia produtiva. Isto torna o processamento têxtil gerador de significativa quantidade de despejos aquosos altamente poluidores do meio ambiente, contendo elevada carga orgânica, cor acentuada e compostos tóxicos (PASCHOAL *et al.* 2005).

Os efluentes oriundos da atividade têxtil são muito difíceis de serem tratados, devido às variações na sua composição e pela presença de cores fortes, que se não eliminadas corretamente, acarretam sérios problemas ao meio ambiente. Além disso, alguns tipos de corantes, especialmente os do tipo azo e seus subprodutos, podem ser cancerígenos e mutagênicos (SOUZA *et al.* 2010).

Mesmo que o lançamento de corantes para o meio ambiente constitua apenas uma parcela da poluição da água, corantes são visíveis em pequenas quantidades, a cor tem sido observada quando está acima de 1 mg/L e eles estão normalmente presentes em efluentes na concentração de 10 a 50 mg/L (CORSO e ALMEIDA, 2009).

Os corantes azo são compostos por um grupo $-N=N-$ que, quando ligados a moléculas, caracterizam os corantes diazo, monoazo ou poliazo. Atualmente, esta classe de corantes representa cerca de 60% do mercado mundial e são amplamente utilizados no tingimento de fibras têxteis (SOUZA *et al.* 2010).

Devido à sua toxicidade, os corantes azo são classificados como materiais ambientalmente perigosos e por isso a preocupação e real necessidade do tratamento de efluentes que contenham tais corantes, a fim de minimizar impactos sobre o meio ambiente e à saúde humana. O tratamento biológico convencional de efluentes não é eficaz para a degradação de corantes, de modo que outras técnicas físicas e químicas têm sido utilizadas para removê-los, entretanto tais técnicas são de alto custo, o que torna inviável a aplicação em larga escala, além do mais, o uso de condições anaérobias pode favorecer a quebra de corantes azo em aminas aromáticas, as quais possuem elevado potencial tóxico (GOMES *et al.* 2009; GOPINATH *et al.* 2010).

Neste contexto, a utilização de fungos é uma alternativa promissora de tratamento, em face a capacidade de mineralizar compostos poluentes através da produção e liberação de enzimas extracelulares não específicas com alto poder oxidativo, sendo assim, as responsáveis pela biodegradação, transformação e redução da toxicidade de corantes (BERGSTEN-TORRALBA *et al.* 2009).

Por outro lado, a mineralização completa de corantes têxteis por via biológica representa um desafio, uma vez que se tem observado, na maioria das vezes, a ruptura da ligação azo, correspondente ao cromóforo, sem que haja degradação eficiente de outras estruturas componentes da molécula do corante, o que acarreta ainda na presença de compostos que podem exercer efeitos nocivos ao meio ambiente (RODRIGUES *et al.* 2011).

Dentro desta perspectiva, é proposta desta pesquisa estudar a viabilidade de aplicação de *Phanerochaete chrysosporium*, potente fungo da podridão branca, na degradação e mineralização do corante azo vermelho do congo, a partir da operação de reatores biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o emprego de biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* em reatores em bateladas sequenciais para a biodegradação do corante vermelho do congo em meio aquoso.

2.2. Específicos

- ✓ Estudar a influência da concentração de glicose (cossustrato) na remoção de corante vermelho do congo, matéria orgânica, em termos de DQO, usando reator com biomassa imobilizada, operado em regime de bateladas sequenciais;
- ✓ Avaliar a eficiência de remoção de corante vermelho do congo e de matéria orgânica, em termos de DQO, por sistema de dois reatores em bateladas sequenciais, dispostos em série, com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium*;
- ✓ Estudar a influência da concentração de cossustrato na eficiência do processo em cada uma das unidades dos reatores em série;
 - ✓ Avaliar o emprego de reatores aeróbios dispostos em série na mineralização de corante vermelho do congo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Poluição ambiental por agentes xenobióticos

É intrínseca da natureza humana sua relação com o meio ambiente, e, geralmente, na não observância da sua capacidade de suporte, o que acarreta significativos impactos ao mesmo.

Os ambientes aquáticos são utilizados em todo o mundo com distintas finalidades, entre as quais se destacam o abastecimento de água, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a aquicultura e a harmonia paisagística. A água representa, sobretudo, o principal constituinte de todos os organismos vivos. No entanto, nas últimas décadas, esse precioso recurso vem sendo ameaçado pelas ações indevidas do homem, o que acaba resultando em prejuízo para a própria humanidade (MORAES e JORDÃO, 2002).

A contaminação ambiental da água é um problema mundial e insere-se ainda mais visto que há tendência de escassez do recurso para o uso no abastecimento humano, tanto das gerações futuras, quanto as gerações atuais.

O uso da água, dependendo da função para qual foi empregado, gera resíduos líquidos que apresentam características tóxicas e incompatíveis com a saúde humana e ambiental, uma vez que eles são lançados em corpos receptores e podem degradar sua qualidade.

Com o avanço das atividades industriais houve variada produção de substâncias químicas sintéticas de degradação difícil, conhecidas como xenobióticos, e que introduzidas no meio ambiente, prejudicam o ecossistema e o próprio homem (MELO e AZEVEDO, 2008).

Os autores supracitados retificaram que os xenobióticos são substâncias químicas produzidas pelo homem e que, após cumprirem sua função, invariavelmente, são descartadas no ambiente, alterando o equilíbrio do ecossistema e pondo em risco a saúde humana.

Nos últimos anos, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos têm aumentado de forma alarmante, como resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente. Neste contexto, o setor têxtil apresenta especial destaque. Considerando tanto o volume quanto a composição, o efluente gerado pela indústria têxtil é classificado como o mais poluidor entre todos os setores industriais (NIEBISCH, 2009).

Assim, técnicas para reciclagem e conservação da água em processos industriais estão se tornando cada vez mais importantes, especialmente em ramos como a indústria têxtil, que consome grande volume de água e de produtos químicos, com consequente produção de grandes quantidades de efluentes com elevadas cargas poluentes, a maioria constituída de diversos corantes e de matéria orgânica (BÖHMER *et al.* 2010)

Conforme Dellamatrice (2005), as indústrias têxteis contribuem amplamente para a contaminação ambiental, devido à grande produção de resíduos com níveis baixos de degradação, onde se incluem os corantes provenientes das etapas de tingimento, nas quais são descartados efluentes com intensa coloração. Não obstante, este tipo de efluente possui uma composição extremamente variável, pois há diversidade de corantes utilizados diariamente.

Estima-se que o Brasil seja responsável por 2,6% da demanda mundial de consumo de corantes têxteis e que 20% destes sejam descartados em efluentes, devido à perda ocorrida durante o processo (CUNICO *et al.* 2009).

Portanto, a presença de corantes têxteis em efluentes confere a estes uma série de características que tendem a alterar a qualidade dos corpos d'água nos quais são despejados introduzindo nestes, substâncias recalcitrantes capazes de alterar o equilíbrio do ecossistema.

3.2. Corantes têxteis

Os corantes são substâncias empregadas para colorir vários tipos de substrato, tais como: alimentos, cosméticos, plásticos, substratos têxteis, etc. Eles são retidos ao substrato por adsorção física, formação de sais ou complexos com metais, força mecânica ou por constituição de pontes químicas covalentes (ROSALEN, 2004).

A classificação dos corantes é feita de acordo com sua estrutura química ou em função do método pelo qual é fixado à fibra têxtil, no que são denominados de: reativos, diretos, azóicos, ácidos, a cuba, com enxofre em sua composição, dispersivos, pré-metallizados e branqueadores (ABIQUIM, 2012). Guaratini e Zanoni (2000) descreveram a seguinte classificação:

Corantes reativos - São corantes contendo um grupo eletrofilico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos. Apresenta alta solubilidade em água e o estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade na cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corante.

Corantes Diretos - Caracterizam-se como compostos solúveis em água capazes de tingir fibras de celulose através de interações de Van der Waals. A afinidade do corante é aumentada pelo uso de eletrólitos, pela planaridade na configuração da

molécula do corante ou a dupla ligação conjugada que aumenta a adsorção do corante sobre a fibra. Esta classe de corantes é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo (diazó, triazo e etc.) ou pré-transformados em complexos metálicos. A grande vantagem desta classe de corantes é o alto grau de exaustão durante a aplicação e consequente diminuição do conteúdo do corante nas águas de rejeito.

Corantes Azóicos - São compostos coloridos, insolúveis em água, que são realmente sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento. Nesse processo a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, conhecido como agente de acoplamento que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio (RN_2^+) provoca uma reação com o agente de acoplamento já fixado na fibra e produz um corante insolúvel em água. Este método permite um tingimento de fibras celulósicas com alto padrão de fixação e alta resistência contra luz e umidade.

Corantes Ácidos - O termo corante ácido corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Estes grupos substituintes ionizáveis tornam o corante solúvel em água, e têm vital importância no método de aplicação do corante em fibras protéicas e em fibras de poliamida sintética. Estes corantes caracterizam-se por substâncias com estrutura química baseada em compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, ketonimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação.

Corantes a Cuba - É uma grande e importante classe de corantes baseada nos índigos, tioindigóides e antraquinóides. Eles são aplicados praticamente insolúveis em água, porém durante o processo de tintura eles são reduzidos, transformando-se em um composto solúvel (forma leuco). Posteriormente, a subsequente oxidação pelo ar ou por peróxido de hidrogênio, por exemplo, regenera a forma original do corante sobre a fibra. A maior aplicação deste tipo de corante tem sido a tintura de algodão, embora devido às suas excelentes propriedades de fixação, outros materiais também têm sido utilizados. Entretanto, como a produção química de hidrossulfito de sódio pode causar problemas ecológicos, o custo desta classe de corantes tem sido bastante alto.

Corantes de Enxofre - É uma classe de corantes que, após a aplicação, se caracterizam por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos, os quais são altamente insolúveis em água. Apresentam boa fixação, entretanto, estes corantes usualmente resultam em resíduos altamente tóxicos.

Corantes Dispersivos - Constituem uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas através de suspensão. Durante o processo de tintura, o corante sofre hidrólise e é lentamente precipitado na forma dispersa sobre o acetato de celulose. O grau de solubilidade do corante deve ser pequeno, mas definido e influencia diretamente o processo e a qualidade da tintura.

Corantes Pré – Metalizados - São corantes úteis principalmente para tintura de fibras protéicas e poliamida, sendo caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição - orto em relação ao cromóforo azo, permitindo a formação de complexos com íons metálicos. Neste tipo de tintura explora-se a capacidade de interação entre o metal e os grupamentos funcionais portadores de pares de elétrons livres, como aqueles presentes nas fibras protéicas.

Corantes Branqueadores - As fibras têxteis no estado bruto apresentam como característica aparência amarelada por absorver luz particularmente na faixa de baixo comprimento de onda. A diminuição dessa tonalidade tem sido obtida através da oxidação da fibra com alvejantes químicos ou utilizando os corantes brancos. Estes corantes apresentam grupos carboxílicos aliados a sistemas benzênicos, naftalênicos, pirênicos e anéis aromáticos que proporcionam reflexão por fluorescência.

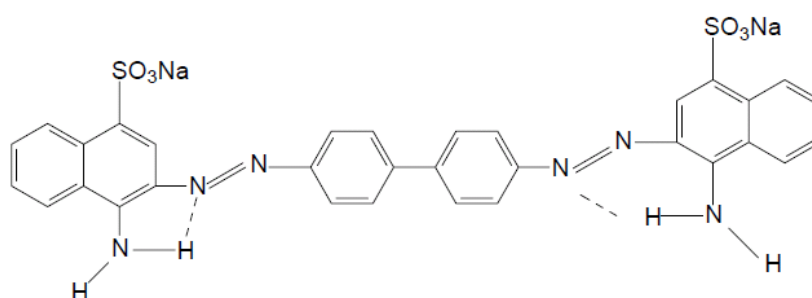
A classe de corantes com maior número de representantes utilizados pela indústria têxtil (60 a 70%) é a dos azóicos e sua participação entre reativos, ácidos e diretos é ainda maior, por isso fazem parte da constituição da maior parte dos efluentes destas indústrias (GOMES *et al.* 2009).

A principal característica dos corantes azóicos é a ligação de anéis aromáticos por grupos $-N=N-$ cromóforos que, somada às substituições de auxocromos ($-OH$; $-SO_2$ etc), contribuem para a alta resistência destes corantes aos processos de degradação química e microbiológica (GOMES *et al.* 2009). Afkhami e Moosavi (2010) citaram que outro fator contribuinte para a resistência destes corantes e sua estabilidade físico-química, térmica e

óptica é sua complexa estrutura aromática, fato este também citado por Srinivasan e Viraraghavan (2010).

Na Figura 1 está representada a estrutura química do corante azo vermelho do congo.

Figura 1– Estrutura do corante azo vermelho do congo.



Fonte: Damasceno (2008)

Na Tabela 1 estão representadas algumas características gerais do corante vermelho do congo.

Tabela 1–Características do corante vermelho do congo.

Fórmula Química	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$
Massa Molar	696,66
Número do “Color Index”	22120
$\lambda_{\text{máximo}}$	500

Fonte: Binupriya *et al.* (2008).

3.3. Impactos ambientais do lançamento de corantes

A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna. A economia de água em processos produtivos vem ganhando especial atenção devido ao valor agregado que tem sido atribuído a este bem, através de princípios como consumidor pagador e poluidor pagador incorporados em nossa legislação, através da Lei nº. 9433/97 (NASCIMENTO, 2008).

Em decorrência das tendências e demanda dos consumidores, o setor industrial tem cada vez mais desenvolvido novos reagentes, processos, maquinaria e técnicas para a confecção de seus produtos, colocando o ambiente em contato com diversos poluentes e interrompendo o equilíbrio natural, devido à toxicidade destes compostos. Entre as indústrias

mais problemáticas em termos de liberação de contaminantes no meio ambiente estão aquelas que produzem efluentes coloridos em seus processos (FRANCISCON, 2010).

Dentro deste contexto, o setor têxtil apresenta destaque especial, devido ao seu grande parque industrial instalado gerar grandes volumes de efluentes, os quais, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental (SILVA FILHO *et al.* 2007).

Devido à sua própria natureza, a presença de quantidades muito pequenas de corantes já torna o efluente colorido (NIGAM *et al.* 2000). Ao aumentar a turbidez da água e impedir a penetração de luz solar, estes rejeitos diminuem a atividade fotossintética de alguns organismos e provocam distúrbios na solubilidade dos gases, causando danos nas guelras e brânquias dos organismos aquáticos (NIEBISCH, 2009).

As quebras das ligações dos corantes, principalmente os que possuem a função azo são responsáveis pela formação de subprodutos e outros intermediários com potencial carcinogênico e por isso é preciso a remoção destes corantes antes da disposição desses efluentes nos corpos receptores (DAMASCENO, 2008).

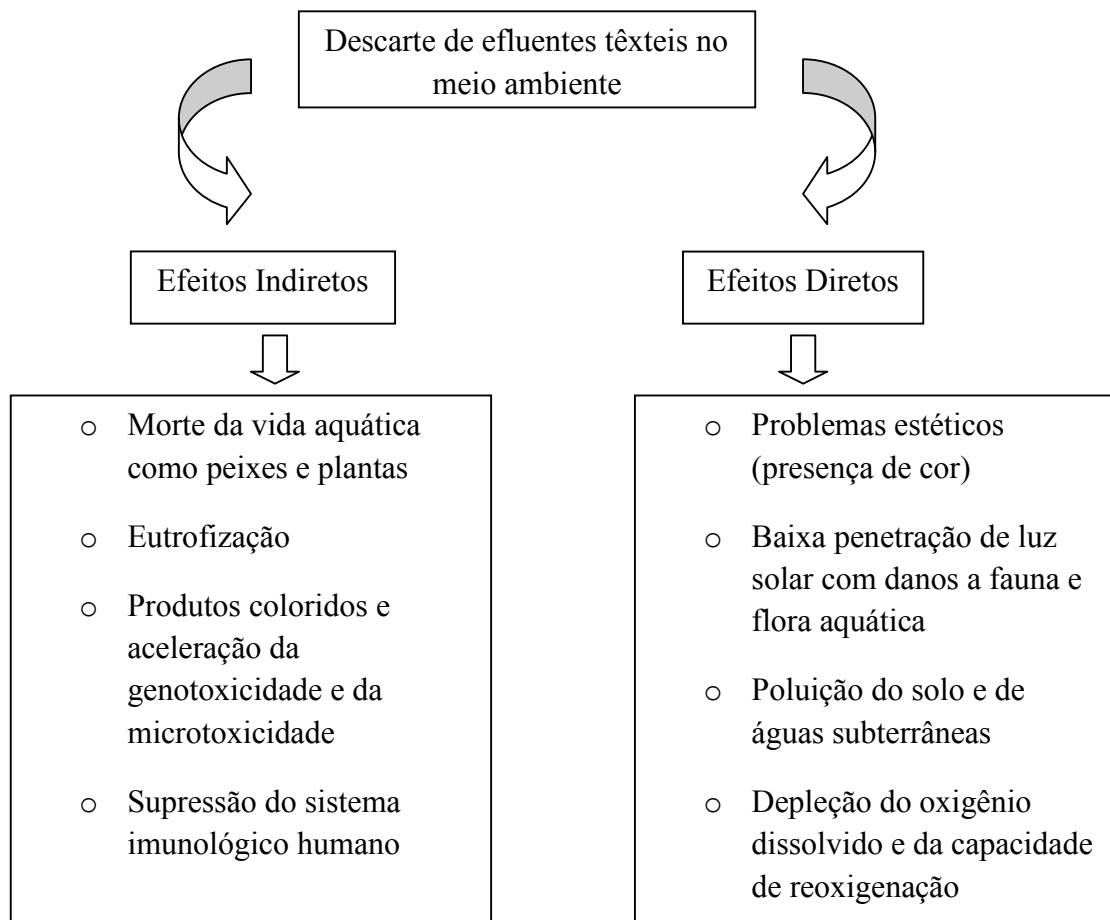
Os principais corantes que apresentam potencial carcinogênico são os pertencentes à classe de corantes azóicos (SPADARO *et al.* 1992; BHATTACHARYA *et al.* 2011). O primeiro passo na redução catabólica de corantes azóicos é acompanhado por uma diminuição na absorção de luz visível e, em seguida, a descoloração do corante (redução da ligação azo) que produz aminas aromáticas, algumas das quais são conhecidas como cancerígenas (NIEBISCH, 2009).

As aminas aromáticas são identificadas como compostos aromáticos com substituintes amino e que podem variar quanto à estrutura, radicais e substituintes. São oriundas da degradação de corantes que contenham grupos sulfonados e azo, o que favorece sua recalcitrância no meio ambiente (PINHEIRO *et al.* 2004).

Os corantes podem exercer toxicidade a certas formas da vida aquática devido à presença de metais substituintes e cloreto, sendo carcinogênicos e mutagênicos, existindo relatos de efeitos carcinogênicos em humanos (BINUPRIYA *et al.* 2008). As reações químicas de redução que envolvem azo corante, mediadas pelas *azoreductases*, podem dar origem a hidroxilamina e a aminas aromáticas que danificam o DNA.

Além disso, existem outros efeitos que os corantes e as águas residuárias têxteis podem causar no meio ambiente, e segundo Verma *et al.* (2012), podem ser efeitos diretos e indiretos. Na Figura 2 está representado esquema que agrupa os efeitos de efluentes têxteis classificando-os em direto e indireto.

Figura 2–Representação esquemática dos efeitos de efluentes têxteis no ambiente.



Fonte: adaptado de Verma *et al.*(2012).

A remoção de corantes de efluentes industriais é uma tarefa desafiadora, porque, em geral, eles são estáveis e de difícil biodegradação. Apesar de sua coloração bem visível, em geral, a concentração do corante no efluente é variável, afetando não só a estética, mas a transparência das águas e a solubilização de gases em lagos, rios e outros corpos aquáticos, causando danos à flora e à fauna (PASCHOAL e TREMILIOSI-FILHO, 2005).

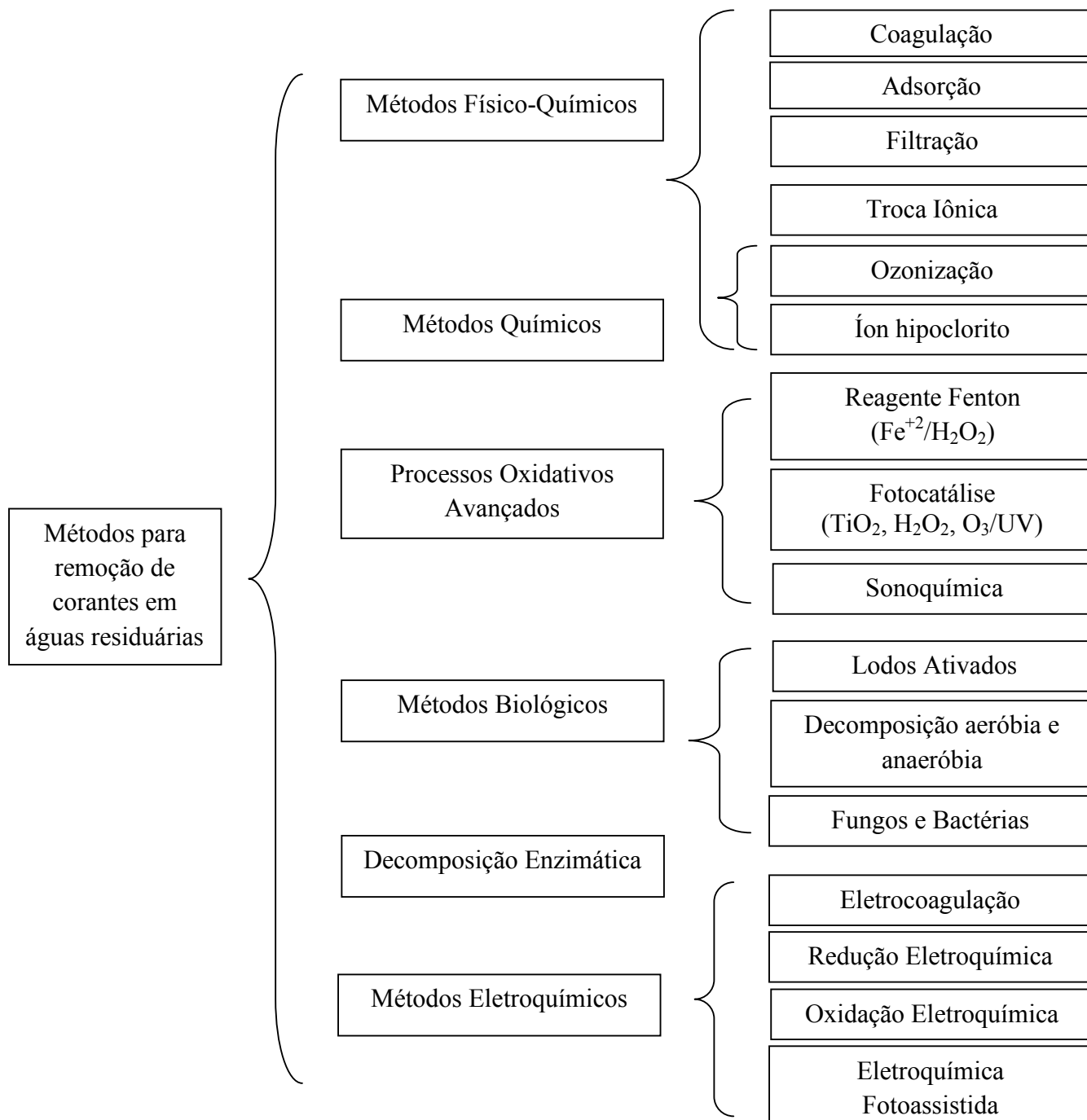
Neste enfoque, apesar de reconhecer a representatividade do setor para o desenvolvimento econômico nacional, verifica-se a necessidade de tecnologias capazes de minimizar danos que o setor pode causar no meio ambiente. Estima-se que, de uma forma geral 20% dos corantes têxteis utilizados no tingimento dos tecidos sejam descartados em efluentes devido às perdas ocorridas durante o processo (DELLAMATRICE, 2005).

Portanto, visando obedecer à legislação vigente, faz-se necessário o uso de técnicas e metodologias capazes de promover a remoção de cor de águas residuárias que contenham corantes, como uma etapa anterior ao descarte.

3.4. Tecnologias para remoção de corantes

Na Figura 3 é mostrado esquema geral sobre os diversos métodos existentes para remoção de corantes em águas residuárias industriais.

Figura 3–Métodos para remoção de corantes têxteis em águas residuárias.



Fonte: Martínéz-Huitle e Brillas *et al.* (2009).

As principais tecnologias para remoção de corantes presentes em efluentes têxteis e coloridos agrupam técnicas físicas, químicas e biológicas, bem como métodos ditos

emergentes, como os processos oxidativos avançados e as técnicas de sonoquímica (MARTINÉZ-HUITLE E BRILLAS *et al.* 2009)

Segundo Anjaneyulu *et al.* (2005) os métodos físico - químicos incluem a irradiação, a adsorção e a troca iônica. A adsorção é um processo rápido e que envolve mecanismos de transferência de fase (líquido-sólida), no qual o poluente fica adsorvido ao adsorvente, porém sua desvantagem reside no custo implicado, bem como nas grandes quantidades de adsorvente que devem ser utilizadas.

A irradiação se utiliza de raios gama para a remoção de uma série de componentes tóxicos, como os corantes, ela provoca alterações conformacionais na molécula decorrentes de elétrons no estado excitado, o que no caso dos corantes, reduz a coloração. Sua desvantagem consiste nos custos para manutenção da técnica (MARTINÉZ-HUITLE E BRILLAS *et al.* 2009). A troca iônica não é muito utilizada para o tratamento de águas residuárias, devido ao grande volume gerado destas, o que tende a tornar a técnica mais onerosa (SALGADO *et al.* 2009).

Os métodos químicos abrangem as reações de oxidação, coagulação e precipitação. A Tabela 2 ilustra os principais mecanismos de remoção através de métodos químicos e suas associações, onde, citam-se suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2– Vantagens e desvantagens dos tratamentos físico-químicos utilizados para remoção de cor em efluentes têxteis.

Métodos	Vantagens do método	Desvantagens do método
Reagente Fenton	Descoloração efetiva de corantes solúveis e insolúveis	Geração de lodo
Ozonização	Aplicação no estado gasoso, não havendo alteração de volume	Curto tempo de meia vida do gás
Oxidação fotoquímica	Não há formação de lodo	Formação de subprodutos
Oxidação com NaOCl	Acelerado processo de quebra em corantes azos	Geração de aminas aromáticas
Destruição eletroquímica	Quebra de compostos recalcitrantes	Alto custo
Coagulação eletroquímica	Viável economicamente	Alta produção de lodo

Fonte: Couto (2009).

No que se refere à sonoquímica, esta técnica consiste no emprego de ondas de ultrassom, que variam de cerca de 20 kHz a 10 MHz, para a destruição de espécies orgânicas em soluções aquosas. Essas ondas, inaudíveis para o ouvido humano, consistem de ciclos de compressão e expansão. Os ciclos de compressão exercem uma pressão positiva em um líquido, juntando as moléculas entre si; os ciclos de expansão exercem pressão negativa, afastando as moléculas entre si (GODOY-ILHA *et al.* 2004).

O termo “POA” – processos oxidativos avançados – é usado para descrever os processos oxidativos em que radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$) altamente reativos atuam como oxidantes principais. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é a fonte mais comum de radicais $\bullet\text{OH}$, seja por sua decomposição catalítica na presença de íons metálicos ou de óxidos semicondutores, ou por irradiação com luz ultravioleta (UV). Os radicais $\bullet\text{OH}$ são extremamente reativos e fortes agentes oxidantes ($E^\circ = 2,8 \text{ V}$), capazes de mineralizar contaminantes orgânicos por reações sucessivas de oxidação podendo, inclusive, em alguns casos, originarem intermediários ou subprodutos mais tóxicos do que os compostos originais (SALGADO *et al.* 2009).

Dentre as opções mais econômicas e viáveis para o tratamento de efluentes coloridos, os sistemas biológicos se apresentam de baixo custo, entretanto, podem ser bastante complexos (MÉNDEZ-PAZ *et al.* 2005). Os métodos biológicos mais comumente empregado no tratamento destes despejos incluem os aeróbios e anaeróbios, como os lodos ativados e os filtros anaeróbios, respectivamente.

O uso de processos aeróbios denominados de lodos ativados é muito comum em indústrias para tratar efluentes com corantes. Estes processos são eficientes na remoção da matéria orgânica, apresentando ainda, outras vantagens como tempo de detenção baixo (quatro a oito horas), menor área requerida e a maior flexibilidade operacional. Porém não são capazes de promover a degradação dos corantes, que ficam adsorvidos na massa bacteriana, resultando em grande quantidade de lodo colorido a ser disposto em aterros, além dos inconvenientes como o de ser bastante suscetível à composição do efluente (cargas de choque), de produzir um grande volume de lodo, e ter um elevado custo de operação (VON SPERLING, 2005; FRANCISCON, 2010).

Já o uso do tratamento anaeróbio, embora seja muito difundido, pode ter sua eficácia comprometida, pois este processo gera como produtos intermediários aminas aromáticas carcinogênicas (BARBOSA, 2009). A redução de corantes sob condições anaeróbias é uma combinação de mecanismos biológicos e químicos, sendo a contribuição biológica dada por enzimas especializadas, as azoredutases que estão presentes em bactérias que são capazes de

crescer usando unicamente os corantes como fonte de carbono e energia. A contribuição química para a redução do corante azo e a subsequente remoção da cor, sob condições anaeróbias, pode envolver ainda redutores biogênicos como sulfeto, cisteína, ascorbato e Fe^{+2} (CORRÊA, 2009).

Apesar dos sistemas anaeróbios apresentarem considerável remoção da cor, a possibilidade de formação de subprodutos tóxicos que podem permanecer refratários no efluente se constitui aspecto negativo para a utilização da tecnologia anaeróbia. Entretanto, na literatura, é reportado que para alcançar a completa degradação dos azocorantes, alguns estudos têm incluído um estágio aeróbio depois do anaeróbio visando à biodegradação das aminas aromáticas produzidas (FRANCISCON, 2010).

Como exemplo de tratamento combinado anaeróbio/aeróbio cita-se o trabalho de Koupaie *et al.* (2012), no qual os autores aplicaram um reator de leito móvel com biofilme aeróbio como unidade de pós-tratamento para remoção de aminas aromáticas oriundas de efluentes tratados anaerobiamente através de um reator que degradou o azo corante Acid Red 18 na concentração de 100 mg/L. Estes autores verificaram que houve 80% de remoção aeróbia do subproduto 1-naftilamina-4-sulfonato (amina aromática advinda da remoção de 98% de corante no reator anaeróbio), e remoção máxima de 72% de matéria orgânica, em termos de DQO, para o mesmo efluente tratado anaerobicamente, exibindo assim que houve uma considerável parcela de mineralização do efluente. Contudo, ao aumentarem a concentração de corante, constataram, através de testes respirométricos, a inibição do crescimento da biomassa em ambos os reatores.

Ainda dentro dos sistemas biológicos de tratamento, vários estudos têm sido realizados utilizando fungos com capacidade de degradar corantes têxteis, sendo relatado que as principais vantagens da utilização de sistemas enzimáticos dos fungos estejam na sua aplicação em biorremediação de materiais recalcitrantes, atuação em altas e baixas concentrações de compostos tóxicos contaminantes, bem como em amplo espectro de pH temperatura e salinidade, entre outras (SOUSA e ROSADO, 2009).

O papel de fungos no tratamento de águas residuárias têm sido extensivamente pesquisado e estes, através de pesquisas já realizadas, demonstraram ser uma classe de micro-organismos viáveis para o tratamento de efluentes e para remoção de corantes têxteis (RODRIGUES *et al.* 2011; SINGH *et al.* 2011).

Desde a década de 1980, fungos da podridão branca (basidiomicetos) vêm sendo utilizados como alternativa para realizar a remoção de cor de efluentes e a degradação de compostos xenobióticos, o que é atribuído à sua capacidade de produzir complexos

enzimáticos capazes de degradar grande variedade de compostos, permitindo assim a sua aplicação em uma série de processos biotecnológicos, baseados na degradação das estruturas de diversos compostos aromáticos (RODRIGUES; FERNÁNDEZ; BERMÚDEZ, 2003; MIELGO *et al.* 2002).

A biorremediação utilizando fungos basidiomicetos na remoção de compostos recalcitrantes como clorofenóis, poliaromáticos, corantes têxteis, dentre outros, foi testada e os resultados são promissores quanto à utilização desses micro-organismos no tratamento biológico de rejeitos, sejam de origem natural, sejam eles de origem sintética (COUTO, 2009).

3.5. Fungos - aspectos fisiológicos

É estimado hoje que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, e desse número são conhecidas pelos micologistas somente cerca de 69.000 espécies. Os fungos utilizam uma variedade de substratos como fontes de carbono, entretanto, alguns grupos se especializaram em degradar substratos particulares. Por essa razão os fungos são encontrados em praticamente todos os ambientes no planeta (SILVA e COELHO, 2009).

Os fungos podem ocupar diversos nichos ecológicos, parasitando tecidos vivos ou de forma sapróbia (alimentando-se de uma grande diversidade de substâncias orgânicas não-vivas). O crescimento e as atividades metabólicas dos organismos são respostas às condições físico-químicas do ambiente que os rodeiam. Em caso de um meio impróprio para o crescimento, os fungos, como todos os organismos vivos, podem modificar seu ambiente tornando-o habitável e propício para o seu crescimento normal sendo necessária, para tanto, a disposição dos elementos essenciais como alguns açúcares, aminoácidos, vitaminas, etc (CARDOSO *et al.* 2009).

Na Tabela 3 são retratados os principais componentes requeridos pelas células fúngicas para o desempenho de suas atividades metabólicas.

Tabela 3–Elementos requeridos para a célula fúngica.

Elemento	Fontes	Funções celulares
Carbono	Açúcares	Elemento estrutural da célula fúngica e fonte de energia
Nitrogênio	Sais de amônia, uréia, aminoácidos	Participação na estrutura e formação de proteínas, aminoácidos e enzimas
Oxigênio	Ar, O ₂	Substrato para a respiração
Hidrogênio	Prótons	Próton transmembranar vital para o transporte de nutrientes na célula
Fósforo	Fosfatos	Formação de ácidos nucléicos e membranas celulares
Potássio	Sais de K ⁺	Atividade enzimática e balanço iônico
Magnésio	Sais de Mg ⁺²	Atividade enzimática e estrutura celular
Enxofre	sulfatos e metionina	Formação de aminoácidos e vitaminas
Cálcio	Sais de Ca ⁺²	Segundo sinal nos processos de transdução
Cobre	Sais cúpricos	Pigmento redox
Ferro	Sais férricos	Hemeproteínas e citocromos
Manganês	Sais de Mn ⁺²	Atividade enzimática
Zinco	Sais de Zn ⁺²	Atividade enzimática
Molibdênio	Na ₂ MoO ₄	Metabolismo do nitrato e Vitamina B12

Fonte: Kavanagh (2005).

As atividades metabólicas celulares são mediadas por enzimas, sendo a capacidade enzimática uma característica intrínseca a cada espécime. A ausência de enzimas específicas pode fazer fracassar o crescimento de um fungo em um determinado substrato, talvez por ser incapaz de digeri-lo. As enzimas necessárias para o crescimento do fungo (enzimas constitutivas) já estão presentes, mas a presença do substrato é necessária para induzir a síntese ou a atividade da enzima para a degradação do substrato, sendo conhecidas como enzimas induzíveis. Além disso, os fungos podem também produzir enzimas adaptativas na presença de algum substrato que, normalmente, não utiliza (LOGUERCIO e ESPOSITO, 2004).

Para o crescimento e desenvolvimento metabólico dos fungos, a principal fonte de carbono é a glicose, porém, outros açúcares também são utilizados, como a sacarose e a maltose, assim como outras macromoléculas, como amido e celulose, são importantes fontes de energia para os fungos. O nitrogênio orgânico e inorgânico, sob a forma de sais de amônio ou de nitratos, pode ser utilizado por algumas espécies. Diversos oligoelementos, como ferro, fósforo, potássio, zinco, cobre, manganês, molibdênio, e vitaminas são necessários para o crescimento dos fungos (LOGUERCIO E ESPOSITO, 2004).

A membrana plasmática é a principal barreira permeável e seletiva que dita a entrada de nutrientes e a saída de metabólitos a partir da célula fúngica. O transporte transmembranar é mecanismo importante na fisiologia de fungos, uma vez que regula a taxa metabólica celular e pode controlar seu crescimento e divisão. A absorção de nutrientes, tais como os de açúcares, aminoácidos, nitrato, amônio, sulfato e fosfato, em fungos filamentosos ocorre de forma diferenciada no fungo. Enquanto estes nutrientes supracitados são absorvidos na extensão da hifa e próximo ao ápice, a absorção de proteínas ocorre, principalmente na extremidade da hifa. Assim, a absorção de nutrientes ocorre em toda a extensão das hifas e se dirigem às mitocôndrias para o fornecimento de ATP (KANAVAGH, 2005).

3.6. Fungos e o filo *Basidiomycota*

Os basidiomicetos constituem o grupo mais conspícuo dos fungos no meio ambiente e compreendem muito diferentes grupos ecológicos, alguns apresentando aplicações biotecnológicas e ambientais (SONGULASHVILI *et al.* 2007).

Muitas espécies de basidiomicetos são degradadoras de madeira e podem ser divididos em dois grandes grupos: os fungos causadores de podridão branca e os causadores de podridão parda. Os primeiros são dotados de complexo enzimático, que os tornam capazes de converter moléculas de celulose, hemicelulose e lignina em água e CO₂ (ALEXOPOULOS *et al.* 1996).

Atualmente, os fungos da podridão branca estão sendo utilizados em tratamentos de biorremediação, na degradação de poluentes ambientais recalcitrantes e em tratamentos de efluentes industriais, ocorrendo à diminuição da toxicidade dos poluentes durante o processo de descontaminação, de forma natural, não necessitando de substâncias químicas (SOUSA e ROSADO, 2009).

A importância dos basidiomicetos para o meio ambiente está relacionada com a capacidade em secretar enzimas capazes de degradar e desestabilizar moléculas orgânicas persistentes. Por essa razão, são pesquisados e utilizados para degradação de compostos

persistentes no meio ambiente, sendo relatado na literatura a capacidades destes fungos em degradar diversas moléculas poluentes, tais como corantes (ANDRADE *et al.* 2011).

Somada a produção de enzimas, outro fator para sua utilização na biorremediação é que eles são capazes de crescer sob as condições de estresse ambiental que limitam o crescimento bacteriano. Vale ressaltar que durante seu crescimento, os fungos, induzem a expansão de suas estruturas em direção à fonte de carbono orgânico, através do alongamento e ramificação das hifas permitindo a colonização de grandes áreas. Desta forma, o contato superficial com o contaminante é amplo, aumentando sua biodisponibilidade e, consequentemente, podendo ter sua biodegradação aumentada (DUPONT *et al.* 1998).

Alguns dos membros dos basidiomicetos como *Funalia trogii* (PARK *et al.* 2007), *Phanerochaete chrysosporium* (ANDRADE *et al.* 2011, ENAYATZAMIR *et al.* 2010), *Trametes versicolor* (YANG *et al.* 2009), *Irpex lacteus* (NOVOTNÝ *et al.* 2004) e o *Lentinula edodes* (CHANDER e ARORA 2004) são extremamente eficientes para a degradação de corantes têxteis.

Devido ao grande número de enzimas por eles sintetizadas, os fungos da podridão branca são considerados uns dos melhores micro-organismos para a descoloração de corantes, processo que ocorre através de rotas extracelulares e intracelulares (KAMIDA *et al.* 2005).

Na Tabela 4 são apresentados trabalhos com a utilização de basidiomicetos para tratamento de águas residuárias contendo diversos corantes, os quais foram utilizados como substrato por fungos.

Tabela 4–Pesquisas com aplicação de fungos basidiomicetos na remoção de corantes.

Fungo	Corante	Referência
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Vermelho do Congo,	Pant <i>et al.</i> 2008
	Verde de Malaquita,	
	Cristal violeta	
<i>Schizophyllum commune</i>	Cibacron Red FN 2BL	Bhatti <i>et al.</i> 2008
<i>Peniophora cinerea</i>	Remazol Brilhante Blue	Oliveira <i>et al.</i> 2010
<i>Trametes villosa</i>	R; Amarelo FN;	
	Vermelho FN	

Fonte: Autor (2013).

Pant *et al.* (2008) trabalharam com o fungo *Phanerochaete chrysosporium* para remoção de corante Vermelho do Congo em solução mineral, sob regime em batelada e em condições de agitação, e investigaram a presença de fonte de carbono e nitrogênio suplementares na eficiência do processo. Estes autores obtiveram para a concentração de corante de 15 mg/L, 89% de remoção do corante, em quinze dias de operação, e 88% de remoção de matéria orgânica, em termos de DQO, neste mesmo tempo. Estes resultados foram obtidos para as culturas suplementadas com 5g/L de glicose (fonte primária de carbono) e 2g/L de uréia (fonte de nitrogênio). Os autores informam que a adição de nutrientes como uréia e glicose foi imprescindível para a remoção do poluente e ainda ressaltam que o uso de glicose propiciou uma faixa ácida (ideal para o crescimento do micro-organismo) no experimento, em detrimento aos resultados do experimento quando realizados na ausência de cossubstrato.

Bhatti *et al.* (2008) utilizaram o basidiomiceto *Schizophyllum commune* para degradação do corante Cibacron Red em meio basal no intuito de avaliar o potencial de biodegradação deste corante pelo fungo, sob várias condições de pH, temperatura e fontes de carbono (glicose, frutose, maltose, amido e sacarose), realizando um ensaio em batelada agitada a 120 rpm, durante 10 dias. Após este período, os autores descreveram que as condições ótimas para degradação do referido corante foram aquelas na qual a temperatura esteve situada em 30°C, pH 4,5 e glicose 1% (m/v) onde obteve-se 70% de remoção.

Oliveira *et al.* (2010) avaliaram o potencial de remoção de corantes azóicos, como RBBR (Remazol Brilhante Blue R), Vermelho e Amarelo Cibacron pelos fungos *Peniophora cinerea* e *Trametes villosa* sob a influência de diferentes concentrações de sacarose em meio basal constituído por $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (0,45g/L); CuSO_4 (0,45g/L); MgSO_4 (0,45g/L); MnSO_4 (0,45g/L) e KH_2PO_4 (0,45g/L). Ao final do experimento, obtiveram remoções máximas de 89,54% (RBBR); 50% Vermelho Cibacron; 89,97% Amarelo Cibacron – para o fungo *Peniophora cinerea*, quando da adição no meio de 0,5% (m/v) de sacarose. Já o fungo *Trametes villosa*, na presença de 0,7% (m/v) de sacarose alcançou remoções de 71,50% RBBR, 84,66% Vermelho Cibacron; 77,9% Amarelo Cibacron.

Os trabalhos descritos acima demonstraram a importância do uso de cossubstrato, facilmente assimilável – frequentemente, a glicose –, para o melhor desempenho do micro-organismo em promover a degradação de corantes, pois auxilia seu rápido crescimento e a favorece a remoção do poluente.

3.7. Mecanismos de remoção de corantes por fungos

A remoção de corantes por fungos está amplamente reportada na literatura, contudo, existem alguns aspectos não totalmente esclarecidos, e que requerem maior detalhamento para o completo entendimento sobre os mecanismos de remoção por esses micro-organismos.

Os fungos, quando utilizados nos processos de tratamento de águas residuárias coloridas, se apresentam na forma de biomassa “viva” ou biomassa “inativa” e isso diferencia os três mecanismos de remoção: biosorção, biodegradação e bioacumulação (COUTO, 2009).

O mecanismo chave nos processos de biodegradação se dá através da ação de enzimas extracelulares que são capazes de agir em diversos substratos não relacionados estruturalmente e ainda promovem a solubilização de substratos insolúveis. O micélio fúngico, estrutura relacionada às enzimas extracelulares, propicia aumento na relação célula/superfície, ocasionando o maior contato físico e enzimático dos fungos com o substrato. A natureza extracelular das enzimas fúngicas também se constitui vantagem preciosa, pois permite o micro-organismo tolerar concentrações elevadas das substâncias tóxicas (KAUSHIK e MALIK, 2009).

A natureza filamentosa e a capacidade de colonização e desenvolvimento dos fungos basidiomicetos, associados à produção das enzimas ligninolíticas de forma constitutiva ou induzida (geralmente pela escassez de matéria orgânica), fazem deste grupo de micro-organismos uma ferramenta ímpar entre as novas tecnologias de baixo impacto para recuperação ambiental. No entanto, como a atuação das oxidoredutases sobre os substratos aromáticos é de natureza inespecífica, a compreensão das rotas de degradação e o monitoramento dos produtos da ação enzimática são necessários para cada caso, a fim de atestar a segurança e a afetividade do processo (HENN, 2009).

Biossorção é definida como a ligação de solutos (corante) com a biomassa através de processos que não envolvem energia metabólica ou transporte, embora tais processos possam ocorrer simultaneamente. Portanto, pode ocorrer em biomassa viva ou morta. A bioacumulação é a acumulação de poluentes por células que crescem metabolicamente ativas e que são influenciados pela temperatura, trata-se de uma adsorção do corante pela célula em crescimento e que porventura, pode ou não ser utilizado como fonte de nutriente (AKSU e DÖNMEZ, 2005). Limitações como capacidade de absorção, concentração de corante, concentrações salinas, toxicidade do corante e extremos de pH devem ser observados.

A aplicação dos fungos para o tratamento de resíduos líquidos com corantes é realizada mediante o uso de dispositivos capazes de promover um maior contato entre o meio contaminado e o agente promotor da biodegradação, no caso os reatores biológicos. Os

reatores biológicos podem se apresentar em diversas configurações e as principais ilustram os reatores em batelada e reatores contínuos. A literatura tem evidenciado o uso de reatores em batelada com biomassa imobilizada, reatores contínuos com biofilme e reatores biológicos de contato (RODRIGUES e MARINHO, 2012).

Os fungos crescem de diversas formas, conforme a configuração do reator no qual está sendo inoculado. Crescem na forma dispersa, em *pellets* e na forma imobilizada. O não controle sobre o crescimento destes pode provocar uma biomassa muito excessiva e dificultar a transferência de oxigênio e de massa (solutos) (MOREIRA *et al.*, 2003).

A imobilização de células em meio suporte apresenta diversas vantagens, pois permite a aderência dos micro-organismos em material inerte, propiciando uma maior população microbiana, maior área superficial de contato com o meio contaminado, estimula a produção de enzimas e facilita sua liberação (MOREIRA *et al.* 2003; ROMAŠKEVIČ *et al.* 2006).

Os materiais utilizados como meio suporte devem apresentar características tais que não sejam tóxicos ao micro-organismo, permitam sua aderência, e não reajam com componentes estruturais e celulares (MOREIRA *et al.* 2003). Segundo Romaškevič *et al.*, (2006) a espuma de poliuretano apresenta estas características e pode ser utilizado para a imobilização de enzimas e de células com finalidades biotecnológicas.

3.8. Enzimas envolvidas nos processos de biorremediação

O mecanismo de degradação de compostos recalcitrantes por fungos da podridão branca envolve as enzimas do grupo *fenol-oxidases*, como a *lignina peroxidase* (LiP), *manganês peroxidase* (MnP) e *lacases* (KAMIDA *et al.* 2005).

As enzimas ligninolíticas dos basidiomicetos são de importância fundamental para a bioconversão eficiente de resíduos ligninocelulósicos e se apresentam como perspectiva para as várias aplicações biotecnológicas em indústrias da polpa e do papel, do alimento, da matéria têxtil e da tintura, cosmética e bioquímica analítica, possuindo aplicações industriais e ambientais e se constituindo em um processo de baixo custo (ELISASHVILI E KACHLISHVILI, 2009).

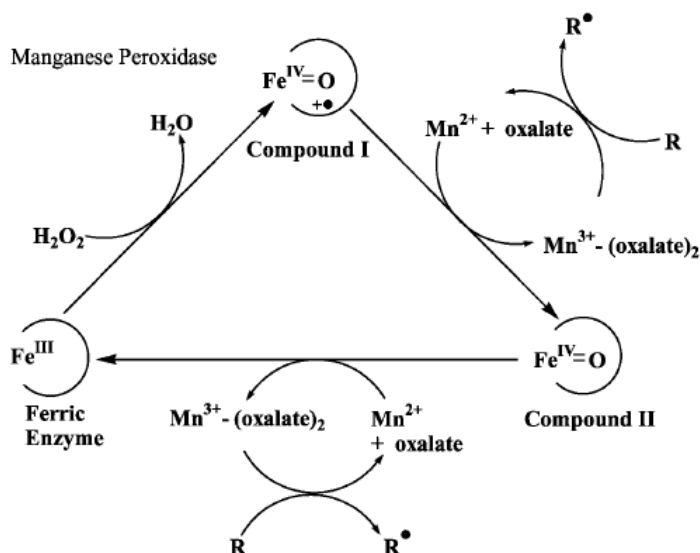
Devido ao potencial de degradação da enzima *manganês - peroxidase* (MnP), há interesse geral em produzi-la biotecnologicamente. A enzima *manganês - peroxidase* foi usada na biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), ácidos húmicos, corantes sintéticos, e bifenilas policloradas (OLIVEIRA *et al.* 2009).

A *manganês - peroxidase* é uma enzima ubíqua entre fungos ligninolíticos, sendo do tipo extracelular e contendo um grupo heme, conhecido para catalisar a oxidação de Mn^{2+} para

Mn^{3+} em uma reação que requer quelante (UREK e PAZARLIOGLU, 2005). O ciclo catalítico da enzima é mostrado na Figura 4.

Corantes sintéticos, tais como Azul Direto, Verde Direto 6, e Vermelho do congo foram tratados com extratos de MnP obtidos do fungo *Phanerochaete chrysosporium* e a maior descoloração foi observada para o Vermelho do congo (100mg/L) com 15% de remoção em apenas 15 minutos após o início do tratamento. Este é um período extremamente curto para alcançar degradação de corante azo. De acordo com os resultados, o MnP produzido pelo fungo é capaz de desempenhar importante papel na descoloração de corantes azoicos (UREK e PAZARLIOGLU, 2005).

Figura 4–Ciclo catalítico da enzima *mangânês – peroxidase*.



Fonte: Cameron *et al.*, (2007).

A lacase pode ser secretada ou agir intracelularmente catalisando tanto despolimerização quanto polimerização de seus substratos. Esta enzima catalisa a oxidação de uma variedade de doadores aromáticos de hidrogênio com a concomitante redução de oxigênio à água. Além disso, não oxidam somente ácidos fenólicos e metoxifenólicos, mas também realizam descarboxilação e demetilação destes (WESENBERG *et al.* 2003).

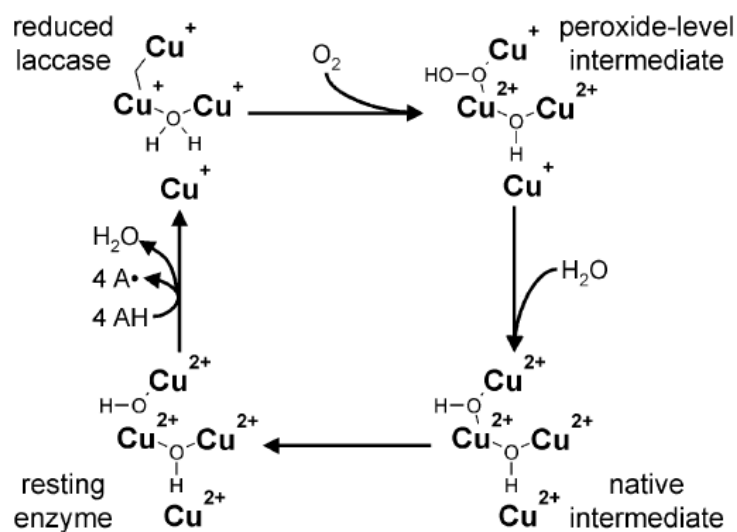
O sítio ativo da enzima inclui quatro íons cobre. O cobre tipo I age como doador de elétrons de fenóis e amidas substituídas (substratos típicos), enquanto o cobre tipo II transfere elétrons para o aceptor final, dioxigênio, o qual é reduzido à água. Já os dois íons cobre tipo III agem como intermediários da transferência de elétrons. Durante seu ciclo catalítico, ocorre a redução de um oxigênio molecular à duas moléculas de água e a concomitante oxidação de

quatro moléculas de substratos para produzir quatro radicais livres conforme ilustrado na Figura 5 (RIVA, 2006).

Entre os chamados grupos fisiológicos de fungos, as lacases são mais difundidas entre basidiomicetos causadores de podridão branca, nas formas intra e extracelular. As formas citoplasmáticas geralmente representam uma pequena fração da atividade total, e estariam envolvidas com modificações de componentes fenólicos celulares, enquanto as extracelulares atuam sobre a lignina e outros substratos de alto peso molecular (BALDRIAN, 2006).

A degradação de estruturas aromáticas pelos fungos acontece no metabolismo secundário e começa quando nutrientes como carbono, nitrogênio e enxofre se tornam limitantes, desta forma, grande parte das biotransformações são coordenadas pelas concentrações de alguns nutrientes no meio, como o carbono e o nitrogênio (BEN HAMMAN, 1997).

Figura 5—Ciclo catalítico da enzima *laccase*.



Fonte: Cameron *et al.*, (2007).

A produção e secreção de enzimas extracelulares dependem, em geral, de fatores relacionados ao seu papel fisiológico, sendo afetados pela composição do meio de cultura, pH, relação carbono/nitrogênio, temperatura, aeração e presença de substrato ou indutores específicos. Muitos autores acreditam que o fator preponderante na regulação da sua expressão é a disponibilidade de nitrogênio no meio de crescimento. Contudo, existem trabalhos que mostram que a síntese de enzimas é influenciada por fatores distintos e

independentes; nem sempre a limitação de nitrogênio, por exemplo, é um requisito fundamental para sua expressão. Íons, como o Mn^{2+} e o Cu^{2+} , já foram citados como indutores de lacases. Fatores tão diversos como a presença de álcool veratrílico, detergentes como o tween 20 e tween 80, íons, compostos fenólicos de diferentes naturezas – incluindo pesticidas, corantes e solventes - são mencionados na literatura como indutores ou repressores da produção de enzimas em várias espécies fúngica (HENN, 2009).

3.9. Importância do cossustrato na remoção e mineralização de corantes e outros poluentes

No processo de degradação de poluentes pelos micro-organismos, geralmente, visa-se a remoção completa deste no meio, incluindo a remoção dos possíveis intermediários que podem ser gerados conforme as reações metabólicas sucedidas. O processo de degradação destas moléculas, se completo, deve dar origem a moléculas menores como dióxido de carbono, água, e amônia, sendo conhecido como mineralização (CARLILE e WATKISON, 2001)

No caso particular dos corantes, visualiza-se sua remoção conforme a redução da banda correspondente ao grupo cromóforo, entretanto, pode haver no meio subprodutos como as aminas aromáticas, que, embora não imponham cor, resultam em uma banda UV-Vis não removida, sendo que, no caso de corantes azo, pode ser o grupamento benzeno. Estes mesmos subprodutos podem resultar em uma parcela de matéria orgânica, e gerarem uma má interpretação nos resultados de eficiência do sistema biológico (RODRIGUES *et al.*, 2011; FRANCISCON, 2010)

Conforme relata Sanghi *et al.* (2011) o processo de descoloração promovido por fungos, tende a ser mais eficiente na presença de uma fonte de carbono facilmente assimilada, como a glicose, resultando em ótimos percentuais de remoção. Este fato foi reiterado por Singh (2006) ao informar que o uso de cossustrato pode contribuir para maiores eficiências de remoção de poluentes, como os corantes e seus intermediários, devido à formação de compostos altamente reativos pela adição de glicose, os quais podem melhorar a assimilação dos poluentes pelos fungos e diminuir a toxicidade do meio.

Trabalhando com o fungo *Aspergillus niger* para remoção de fenol em meio sintético Rodrigues *et al.* (2007) realizaram um experimento em batelada para verificar a influência do uso da glicose na remoção de fenol e verificaram, após 5 dias, que o fungo apresentou eficiência em remover o poluente do meio com adição de glicose na concentração de 5 g/L e alcançou, aproximadamente, 100% de remoção. Segundo os autores, o uso de glicose

favoreceu obtenção de maiores velocidades de consumo do fenol e resultou em maior crescimento de biomassa e melhor eficiência de remoção de fenol e DQO do meio sintético.

Bhattacharya *et al.* (2011) utilizaram o fungo filamentoso *Aspergillus flavus* para degradação de Vermelho do Congo, em condições de agitação, na presença de 1% glicose e registraram remoção máxima de 40%, após 96 horas de operação. Estes autores afirmaram que a glicose auxilia o rápido crescimento celular, com aumento de biomassa e proporciona maior descoloração do corante, devido ao aumento da velocidade de degradação do corante na presença do referido cossustrato.

Rodrigues *et al.* (2011) trabalharam com o fungo *Aspergillus niger* imobilizado em espuma de poliuretano, em reator em bateladas sequenciais para remoção de corante Vermelho do Congo e estudaram a influência da concentração da glicose (1 g/L, 0,5 g/L) no processo, tendo um tempo reacional total de 7 dias. Conforme seus experimentos, os autores perceberam que o uso da glicose como cossustrato, na concentração de 1 g/L, resultou nos melhores percentuais de remoção, e através de cinética de 1º ordem, encontraram as maiores velocidades de remoção de corante quando do uso desta mesma concentração. Contudo, não houve mineralização completa do poluente, pois o anel benzeno que compõe a estrutura molecular do Vermelho do Congo não foi efetivamente removido do meio, conforme as análises de varredura nas amostras.

Vale ressaltar que a glicose, embora seja a fonte primária de carbono mais utilizada, não é a única relatada na literatura. Sanghi *et al.* (2009) estudaram a remoção do corante Reactive Brilliant Violet (0,1 g/L) em reator no regime batelada pelo fungo *Coriolus versicolor* investigando o uso de glicose, lactose, amido e “sabugo” de milho como fontes primárias de carbono, na concentração de 5 g/L. O ciclo que compôs o experimento teve duração de 8 dias e ao seu final, os autores registraram 95% de remoção de corante com o uso de glicose; 94% com o “sabugo” de milho; 94% para o reator com lactose e 45% para o reator com amido, tendo sugerido que o uso do “sabugo” de milho pode ser uma alternativa viável ao uso de glicose como cossustrato.

Assim, a busca de estratégias que otimizem a mineralização de poluentes como os corantes é de extrema importância para que se alcance níveis operacionais ótimos para o tratamento de efluentes e neste âmbito se inclui o estudo de uso de cossustratos e sua concentração, bem como a aplicação de reatores biológicos com configurações capazes de permitir a mineralização de poluentes.

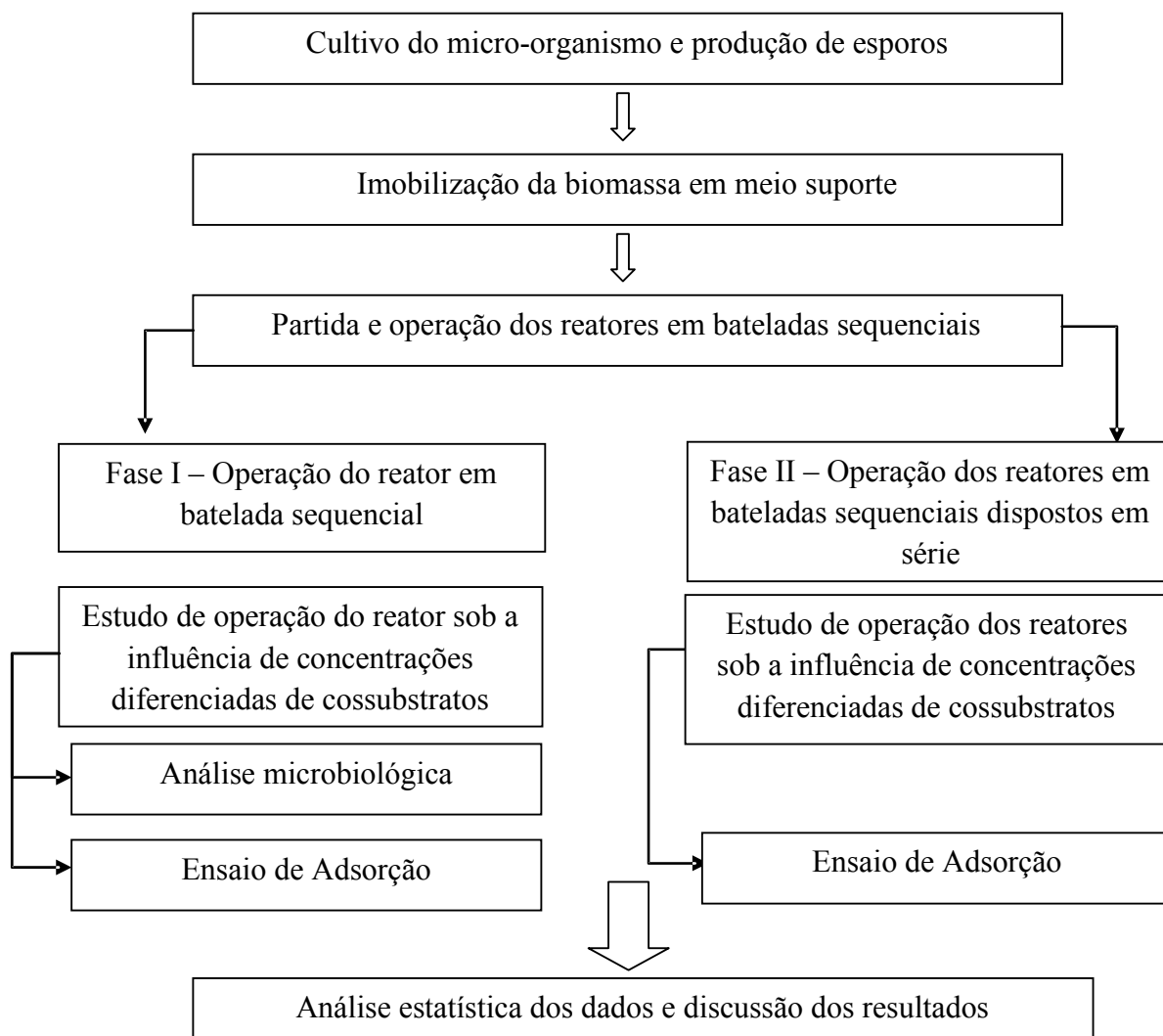
4. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental da pesquisa foi realizada no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Ceará (IFCE), visando à remoção de corante azo vermelho do congo de meio aquoso e a sua mineralização por *Phanerochaete chrysosporium* em reator operado em bateladas sequenciais.

A pesquisa abrangeu duas fases: operação de reator em bateladas sequenciais (Fase 1) e operação de reatores em bateladas sequenciais dispostos em série (Fase 2).

Na Figura 6 é apresentado o fluxograma das atividades realizadas.

Figura 6 – Fluxograma das atividades realizadas durante para os experimentos com reatores biológicos operados em bateladas sequenciais.



Fonte: Autor (2013).

Na Fase I, um reator em bateladas sequenciais foi utilizado para investigar a influência de diferentes concentrações de glicose como cossubstrato na remoção do vermelho do congo. Na segunda fase, foram utilizados dois reatores em série, R1 e R2, operados em bateladas sequenciais, com o reator R2 sendo responsável pelo pós-tratamento do efluente do reator 1.

O fungo utilizado foi escolhido por ser pertencente à classe de fungos ligninolíticos, com grande capacidade na mineralização de compostos xenobióticos. Optou-se pelo vermelho do congo como corante pelo fato do mesmo pertencer à classe azo, que representa o grupo de corantes mais utilizadas pela indústria têxtil (HUNGER, 2003) e ser de fácil aquisição.

4.1. Cultivo do micro-organismo e produção de esporos

A espécie *Phanerochaete chrysosporium* foi cultivada em meio de cultura com a seguinte composição (g/L): extrato de levedura (2), glicose (20), K_2HPO_4 (20), KH_2PO_4 (0,6), $MgSO_4$ (0,5) e peptona (2). O meio foi vertido em placas de Petri, e, em seguida, houve a inoculação do micro-organismo no mesmo.

As placas foram mantidas sob 28°C em estufa microbiológica durante sete dias, período após o qual os esporos foram removidos com uso de solução salina isotônica acrescida de Tween 80 e transferidos para tubos de ensaio. Para contagem dos esporos foi preparada solução utilizando 50 µL da suspensão, previamente agitada em agitador tipo vórtex, acrescido de 950 µL de solução Tween 80, resultando em diluição de 1:20. Posteriormente, 20 µL da solução preparada foram transferidos para uma câmara de Neubauer a fim de proceder à contagem dos esporos em microscópio óptico da marca Opton com aumento de 400x. Para o cálculo do número de esporos foi empregada a Equação 1.

$$\text{Esporos/mL} = \text{esporos contados} \times \text{diluição} \times 2,5 \times 10^5 \quad (\text{Equação 1})$$

4.2. Imobilização do *Phanerochaete chrysosporium*

A espécie fúngica foi imobilizada em espuma de poliuretano, cortada em cubos de 1 cm de aresta. Cinco gramas de espuma, previamente esterilizadas foram colocadas em redes de polietileno e, em seguida, dentro de erlenmeyeres contendo meio nutritivo com macro e micronutrientes, sendo realizada a inoculação com os esporos fungicos na concentração de 2×10^6 esp/mL. O meio nutritivo teve a seguinte composição (g/L): glicose (5); $NaNO_3$ (0,25); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1); $CaCl_2 \cdot H_2O$ (0,04); $(NH_4)_2SO_4$ (0,5); KH_2PO_4 (2); H_2MoO_4 (0,02); $MnSO_4$ (0,02); $Fe_2(SO_4)_3$ (0,02) e $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01).

Os erlenmeyeres foram mantidos sob agitação por 48 h em mesa agitadora a 150 rpm, após esse intervalo o meio de cultura foi trocado e mantido novamente por 72 h até ser transferido para o reator.

4.3. Meio Aquoso

O meio aquoso utilizado no estudo foi preparado com 0,02 g/L de corante Vermelho do Congo e macronutrientes (g/L): KH_2PO_4 (0,2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,2). Foram adicionados 10 mL/L de solução de micronutrientes que continham em sua composição (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3,0), NaCl (1,0), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,082), H_3BO_3 (0,01), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,01).

O meio basal teve seu pH inicial ajustado com adição de ácido sulfúrico 5N, pH 5, a fim de manter condições mais apropriadas para o desenvolvimento dos fungos.

4.4. Operação do reator biológico

4.4.1. Fase I

Esta fase abrigou duas etapas operacionais, caracterizadas pela variação da concentração de cossubstrato adicionado ao meio: Etapa 1 (5g/L de glicose) e Etapa 2 (1g/L de glicose). O reator, confeccionado em vidro, possui volume reacional de 4 litros e foi operado em ciclos de quarenta e oito horas (48 h).

A operação do reator em batelada sequencial compreendeu um período total de 189 dias, perfazendo 74 dias para Etapa I (5 g de glicose/L) e 115 dias para Etapa II (1 g de glicose/L). Cabe ressaltar que durante finais de semana e feriados, o reator foi alimentado apenas com meio basal sem adição de corante.

Houve introdução de oxigênio ao reator promovido por aeração mecânica através de aeradores de aquário.

4.4.2. Fase II

Nesta fase foram montados dois reatores que foram operados em bateladas sequenciais e dispostos em série, ou seja, o reator R1 foi alimentado com o meio mineral, de modo que seu efluente foi posteriormente encaminhado para o reator R2.

Os reatores foram confeccionados em vidro, com volume reacional de 4 L em R1 e de 3,5 L em R2. Em ambos os reatores o ar foi provido no meio por uso de mini-compressores. A operação dos reatores ocorreu em ciclos de 48 horas.

Esta fase foi compreendida de 2 etapas diferenciadas pela concentração de cossustrato (glicose) no reator R2: Etapa 1 (R1 – 1g/L; R2 – 1g/L) e Etapa 2 (R1 – 1g/L; R2 – 0,5g/L). A operação dos reatores compreendeu um período de seis meses.

4.5. Monitoramento dos reatores

O reator foi monitorado através das determinações de corante, matéria orgânica expressa em DQO, pH, amônia, nitrato, nitrito, fósforo total e atividade enzimática de *manganês peroxidase*.

As determinações de DQO, pH, amônia, nitrato, nitrito e fósforo total ocorreram de acordo com APHA (2005). O método de realização das análises está apresentado na Tabela 5.

A concentração de corante foi estimada espectrofotometricamente, a partir da leitura em absorbância, no comprimento de onda () de 500 nm, em espectrofotômetro UV-VIS (Biospectro - SP 220 - Brasil). Experimentalmente, foi construída curva de calibração com o uso de soluções de concentrações conhecidas de vermelho do congo, variando de 0 a 50 mg/L, sendo que antes da leitura, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm, durante 15 minutos.

Tabela 5– Variáveis monitoradas durante o desenvolvimento da pesquisa.

Variável	Método Empregado
Corante	Espectrofotometria
Amônia	Nesslerização Direta
Nitrito	Colorimétrico
Nitrato	Colorimétrico com salicilato de sódio
Fósforo total	Colorimétrico com ácido ascórbico
pH	Potenciometria
DQO	Digestão com dicromato em meio ácido

Fonte: Autor (2013).

A determinação da atividade de *manganês peroxidase* foi realizada segundo Aguiar Filho (2008). Foram utilizados tubos de ensaios, para amostras fervidas e amostras não fervidas e adicionado em cada tubo 50 μ L de $MnSO_4$, 50 μ L de H_2O_2 em tampão succinato, 100 μ L de lactato de sódio, 200 μ L de albumina bovina e 600 μ L de amostra.

Em seguida, um tubo foi fervido por 10 minutos (controle), sendo, então, retirado e resfriado. O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no

momento em que se adicionou 100 μ L de vermelho de fenol. Depois de 10 minutos, o tempo final foi determinado com a medida da absorbância após adição de 40 μ L de NaOH. As amostras e os controles foram medidos a 610 nm. Para o cálculo da atividade da enzima foi utilizada a Equação 2. Onde, Δ abs é a variação da absorbância, ϵ é o coeficiente de absorção molar ($\epsilon_{610\text{nm}} = 44600 \text{ L/M.cm}$), R é a quantidade de solução da amostra (mL) e t é o tempo de reação em minutos. UI/L é a unidade internacional, que significa $\mu\text{mol/min}$. Considera-se caminho óptico de 1 centímetro.

$$\text{UI/L} = \frac{\Delta \text{abs.}}{R \times t} \times 10^6 \quad (\text{Equação 2})$$

A determinação da enzima *lacase* também ocorreu segundo o Aguiar Filho (2008). Foram utilizados tubos de ensaios para amostras fervidas e amostras não fervidas e adicionado em cada tubo 600 μ L da amostra filtrada e 300 μ L de tampão citrato-fosfato.

Em seguida, um tubo foi fervido por 10 minutos (controle), sendo, então, retirado e resfriado. O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adicionou 100 μ L de siringaldazine. Depois de 10 minutos foi realizada outra leitura para medição da absorbância.

As amostras e os controles foram medidos a 525 nm. Para o cálculo da atividade da enzima foi utilizada a Equação 2, sendo $\epsilon_{525\text{nm}} = 65000 \text{ L/M.cm}$.

4.6. Microbiologia do reator

Ao final de cada etapa no reator, foram retiradas amostras do meio suporte contendo biomassa fúngica aderida, as quais foram preparadas e submetidas ao crescimento em placas com o objetivo de confirmar a presença da espécie fúngica inicialmente inoculada ou identificar o surgimento de outra espécie por contaminação e/ou condições favoráveis.

A biomassa aderida no meio suporte foi removida fazendo uso de erlenmeyer contendo solução isotônica, e pérolas de vidro com o intuito de aumentar o atrito através da agitação promovida por meio do Vortex.

A contagem de micro-organismos foi feita com procedimento de diluição em série e plaqueamento em meio Martin, sendo este seletivo para fungos. O meio de Martin era composto de: 1g de K_2HPO_4 ; 5 g de peptona; 0,5 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10

gde dextrose; 0,5 g de extrato de levedura; 0,033 g de rosa bengala; 18 g de ágar; 1000 mL de H₂O destilada.

Alíquotas de 1 mL foram retiradas da solução isotônica contendo biomassa e transferidas para 9 mL de solução salina. Novamente, alíquota de 1 mL foi retirada e transferida para 9 mL de solução salina e assim sucessivamente até obter-se concentrações seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Em seguida essas diluições foram plaqueadas no meio de Martin e espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky.

Em seguida as placas foram mantidas à temperatura ambiente (28°C) durante cinco dias, onde se prosseguiu com a contagem das colônias.

Vale ressaltar que durante a Fase II não foi possível realizar a contagem de micro-organismos, devido a problemas laboratoriais.

4.7. Ensaio de adsorção do corante no biofilme

Este ensaio foi realizado com o intuito de verificar a quantidade de corante vermelho do congo presente no biofilme. Para este fim, um cubo contendo biomassa imobilizada foi retirado de cada reator e transferido para erlenmeyer usando solução salina e pérolas de vidro. Em seguida, o conjunto foi submetido à agitação vigorosa para propiciar a remoção de biomassa do meio suporte. O meio foi então centrifugado a 3500 rpm e o sobrenadante foi separado da biomassa. Metanol foi utilizado como solvente para remover o corante adsorvido, de modo que 10 mL do mesmo foram transferidos juntamente com a biomassa para tubos, permanecendo em contato durante 10 min. Depois deste período, foi adicionado mais 5 mL de metanol, seguido de homogeneização e leitura espectrofotométrica à 500 nm.

4.8. Ensaio de adsorção no meio suporte

Neste ensaio foi utilizado frasco de vidro de 4 L, ao qual foram adicionados 5 g de cubos de espuma de poliuretano previamente secos em estufa. Este recipiente recebeu 1 L do meio basal acrescido de 0,05 g/L de corante vermelho do congo.

A capacidade máxima de adsorção do corante na espuma de poliuretano, empregada como material suporte foi monitorada a partir da sua concentração inicial no meio durante um período de 48 horas.

4.9. Análise de subprodutos da degradação via espectrofotometria UV-Vis

O levantamento espectrofotométrico das bandas de absorção foi realizado em todas as amostras do estudo, ao término de cada ciclo, visando avaliar de forma preliminar a

mineralização do corante e a possível formação de produtos de degradação. Para tanto, foram realizadas “varreduras” entre 200 e 800 nm das amostras filtradas em espectrofotômetro UV-Vis (Thermo *Evolution 100*).

4.10. Tratamento matemático e estatístico dos dados

Para representar o perfil espacial dos parâmetros analíticos analisados para a FaseII no tratamento biológico de meio aquoso contendo corante vermelho do congo, foram utilizadas representações gráficas do tipo *Box-plot*. Esta metodologia possibilita a visualização da assimetria da distribuição, a faixa de variação dos dados, além de permitir a detecção de possíveis pontos extremos.

As representações de *Box-plot* possibilitam ainda a visualização dos parâmetros Q1, Q3, mínimo, mediana, máximo. Estas funções representam 25% das amostras que estiveram naquele intervalo de valores, 75% das amostras que estiveram naquele intervalo de valores, o menor valor observado, a média dos valores e o maior valor, respectivamente.

Os dados obtidos em todas as etapas foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey para comparar os resultados e obter o parâmetro estatístico. As leituras foram consideradas significativas a um nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Fase I – Operação do reator em bateladas sequenciais (RBS)

Na Tabela 6 estão apresentados os valores médios para cada variável monitorada no afluente e no efluente do reator em batelada durante as etapas do estudo.

Tabela 6– Características químicas dos afluentes e efluentes utilizados durante as Etapas que compuseram o estudo na Fase I.

Parâmetro Analítico		5 g/L		1 g/L	
		Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
pH	máx	5,0	3,8	4,9	5,3
	méd	4,3	3,0	3,8	3,5
	mín	4,0	2,2	2,9	2,6
Corante (mg/L)	máx	27,6	8,7	28,3	2,1
	méd	17,4	2,3	12,2	0,3
	mín	8,5	0,2	4,6	0,0
DQO (mg/L)	máx	7546	3927	1812	739
	méd	3396	1499	1236	304
	mín	2072	595	595	164
Amônia (mg/L)	máx	120	27,8	134	83
	méd	99	16,9	76,7	27,3
	mín	71	0,3	40,1	4,3
Nitrato (mg/L)	máx	5,4	2,3	6,4	4,0
	méd	2,9	0,8	4,6	1,9
	mín	1,0	0,2	2,5	0,8
Nitrito (mg/L)	máx	1,2	0,7	1,1	0,3
	méd	0,6	0,1	0,7	0,1
	mín	0,4	0,0	0,3	0,0
Fósforo	máx	75,8	78,1	80	83
Total	méd	65,2	57,8	58	53
(mg/L)	mín	41,4	39,5	30	27

Fonte: Autor (2013).

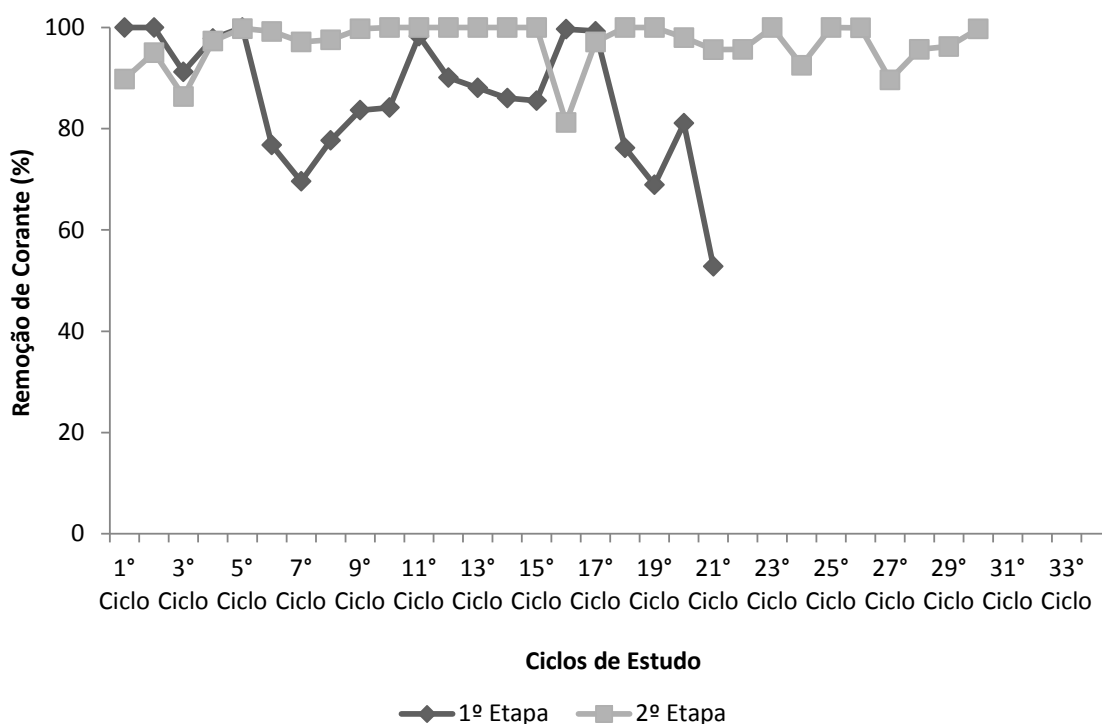
Durante as duas etapas que compuseram o estudo, os valores afluentes e efluente de pH, mantiveram-se homogêneos, sendo ratificados pela pequena alteração em seus valores, e com valores de pH característicos de meio ácido. O valor médio global do pH afluente ao reator ao longo das etapas foi de 4,2 e de 3,1 no efluente.

Quanto à concentração de matéria orgânica, representada pela análise de DQO solúvel, seus valores se mantiveram elevados durante todas as Etapas, e com concentrações distintas, devido à adição de glicose ao meio basal.

Quanto à concentração de corante, esta apresentou uma média global afluente de 28,5 mg/L e média global efluente de 4,7 mg/L.

A variação nos respectivos percentuais de remoção obtidos para cada ciclo nas etapas I, e II é mostrada na Figura 7.

Figura 7– Remoção de corante no reator com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em bateladas sequenciais.



Fonte: Autor (2013).

Em relação à remoção de corante nos ciclos estudados o reator em batelada mostrou-se eficiente, alcançando percentuais médios de remoção correspondentes a 86% e 97% para as Etapas I e II, respectivamente. Observou-se que o maior percentual foi obtido quando foi adicionada ao meio menor concentração do cossubstrato, o que demonstrou que a maior

concentração de glicose (5,0 g/L), utilizada na Etapa I, não resultou em maior eficiência de remoção do corante.

Na Etapa I os dois ciclos iniciais apresentaram 100% de remoção de corante, o que, provavelmente, ocorreu devido à adsorção inicial deste ao micélio e ao meio suporte, fato este também relatado no trabalho de Silva (2009). Logo após estes ciclos, as remoções percentuais se mantiveram entre 69% e 99%, sendo registrada remoção mínima de 53%, no último ciclo de estudo.

Na Etapa II, o reator em batelada alcançou remoções ótimas de corante sendo compreendidas entre 86% e 99%, com remoções máximas em 10 ciclos e remoção mínima de 81%, no 16º ciclo. A remoção média de corante obtida nesta etapa foi de 97%. O perfil apresentado pelo reator quanto à eficiência de remoção mostrou que o fungo foi hábil na redução da concentração de corante e tal fato pode estar associado à prévia adaptação do micro-organismo a fase anterior com glicose na concentração de 5 g/L.

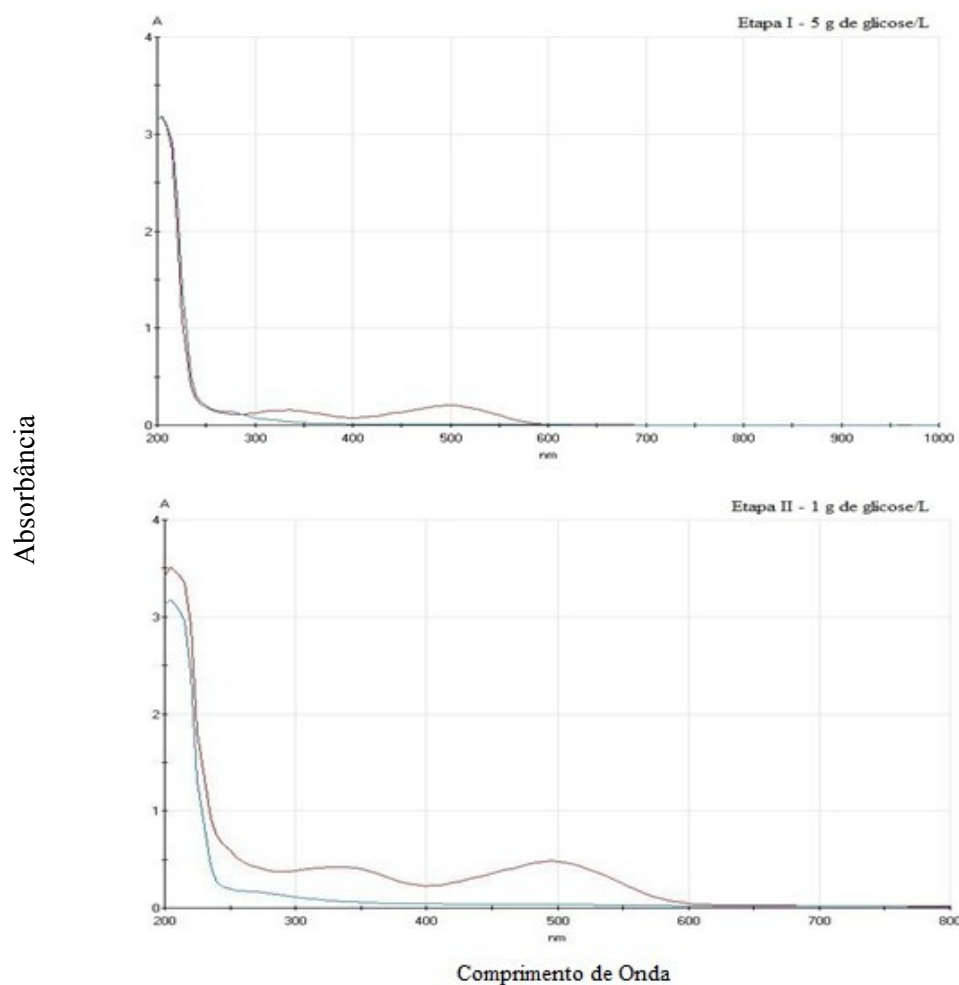
Ao se confrontar os dados de remoção de corante das duas etapas com auxílio da análise estatística ANOVA, verificou-se que a Etapa II foi aquela que propiciou o melhor desempenho ao fungo para a remoção de corante vermelho do congo no meio, sendo endossado pelo percentual médio de remoção que atingiu 97%. Sendo assim, a adição de glicose em uma maior concentração, 5 g/L, não foi fator determinante para o processo de remoção pelo micro-organismo.

A realização do espectro UV-Vis das amostras afluentes e efluentes do reator (Figura 8) após os ciclos de cada etapa finalizada, mostrou que na Etapa I houve remoção de corante baseado na redução da banda cromófora, situada em 500 nm, entretanto, não houve remoção da banda na região do ultravioleta, localizadas a 233 nm as quais identificam os anéis benzeno na estrutura do corante.

Na Etapa II foi registrada remoção da banda cromóforo (98%) e redução dos anéis benzeno (10%) e naftaleno (75%), o que indicou que houve mineralização parcial do corante vermelho do congo nesta etapa.

Pant *et al.* (2008) trabalharam com o fungo *Phanerochaete chrysosporium* para remoção de corante Vermelho do Congo (15 mg/L) em meio sintético por uso de reatores em batelada sob agitação à 150 rpm, investigando a presença de fonte de carbono e nitrogênio, e obtiveram 88,8% de remoção de corante, em quinze dias de operação, na presença de 5 g de glicose/L e utilizando uréia como fonte de nitrogênio. Semelhantemente a estes autores, na presente pesquisa foram obtidos percentuais médios de remoção de corante de 97%, utilizando concentração menor de cosubstrato e em menor período de tempo (48 horas).

Figura 8—Espectro UV-Vis para as amostras retiradas após os ciclos de 48 horas ao longo das Etapas I, e II, respectivamente.



Fonte: Autor (2013).

Em relação à remoção de matéria orgânica em termos de DQO solúvel foram alcançados percentuais médios de remoção de 56% e 76%, referentes às Etapas I e II.

A remoção de DQO durante a Etapa I variou entre 17,3% e 77,5% e apresentou grande oscilação nos percentuais, atingindo o menor percentual médio de remoção, devido à alta disponibilidade de glicose (5g/L), que sendo material orgânico facilmente oxidável, constituiu uma parcela considerável da DQO. Vale ressaltar que estes valores baixos de remoção podem também estar relacionados à formação de subprodutos de degradação do corante vermelho do congo que não são facilmente removidos e permanecem no meio, sendo assim quantificados como DQO.

Ainda durante esta etapa, pode-se verificar visualmente (Figura 9) o aumento de biomassa fúngica, que na presença de alta concentração de glicose (5g/L) tornou o biofilme

mais espesso, o que teria possivelmente ocasionando limitação difusional de nutrientes no meio e acarretado em desprendimento de biomassa, de modo que este fato, provavelmente, contribuiu também para os baixos percentuais de remoção de DQO que foram registrados.

Ainda em relação à Etapa I, provavelmente, a adição do cossubstrato em maior concentração pode ter desencadeado repressão de metabolismo microbiano, conforme relatado por SANTOS *et al.* (2008). Segundo os autores, a glicose em concentrações elevadas pode inibir a degradação do poluente, o que ratificou alguns percentuais de remoção de corante obtidos em ciclos 7º, 19º e 21º da Etapa I.

A Etapa II apresentou maior homogeneidade nos percentuais de remoção de DQO, tendo-se registrado percentual médio de $76\% \pm 11$. Os percentuais de remoção oscilaram entre 58% e 100%, e foram considerados promissores, visto que em uma menor disponibilidade de cossubstrato, os micro-organismos removeram a parcela orgânica presente no meio, junto aos possíveis produtos de degradação do poluente.

Figura 9– Crescimento do fungo no reator em batelada sequencial durante a Etapa I.

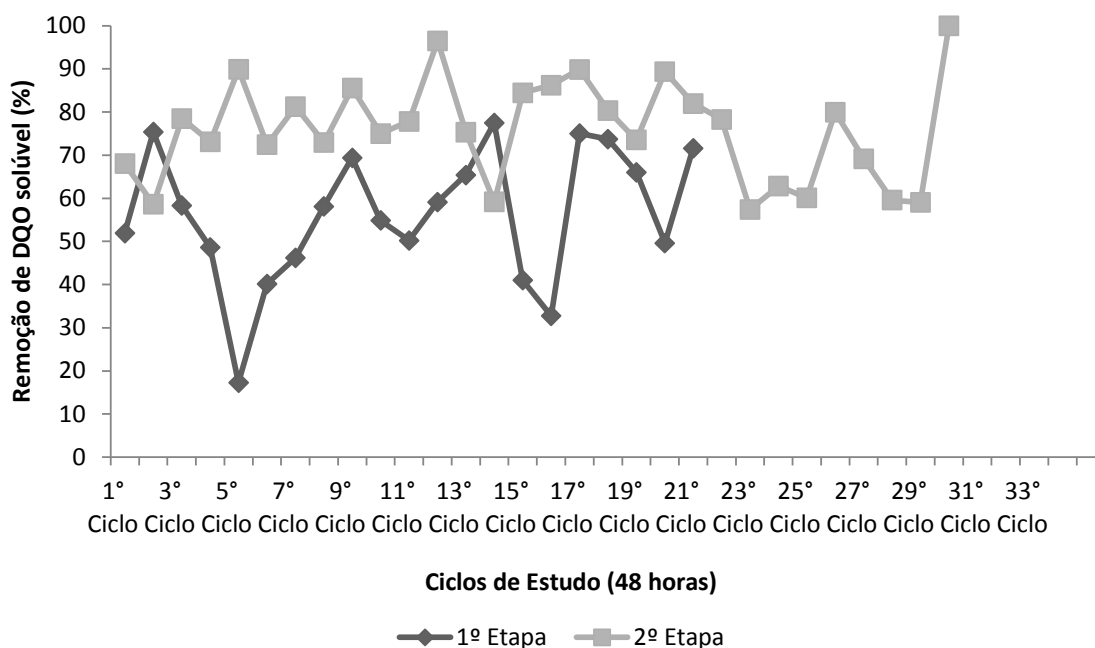


Fonte: Autor (2013).

A análise estatística das variâncias (ANOVA) identificou que houve diferenças significativas nos percentuais de remoção de corante por comparação entre as Etapas I e II ($p < 0,0036$), corroborando no fato de que as condições operacionais na Etapa II contribuíram para uma maior eficiência na remoção de DQO, assim como em corante.

A variação nos percentuais de remoção de DQO obtidos para cada ciclo nas etapas I e II é mostrada na Figura 10.

Figura 10–Remoção de DQO no reator com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas.



Fonte: Autor (2013).

Em relação à variação de pH no meio durante todas as etapas de estudo se observou a manutenção de valores baixos característicos de meio ácido. Na Etapa I foi registrado pH no efluente médio de $3,0 \pm 0,54$, e na Etapa II de $3,2 \pm 0,69$.

Na Figura 11 estão representados os valores de pH efluentes ao longo dos ciclos que compuseram o estudo nas Etapas I e II.

O pH afluente do meio sempre teve seu valor modificado para faixa ácida no intuito de auxiliar o desenvolvimento do fungo, conforme relatado Griffin (1994). A manutenção dos valores de pH nesta faixa ácida e o decréscimo destes ao longo das etapas podem ser reflexo da presença da glicose no meio, bem como de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, gerados a partir da degradação da molécula do corante.

O uso de cossubstrato, como a glicose, favorece a formação de subprodutos oriundos de sua utilização e de outras moléculas que são utilizadas como substrato pelos fungos, gerando ácidos orgânicos, e que ocasiona decréscimo nos valores de pH, justificando os valores encontrados (RODRIGUES *et al.*, 2007).

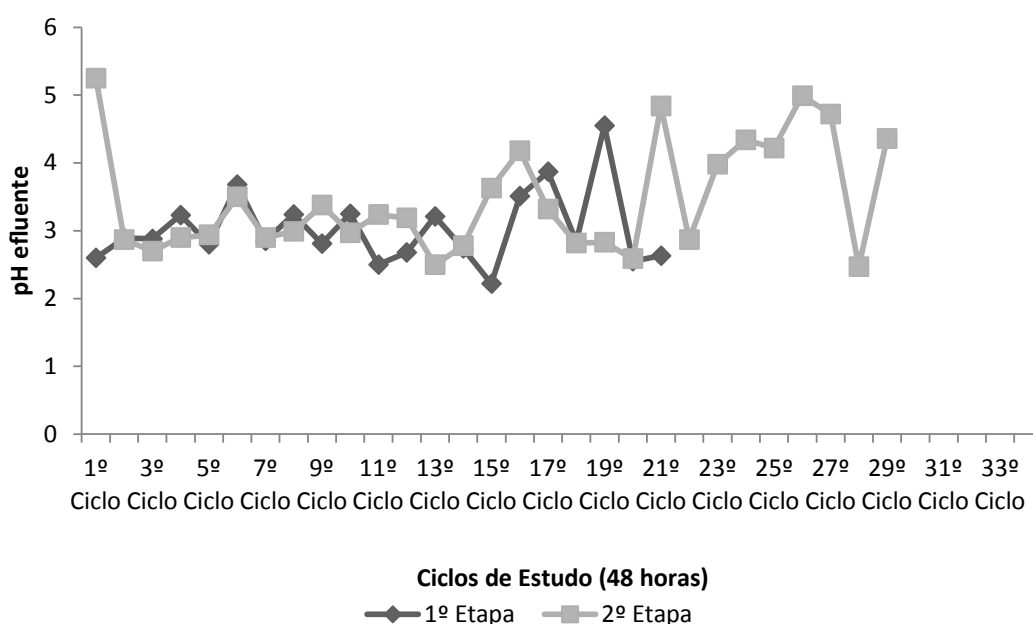
Pant *et al.* (2008) trabalharam com o fungo *Phanerochaete chrysosporium* para remoção de corante vermelho do congo em ensaio tipo batelada sob condições de agitação, com adição de glicose (5 g/L) e uréia, e verificaram no estudo um maior decréscimo nos

valores de pH para os reatores que continham apenas a glicose, já para aqueles que com glicose e uréia, os valores permaneceram na faixa neutra. Similarmente aos autores, neste trabalho foi registrada a manutenção dos valores ácidos de pH em todas as Etapas que compuseram o estudo.

Os autores supracitados relataram que a adição de glicose foi importante para a remoção do poluente e ressaltaram que o uso de glicose propiciou o estabelecimento do pH em uma faixa ácida no experimento.

Durante os ciclos 1º, 21º, 26º e 27º da Etapa II houve um acréscimo nos valores de pH efluente, sendo estes, maiores do que o pH afluente. Cabe ressaltar que os fungos podem promover mudanças no meio para se ajustar fisiologicamente a uma dada situação. Sampaio *et al.* (2004) relataram que os fungos podem excretar substâncias de caráter capaz de tamponar o pH do meio para o ajuste de suas necessidades metabólicas.

Figura 11– Variação do pH efluente no reator com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas.



Fonte: Autor (2013).

Os dados pertinentes à fração nitrogenada representada por amônia e nitrato, revelaram que ocorreu considerável remoção destas. O fungo utilizado nesta pesquisa, *Phanerochaete chrysosporium*, tem seu metabolismo influenciado pela concentração de nitrogênio no meio e, por este motivo, a pesquisa desenvolveu-se com base em concentrações

limitantes do nutriente, sendo o nitrogênio oriundo do sulfato de amônio (0,2 g/L) e da molécula de corante.

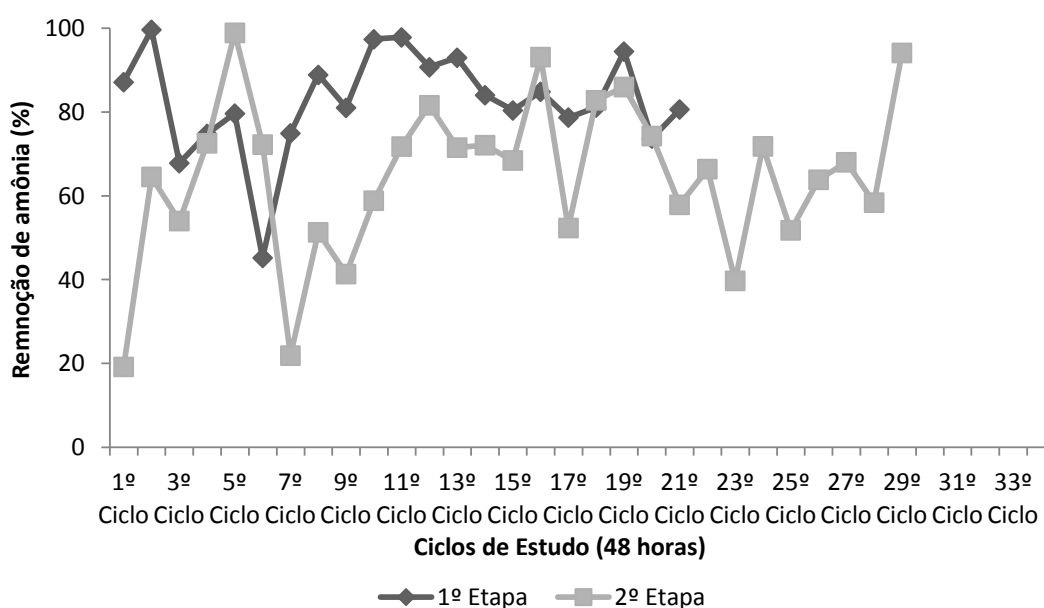
Os dados referentes à amônia mostraram remoções médias de 83%, e 65% para as Etapas I, e II, respectivamente. Durante a Etapa I houve remoção mínima de 45% e remoção máxima de 99%. Já para Etapa II houve remoção mínima de 19% e máxima de 98%.

A variação nos percentuais de remoção de amônia durante as etapas de estudo está exibida na Figura 12.

Os percentuais de remoção durante as Etapas analisados pela ferramenta estatística ANOVA mostraram que a Etapa I comparadas a Etapa II, exibe diferença significativa, $p < 0,0005$.

Ainda em relação à amônia, pode-se inferir que as maiores remoções ocorreram na presença de maior concentração de cossubstrato, ou seja, na Etapa I (5 g de glicose/L).

Figura 12–Remoção de amônia no reator com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas.

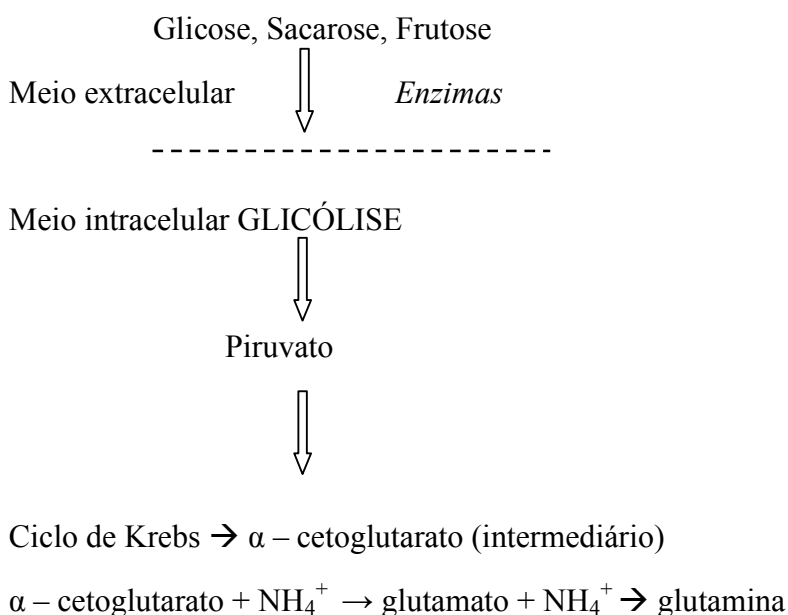


Fonte: Autor (2013).

Fato semelhante foi relatado por Lopes *et al.* (2011) que trabalhou com reator em bateladas sequenciais inoculado com *Aspergillus niger* para remoção de fenol em efluente industrial de beneficiamento da castanha de caju e em etapa operada com 1 g/L de glicose obteve remoção média percentual de amônia em 50%, sendo a remoção sobrepujada na adição de 5 g/L de glicose, onde o percentual de remoção registrado foi de 89%.

Papagianni, Wayman e Matthey (2005) afirmaram que íons amônio, armazenados no interior da célula fúngica, reagem com a glicose para formar glucosamina, composto energético de reserva utilizado pelos fungos durante a fermentação, liberando H^+ para o meio. Assim, a melhor eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal registrada na Etapa I deve estar relacionada à maior disponibilidade de glicose para a formação da glucosamina, o que teria favorecido a obtenção de maiores percentuais de remoção. A Figura 13 exibe a rota de produção de glucosamina e de utilização de carbono pela célula do fungo.

Figura 13– Esquema representativo da utilização de carboidratos até sua inserção no Ciclo de Krebs e uso em rota metabólica para produção de glutamina.



Fonte: Papagianni, Wayman e Matthey (2005).

Já em relação ao nitrato, as remoções percentuais médias alcançadas foram de 74%, e 56% para as Etapas I e II respectivamente. A variação nos percentuais de remoção de nitrato durante as etapas de estudo está exibida na Figura 14.

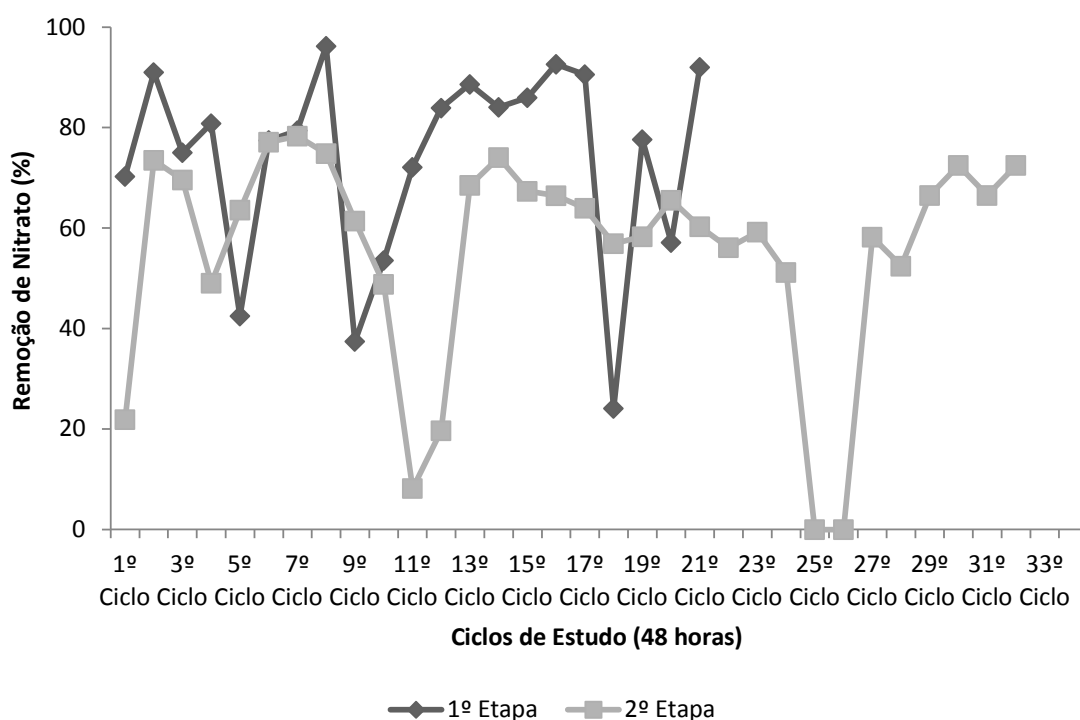
Os percentuais de remoção variaram na Etapa I entre 24% e 69%, na Etapa II entre 8% e 78%. Vale ressaltar que durante a Etapa II houve dois ciclos de acúmulo de nitrato no meio, ciclos 25º e 26º.

A remoção simultânea de ambas as fontes de nitrogênio pelos fungos foi justificada por Griffin (1994) que afirmou que estes micro-organismos são capazes de assimilar amônia e nitrato. Assim, embora a amônia seja a fonte prontamente assimilada pelos fungos, nesta pesquisa houve boa remoção de nitrato (74%) na maior disponibilidade de glicose, indicando

a versatilidade do *Phanerochaete chrysosporium* em consumir ambas as fontes de nitrogênio, sem aparente repressão da atividade dessassimilatória do nitrato.

A análise dos dados de remoção através do ANOVA permitiu inferir que uma maior concentração de cossubstrato tende a aumentar a remoção percentual de nitrato. Houve diferença significativa entre as Etapas I e II ($p < 0,0034$).

Figura 14—Remoção de nitrato no reator com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium*, operado em bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas.



Fonte: Autor (2013).

Os percentuais médios de remoção no que diz respeito ao fósforo foram baixos, tendo-se alcançado apenas 11% para a Etapa I e 5%, para a Etapa II. Mesmo sendo um elemento indispensável para a síntese de componentes celulares, este nutriente não foi removido satisfatoriamente, sendo, possivelmente suas aleatórias remoções, oriundas das necessidades metabólicas do micro-organismo.

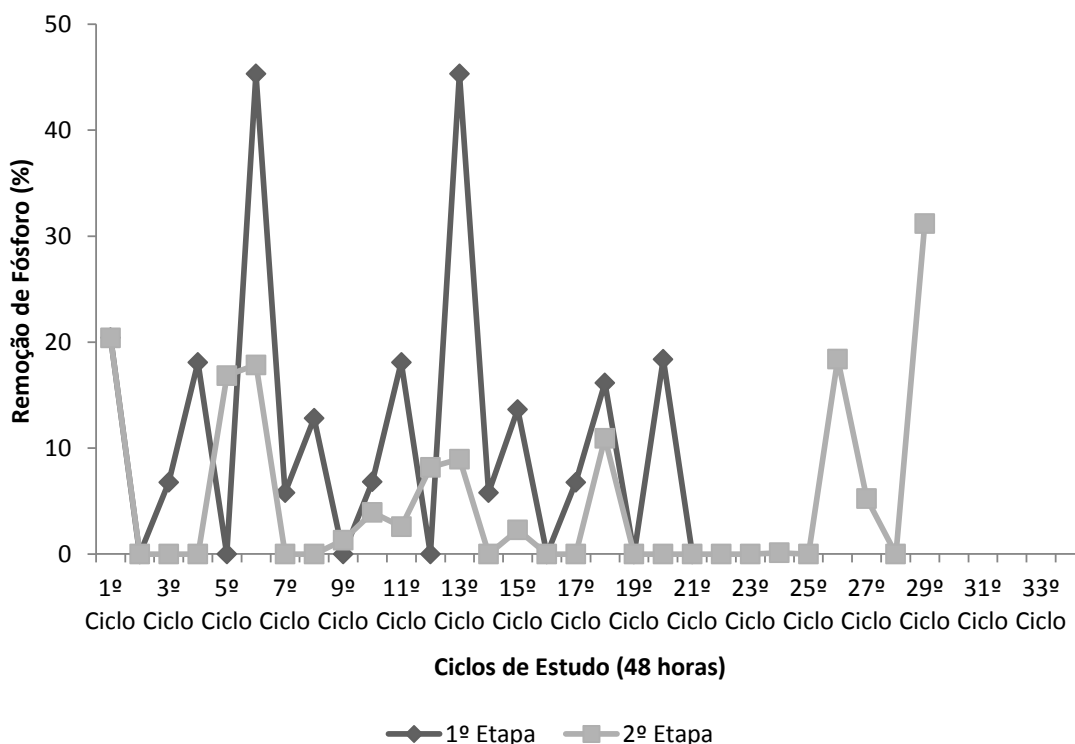
Durante sete ciclos da Etapa I houve acúmulo de fósforo no meio, já durante a etapa II, o fósforo foi acumulado no meio durante dezesseis ciclos. O acúmulo deste nutriente ocorreu sempre em ciclos aleatórios e pode ser justificado pela existência de estruturas celulares capazes de armazenar nutrientes para reserva energética, os vacúolos fúngicos (LI e KANE, 2009). Mesmo que o micro-organismo priorize o armazenamento de fósforo pode haver

liberação do nutriente no meio devido a mudanças de pH ou outras mudanças metabólicas do fungo ocasionando assim, o acúmulo do nutriente no meio basal.

Ainda em relação ao fósforo, a análise ANOVA infere que as Etapas I e II ($p < 0,0440$) apresentaram diferenças significativas.

A Figura 15 exibe os percentuais de remoção de fósforo ao longo das etapas do estudo.

Figura 15—Remoção de fósforo no reator com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium*, operado em bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas.



Fonte: Autor (2013).

A atividade da enzima *manganês peroxidase* (MnP) foi determinada nas Etapas que compuseram o estudo. O comportamento da MnP está ilustrada na Figura 16.

A enzima *manganês peroxidase* apresentou atividade em intervalo de 0,8 a 8,1 $\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}$ para a Etapa I, intervalo de 0,8 a 32,3 $\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}$ para a Etapa II.

Os maiores picos registrados durante as Etapas I, e II corresponderam aos bons percentuais de remoção de corante obtidos, ocasionando percentual médio entre estes ciclos de 92%, e 97% para as respectivas etapas o que sugeriu a existência de relação entre a ação enzimática de *manganês peroxidase* e a degradação do corante vermelho do congo.

Estudando o gênero *Phanerochaete* sp. na descoloração de meio aquosa sob limitação de nitrogênio e de carbono, Hailei *et al.* (2009) trabalharam em meio sintético com 350 mg/L de corante, em ensaio batelada sob agitação artificial, e utilizando 10^7 esporos/mL como inóculo dos reatores, obtiveram em 8 horas de experimento, remoções de 95%, 95% e 97% para os corantes vermelho do congo, metil orange e eriocromo black T, respectivamente. Segundo os mesmos autores, a indução e a presença da enzima *manganês – peroxidase* foi fundamental para o processo de descoloração do meio.

Quando se comparou as Etapas I e Etapa II, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) e a concentração média registrada de $3,6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min}$ na Etapa I e $9,4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min}$ na Etapa II.

A glicose (fonte de carbono) é um dos fatores que influencia na produção de enzimas, quando há baixa concentração (carbono limitado) há baixa produção de enzimas, do contrário, altas concentrações de carbono (carbono em excesso) há maior produção de enzimas, contudo, o carbono é apenas um fator; existem outros que regulam a produção de enzimas e que em sinergismo a concentração deste nutriente, afeta a liberação e estabilidade destas no meio, podendo-se citar o pH, a temperatura, o oxigênio dissolvido, a agitação, a concentração de nitrogênio e a presença de micronutrientes (molibdênio, zinco, cobalto) (BUSWELL, 1995; LEUNG e POINTING, 2002; SINGH e CHEN, 2008)

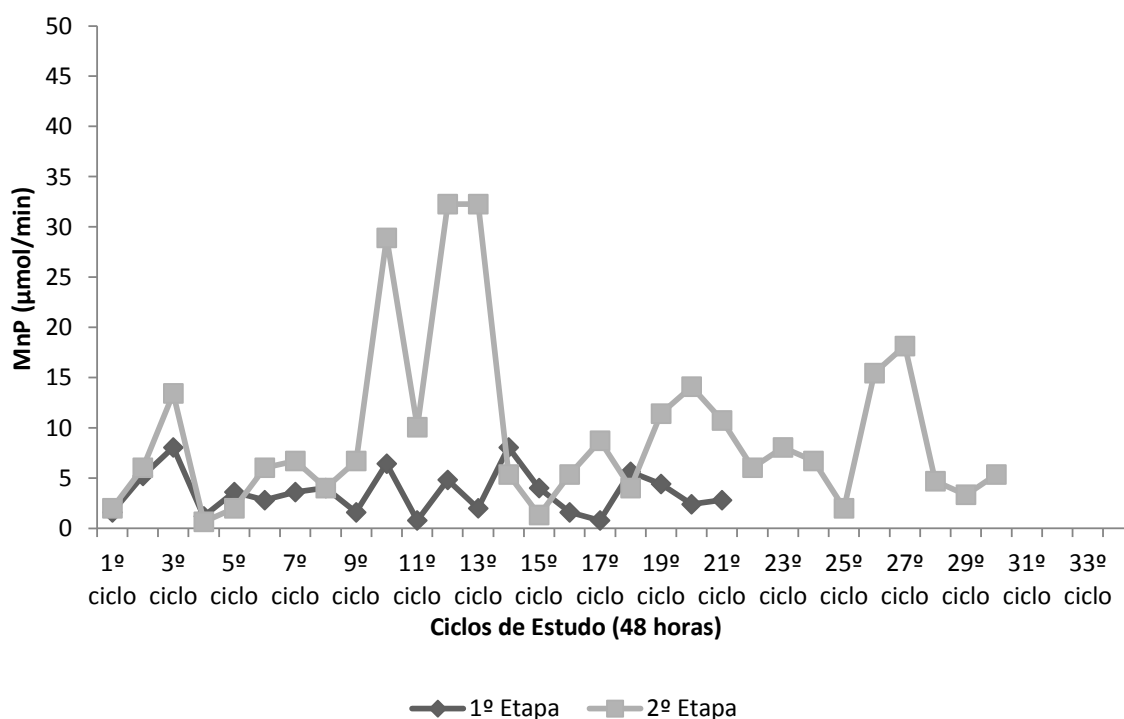
Assim, a concentração de glicose utilizada na Etapa I (5g/L) confirma o baixo perfil de liberação da enzima durante a Etapa, onde a atividade média registrada para essa enzima foi de $3,6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min}$. De acordo com Gao *et al.* (2007) a concentração de glicose utilizada caracteriza o meio como carbono limitado.

A concentração de carbono utilizada durante a Etapa II (1g/L) também caracteriza meio carbono limitado, e mesmo assim houve produção diferenciada da enzima durante as etapas, mostrando que provavelmente, o carbono não influenciou diretamente na produção da *manganês-peroxidase* e sim, houve um efeito sinérgico de diversos fatores, como por exemplo, a concentração de nitrogênio (nitrogênio limitado).

Kwon *et al.* (2008) estudaram a influência da quantidade de inóculo utilizada para imobilização do fungo *Phanerochaete chrysosporium* em espuma de poliuretano na produção da enzima *manganês peroxidase* e em seus resultados obtiveram que na maior quantidade de inóculo empregada ($5,5 \times 10^5$ esporos/mL) foi registrada a menor atividade enzimática. Em contraposição, nas quantidades de inóculo menores ($5,5 \times 10^3$ esporos/mL e $5,5 \times 10^4$ esporos/mL) houve maior registro na atividade enzimática, $600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min}$ e $650 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min}$.

min, respectivamente. Quanto à quantidade de espuma utilizada para imobilização, houve maior produção de enzimas quando a quantidade empregada foi de 1,87 g de espuma por 100 mL de meio. Os autores justificaram a maior produção de enzimas nas condições encontradas devido a uma maior lise celular das estruturas responsáveis pelo acúmulo de enzimas. Os autores ressaltaram ainda que uma maior concentração de glicose e nitrogênio favorece o crescimento de biomassa, contudo, interferem na produção enzimática.

Figura 16—Comportamento da atividade da enzima *manganês peroxidase* liberada pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, imobilizado em reator de bateladas sequenciais com ciclos de 48 horas durante a Fase I.



Fonte: Autor (2013).

A realização da contagem de fungos e bactérias heterotróficas ao final de cada etapa revelou a predominância do fungo *Phanerochaete chrysosporium* no biofilme do reator durante as Etapas I e II, mesmo com a presença de bactérias, estando estas em menor quantidade. As diluições que apresentaram melhores visualizações das colônias foram as de 10^{-4} e 10^{-3} . Na Tabela 7 está exibida a concentração de micro-organismo como Unidade Formadora de Colônia (UFC).

Tabela 7– Contagem de micro-organismos ao final de cada Etapa.

Micro-organismo	1º Etapa	2º Etapa
Fungos (UFC/mL)	8×10^5	6×10^4
Bactérias (UFC/mL)	3×10^2	5×10^3

Fonte: Autor (2013).

Possivelmente, a utilização de biofilmes aderidos em meios suportes, proporcionou o predomínio da espécie inoculada sobre as demais culturas livres em suspensão, favorecendo a formação de micro-ambientes especiais pela interação entre as espécies e garantindo estabilidade das colônias (ALVES, 1999).

Segundo Gao *et al.* (2007) micro-ambientes com baixa concentração de carbono são suscetíveis a contaminação por bactérias, de forma semelhante, na presente pesquisa, o meio aquoso utilizado é classificado em carbono e nitrogênio limitante. Os autores citados investigaram a influencia de meio carbono limitado e nitrogênio limitado na remoção de corante reactive brilliant red por *Phanerochaete chrysosporium* e puderam constatar que em cultivos com concentração limitante de nitrogênio há baixa probabilidade de contaminação por bactérias, contudo, o mesmo não se repete para meio com concentração limitante de carbono, havendo maior suscetibilidade de contaminação neste último. Libra, Borchet e Banit (2003) endossam que mesmo o uso de limitação de nitrogênio, em condições não estéreis, pode favorecer a contaminação bacteriana, principalmente, se houver disponibilidade de carbono.

O ensaio de adsorção no meio suporte (espuma de poliuretano) revelou que o material foi capaz de adsorver 22 mg em 5 g de espuma de poliuretano. Já o ensaio de adsorção de corante na biomassa após a finalização do experimento, mostrou que a biomassa foi capaz de adsorver 79,6 mg de corante por grama de biomassa.

Assim, durante as duas Etapas de estudo foram adicionados ao reator o total de 730mg de corante, descontando o montante referente à adsorção no meio suporte (22 mg) e na biomassa (374 mg) , tem se que o valor afluente de corante no reator foi de 312 mg e o valor efluente foi de 55 mg. Desta forma a remoção biológica promovida pelo fungo foi resultante em 82%.

5.2. Fase II – Operação do reator em bateladas sequenciais operados em série

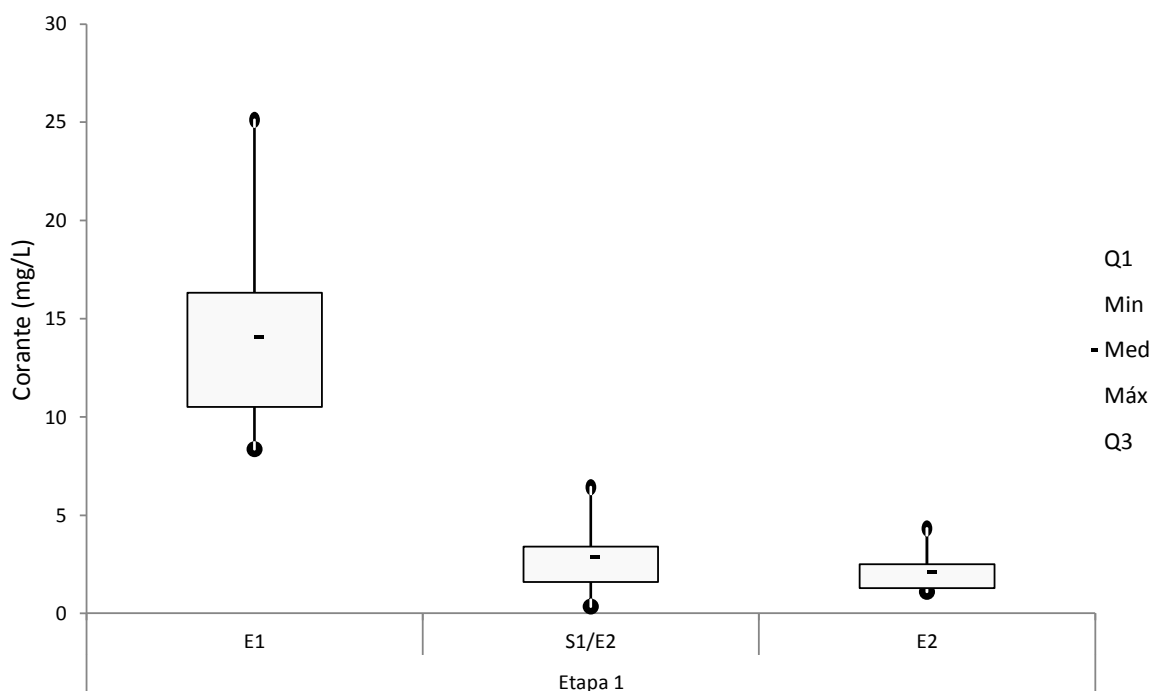
5.2.1. Etapa I

Durante a Fase de operação dos reatores em série, a concentração média de corante foi de 14mg/L no afluente do reator R1 (E1) e de 3 mg/L em seu efluente, sendo este encaminhado para o reator R2, cuja concentração média efluente foi de 2 mg/L, exibindo remoção global de 84%.

A eficiência média de remoção alcançada foi de 75% para o reator R1 e de 23% para o reator R2, mostrando que o uso de um segundo reator, incrementou a remoção do poluente em 9 pontos percentuais.

O reator R1 apresentou remoção máxima de 98%, no 9º ciclo, enquanto que o reator R2 apresentou remoção máxima no 7º ciclo (83%). Na Figura 17 são apresentados os dados de concentração do corante no sistema.

Figura 17–Variação na concentração de corante nos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série.



Fonte: Autor (2013)

Cripps *et al.* (1990) ao estudar a degradação de 4 corantes, entre eles o vermelho do congo, através de biomassa de *P. chrysosporium* não imobilizada, afirmam que o fungo possui a capacidade de degradar de 87% a 93% do corante vermelho do congo em cinco dias,

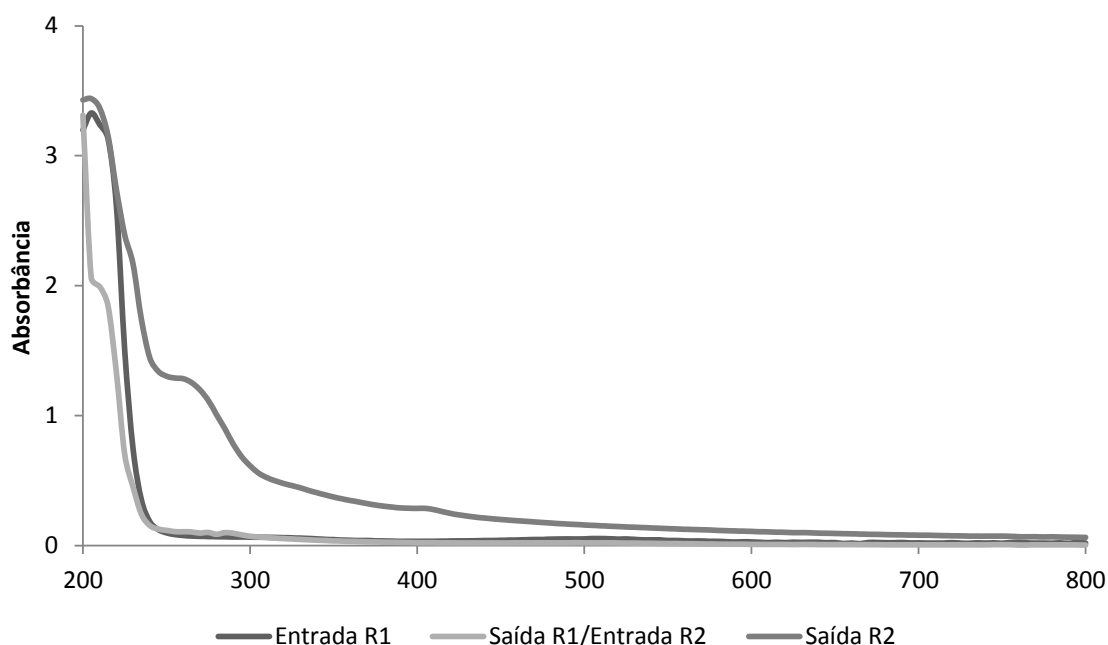
porém os resultados do presente estudo mostraram uma remoção significativa em apenas 2 dias de tratamento no sistema de reatores.

O reator R2, em ciclos iniciais de estudo não apresentou eficiência de remoção, sendo no primeiro ciclo obtida eficiência de 37%, contudo, nos ciclos seguintes, 2º e 3º ciclos, o rendimento do reator R2 diminuiu e não houve eficiência de remoção, porém o reator R1 apresentou remoções de 72% e 88% para os ciclos citados, garantindo a remoção do poluente no sistema proposto.

Uma vez que o reator R2 dispunha de uma baixa concentração do corante média (3mg/L) e uma maior concentração de cossubstrato, é provável que a remoção de corante tenha sido baixa, em detrimento a assimilação de glicose pelos micro-organismos.

A varredura espectrofotométrica, Figura 18, realizada durante esta etapa mostra que não houve redução da banda inicial correspondente ao benzeno e apenas redução da banda cromófora.

Figura 18–Espectro UV-Vis para as amostras retiradas após os ciclos de 48 horas nos reatores R1 e R2.

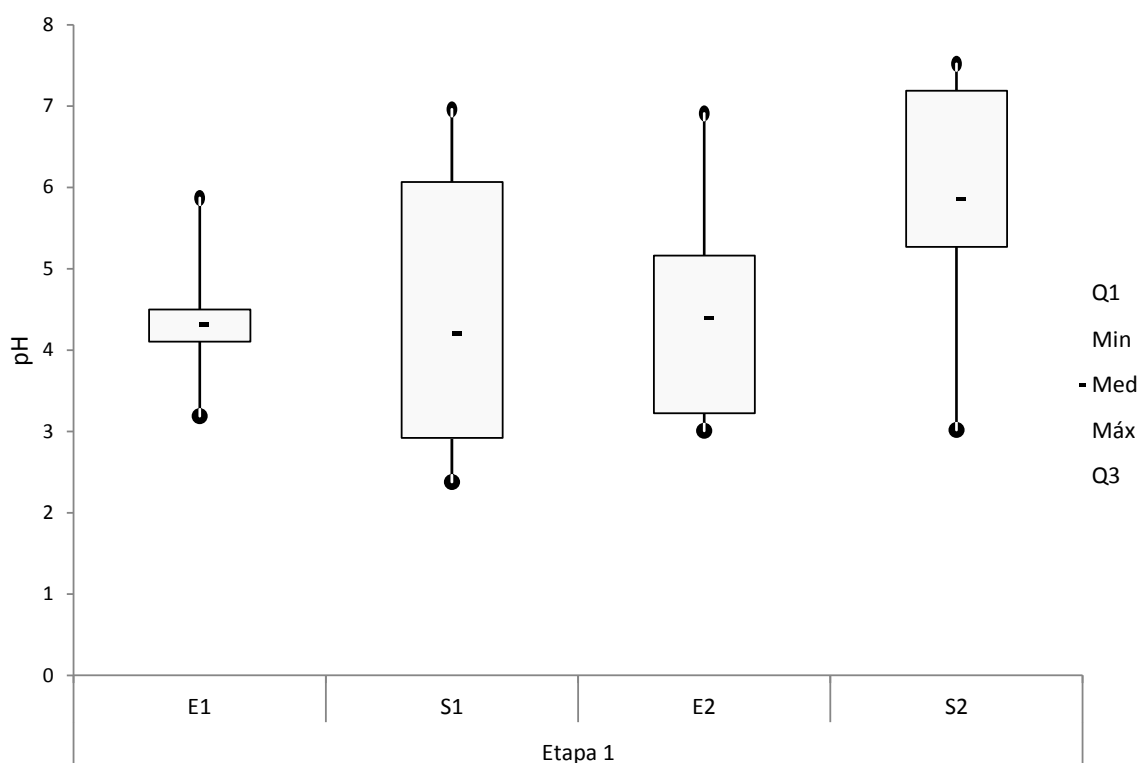


Fonte: Autor (2013).

Vale ressaltar que a varredura espectrofotométrica exibe elevação na banda referente ao benzeno no reator R2, possivelmente, devido à liberação de corante adsorvido no meio suporte.

O pH do meio no reator R1, manteve-se com valores característicos de pH ácido, com média de pH 4,3, máximo pH 5,9 e mínimo de 3,2. A manutenção destes valores se deve, principalmente, ao uso de glicose que ao ser metabolizado favorece a formação de ácidos de cadeias curta. No reator R2 a média do pH afluente foi de 4,2, alcançando máximo pH em 6,4 e mínimo de 2,4. Os valores médio, máximo e mínimo de pH efluente foram de 4,4, 6,9, e 3, respectivamente. São apresentados na Figura 19 os valores de pH nos ciclos de estudo.

Figura 19–Variação no pH dos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série.



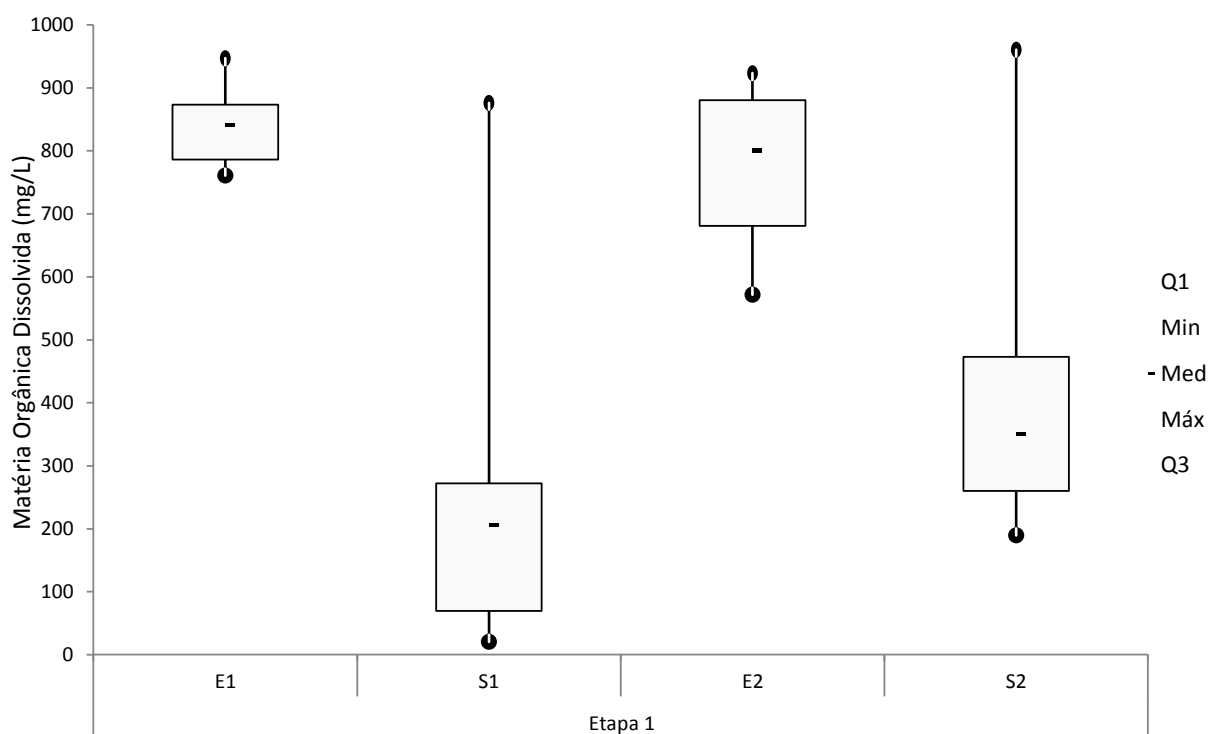
Fonte: Autor (2013).

Com relação à matéria orgânica, a remoção média registrada foi de 71% no reator R1, e remoção média de 48% no reator R2, ambos em termos de DQO dissolvida. A concentração de matéria orgânica dissolvida no afluente (E1) do reator R1 apresentou mínima de 761mg/L e máxima de 947 mg/L, sendo a média de 841 mg/L. Na Figura 20 são apresentados os valores de concentração de matéria orgânica dissolvida para o sistema de reatores.

As remoções máximas registradas para os reatores R1 e R2 foram de 97% e 74%, respectivamente, para remoção de matéria orgânica dissolvida. No ciclo 3 (R1) e no ciclo 5 (R2) não houve remoção de matéria orgânica, ocasionada pelo acúmulo de metabólitos de remoção do corante e supressão na assimilação do cossubstrato. Para estes mesmos ciclos,

houve remoção de 88% de corante no reator R1 e 67% no reator R2, mostrando que há remoção do poluente, sem remoção de matéria orgânica e dos metabólitos gerados pela degradação do corante.

Figura 20–Variação na concentração de DQO dissolvida nos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série.



Fonte: Autor (2013).

A geração de subprodutos da degradação do corante pode ser contabilizada na forma de DQO e gerar percentuais baixos de remoção do poluente. Provavelmente, quando houve clivagem do corante no reator R1, pode ter ocorrido o acúmulo dos referidos subprodutos, ocasionando acréscimo à DQO na parcela dissolvida.

Para o reator R2 foram encaminhados os efluentes do reator R1 que contém residual de corante, subprodutos de degradação, e adição de glicose (1 g/L). É provável que a remoção de corante e DQO seja menor devido aos subprodutos gerados no meio, pois estes apresentam recalcitrância, como citado por Rodrigues *et al.* (2011). Segundo os autores durante a degradação do corante vermelho do congo, há formação de compostos como o benzeno, composto altamente estável e de difícil ruptura. Outro fator que deve ser levado em consideração é a idade da biomassa no reator R2 e sua adaptação frente ao efluente oriundo do reator R1.

A desestabilização do benzeno apresenta maior grau de complexidade, pois o anel sozinho é muito estável e, para sua clivagem, é necessária maior reatividade dessa molécula, o que pode ser obtido com o aumento da glicose no meio até a concentração ótima para a indução enzimática, visto que sua presença resulta na formação de compostos altamente reativos que facilmente se envolvem em reações secundárias com compostos mais persistentes como o benzeno, aumentando a capacidade de mineralização do sistema (SHING, 2006; MALIYEKKAL *et al.*, 2004).

Em relação à amônia, foram registradas remoções médias de 33% e 6% para os reatores R1 e R2, respectivamente. No reator R1, as remoções de amônia mínimas e máximas apresentadas foram de 13% e 81%, havendo um ciclo sem remoção de nitrogênio amoniacal. As concentrações máximas e médias registradas afluentes registradas foram de 75 mg/L e 70 mg/L, com mínima de 59 mg/L.

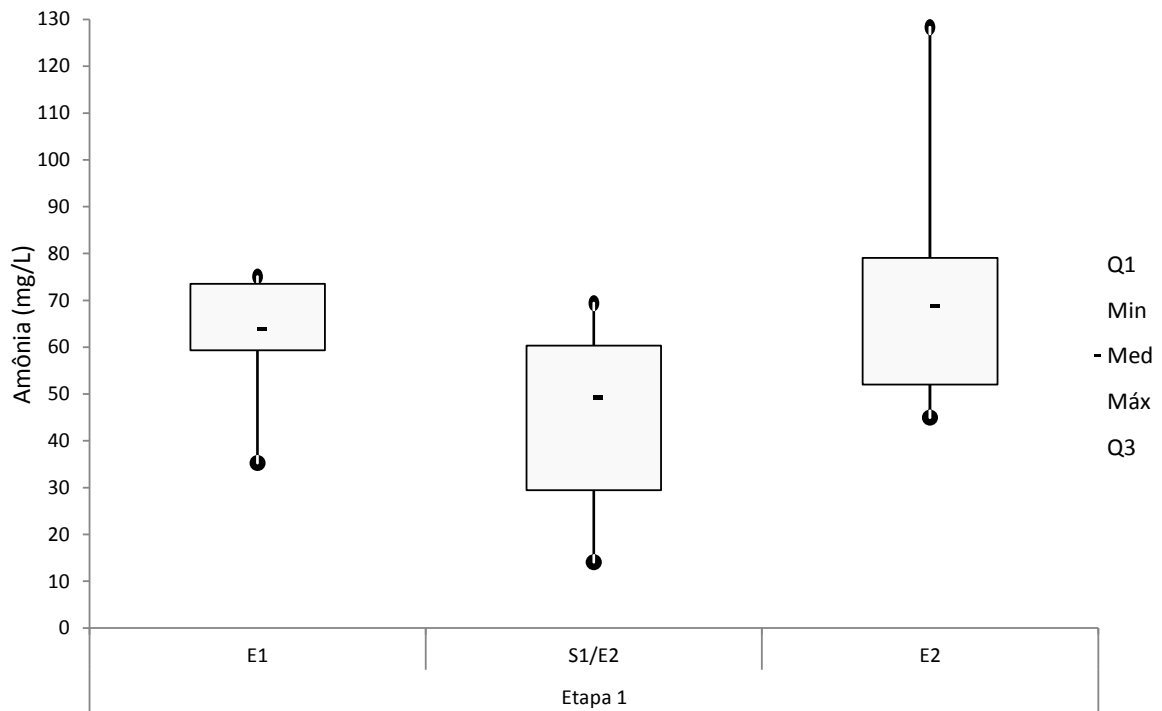
No reator R2 as remoções mínimas e máximas registradas foram de 1% e 29%, não apresentando remoção de amônia nos ciclos iniciais (1º ao 5º ciclo), devido à adaptação da biomassa ao efluente. Na Figura 21 estão apresentados os dados referentes às concentrações de amônia nos reatores.

Em relação ao nitrato, houve remoção média de 40% para o reator R1 e 61% para o reator R2, com remoção máxima de 99% para o reator R1 e 100% para o reator R2. As concentrações afluentes de nitrato apresentaram máxima de 5,4 mg/L e mínima de 3 mg/L no reator R1. Já para o reator R2 a concentração afluente máxima registrada foi de 5,4 mg/L, com mínima de 0,5 mg/L. Na Figura 22 estão apresentados os dados de concentração de nitrato nos reatores.

É interessante observar, que a forma de nitrogênio preferida para assimilação foi diferente nos reatores. Enquanto há remoção preferencial de amônia no reator R1, há remoção preferencial de nitrato no reator R2, sendo estes fatos justificados pelos percentuais de remoção registrados.

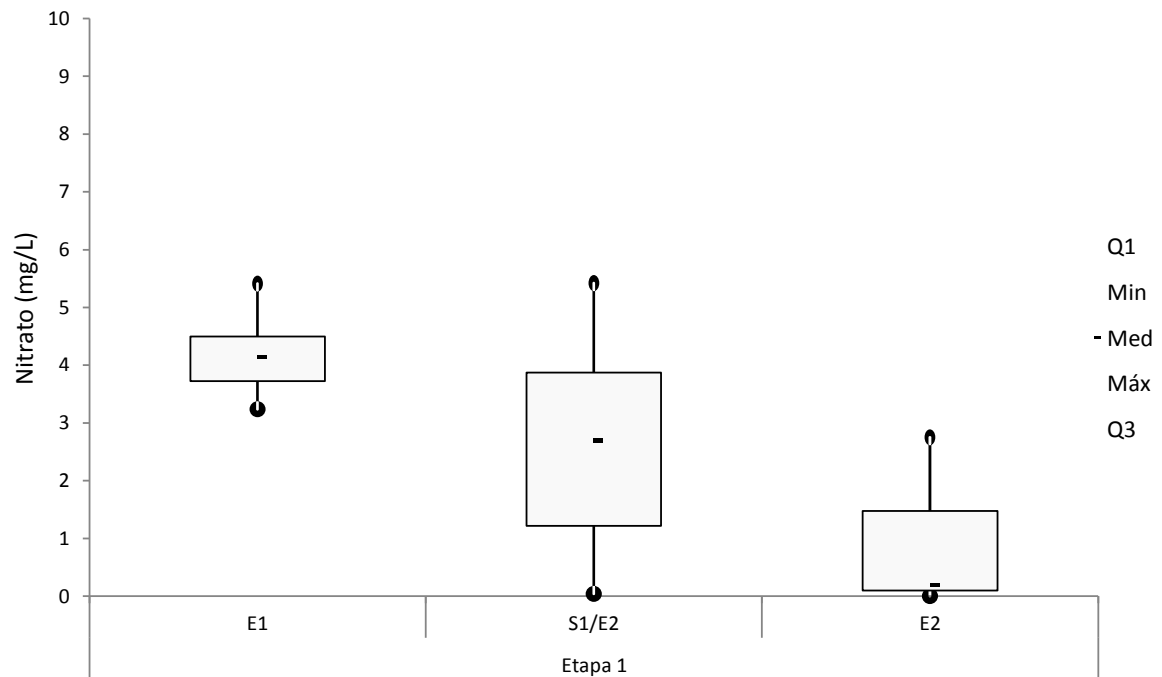
Segundo justifica Griffin (1994) e Marzluf (1997), a fonte preferencial de nitrogênio dos fungos é a amônia e a glutamina, contudo, quando estas fontes não estão em concentrações adequadas, o micro-organismo irá utilizar outra fonte, como por exemplo, o nitrato, e todo este mecanismo de assimilação serão governados por proteínas regulatórias.

Figura 21–Variação na concentração de amônia nos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série.



Fonte: Autor (2013).

Figura 22–Variação na concentração de nitrato nos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série.

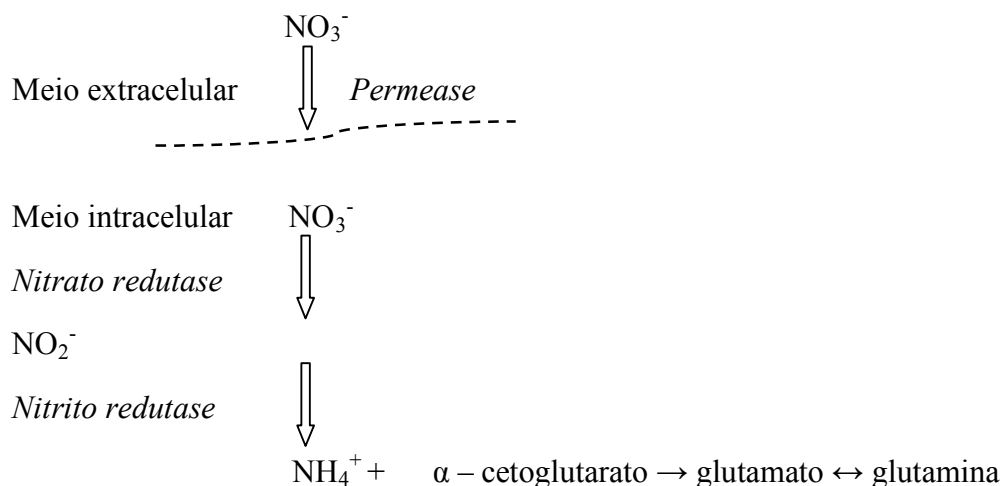


Fonte: Autor (2013).

De acordo com Marzluf (1997) e Pereira (2003), a assimilação de nitrato pelos fungos irá requerer a síntese de enzimas como a *nitrato redutase* e a *nitrito redutase*, ambas influenciadas e induzidas pela concentração de nitrato no meio.

A utilização de nitrato (NO_3^-) nos fungos implica sua redução em nitrito, sob a ação da enzima *nitrato redutase*, que então será convertida a amônia, forma na qual é mais facilmente assimilada pelos fungos, mediante a ação da enzima *nitrito redutase*, consumindo prótons H^+ do meio (GRIFFIN, 1994). A assimilação de nitrato pelos fungos está ilustrada na Figura 23.

Figura 23–Esquema que demonstra a assimilação do nitrato em fungos filamentosos.



Fonte: Pereira *et al.* (2003).

Em relação a fósforo não foram registrados percentuais de remoção expressivos. O reator R1 alcançou 8,7% de remoção de fósforo, enquanto que o reator R2 alcançou 6% de remoção. O fósforo é essencial para os fungos na síntese de ácidos nucleicos e durante os processos de transferência de energia, sendo que seu transporte para vacúolos e formação de polifosfatos representa o principal mecanismo pelo quais os fungos controlam a sua concentração no meio (JENNINGS, 1995).

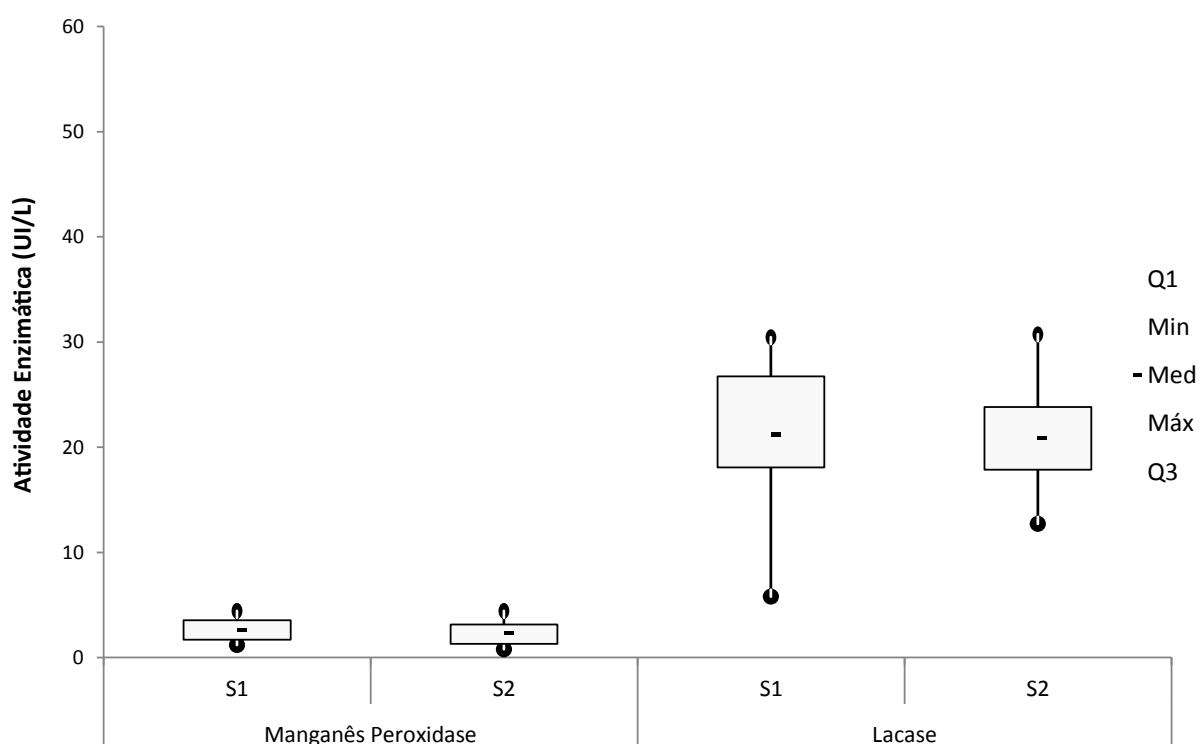
Na maior parte dos ciclos estudados não houve remoção de fósforo no efluente, e sim acúmulo deste nutriente nos efluentes de ambos os reatores. Segundo Foster (1949) nos processos autolíticos o fósforo, proveniente da quebra de proteínas, é mineralizado e liberando novamente como ortofosfato para o meio, é provável que isto tenha acontecido nos reatores, explicando assim a variação do fósforo nestes.

Liang, Gao e Zeng (2012) estudaram a influência da concentração de fósforo (0,01g/L; 0,05g/L; 0,5g/L; 2g/L; 4g/L) no crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium* e na

produção da enzima *manganês peroxidase* e verificaram que nas concentrações 0,01g/L e 0,05g/L houve um consumo constante do nutriente, com crescimento não acentuado e baixa produção de enzima. Na concentração de 0,5g/L foi registrado o melhor crescimento da biomassa, e na concentração de 2g/L houve o registro mais elevado na atividade enzimática (324 UI/L).

A atividade das enzimas *Lacase* e *Manganês peroxidase* estão ilustradas na Figura 24.

Figura 24—Atividade enzimática de *manganês peroxidase* e *lacase* nos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série.



Fonte: Autor (2013).

A enzima *manganês-peroxidase* apresentou baixa atividade em ambos os reatores, com valores máximos de 5,7 $\mu\text{mol}/\text{min}$ no reator R1 e 8,9 $\mu\text{mol}/\text{min}$ no reator R2. Tal fato deve refletir provavelmente a adaptação da população microbiana ao efluente, e seus constituintes, principalmente, o poluente e as concentrações de nutrientes como carbono e nitrogênio, já que grande parte das enzimas fúngicas tem seu comportamento regulado pela presença de determinados nutrientes.

Liang, Gao e Zeng (2012) ao estudarem a influência da concentração de fósforo na produção de *manganês peroxidase* pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* notaram que baixas concentrações deste nutriente (0,01 g/L, 0,05 g/L e 0,5 g/L) não induziram a atividade

enzimática, contudo, em concentração mais elevada (2 g/L) foi registrada a maior atividade enzimática (324 UI/L) apenas no 5º dia de cultivo, em contrapartida, no período de 48 horas houve baixa atividade, sendo registrada máxima de 20 UI/L. Semelhantemente a estes autores, na presente pesquisa houve baixa produção da enzima citada em um período de 48 horas, com registro máximo de 7 UI/L no reator R1 e 9 UI/L no reator R2.

Já, a enzima *lacase* apresentou registro de maior atividade em ambos os reatores, apresentando atividade máxima de 54 $\mu\text{mol/min}$ para o reator R1 e 38 $\mu\text{mol/min}$ para o reator R2.

Trabalhando com o fungo *Pleurotus ostreatus*, Mikiashvili *et al.* (2006) investigaram a influência de diferentes substratos (carbono e nitrogênio) na produção de enzimas *lacase* e *manganês peroxidase*. Ao utilizarem glicose na concentração de 10 g/L, registraram atividade de 58 UI/L para *lacase* e 1 UI/L para *manganês peroxidase*. A maior atividade da *lacase* foi registrada quando os autores utilizaram casca de tangerina como fonte de carbono, e para *manganês peroxidase* a maior atividade foi registrada com o uso do polissacarídeo xilano. Quanto as fonte de nitrogênio, peptona foi aquela que possibilitou uma maior atividade da *lacase*, (443 UI/L) enquanto que para *manganês peroxidase* (14,8 UI/L) o melhor substrato foi a milhocina. Vale ressaltar que ao utilizarem fontes inorgânicas como o sulfato de amônio, houve registro de 32 UI/L para *lacase* e 0,5 UI/L para *manganês peroxidase*, resultados estes, inferiores aos obtidos para os reatores R1 e R2.

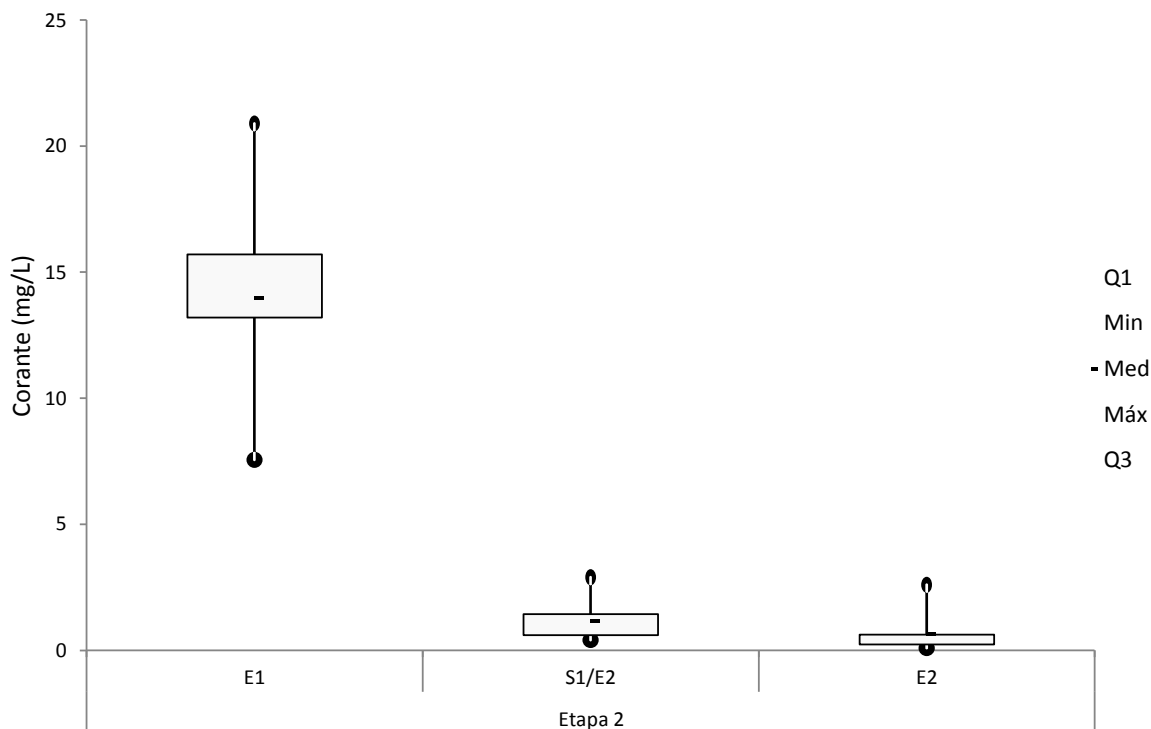
5.2.2. Etapa II

A Figura 25 exibe a variação na concentração de corante em ambos os reatores durante a 2ª Fase experimental do estudo.

O valor médio de corante afluente no reator R1 foi de 14,3 mg/L. Os valores efluentes de corante no reator R1 situaram-se no valor médio de 1,17 mg/L e para o reator R2, 0,65 mg/L.

Quanto à remoção de corante no reator R1, esta apresentou valor médio de 85% para os 10 ciclos de estudo e variou entre 50% e 96%. Durante todos os ciclos, ocorreu remoção de corante do meio, indicando a eficiência do reator R1 na redução da concentração do vermelho do congo. Já para o reator R2, a remoção média alcançada foi de 50%, variando entre 14% e 96%, e nos ciclos 8º e 10º não houve remoção de corante. O sistema em série alcançou eficiência global de 95%, exibindo assim excelente remoção de corante, o que indicou que o uso dos reatores em série contribuiu para uma maior remoção do poluente.

Figura 25–Variação na concentração de corante nos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série, durante a 2ª Fase.



Fonte: Autor (2013).

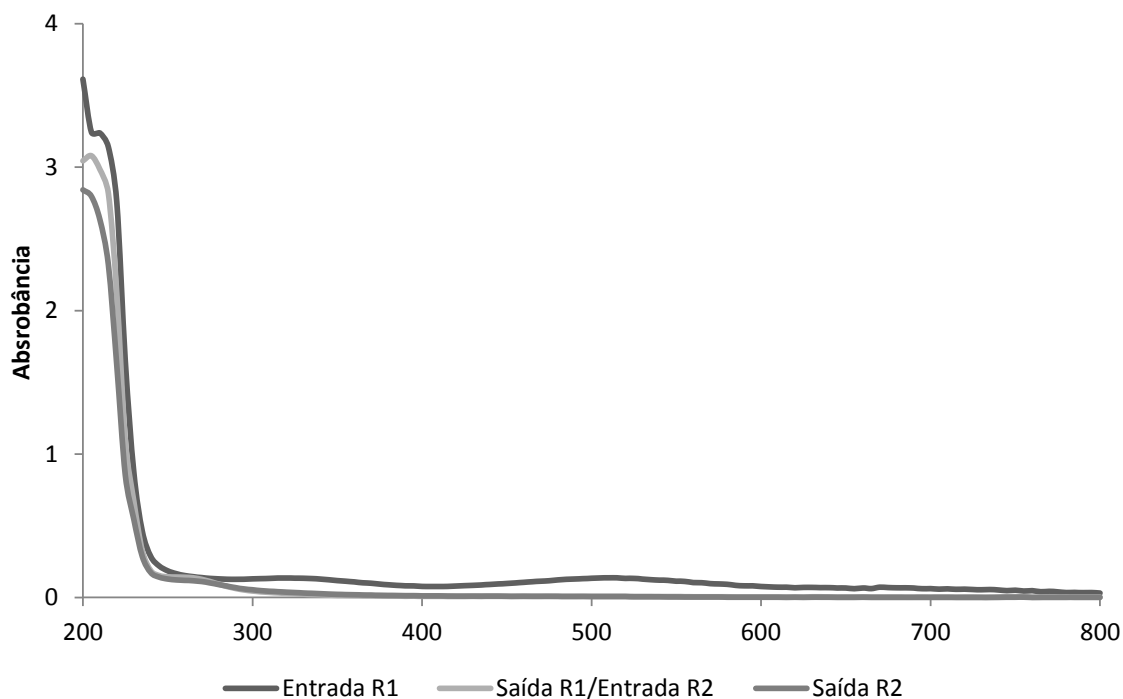
A Figura 26 mostra a varredura espectrofotométrica que foi realizada durante esta etapa, onde, observou-se redução da banda correspondente ao grupo aromático do benzeno, mostrando que a adição do reator em série, contribuiu para mineralização parcial do poluente.

O uso de cossustrato (glicose) em ambos os reatores, possivelmente, auxiliou para que estes atingissem bons percentuais de remoção de corante registrados neste trabalho, fato reportado na literatura (RODRIGUES, *et al.* 2011, SINGH, 2006). O reator R1 foi responsável pela maior parte do consumo e metabolização do corante, restando ao reator R2, à função de polimento de seu residual, o que de certa forma foi endossado pelos percentuais de remoção do poluente em ambos os reatores, ainda que em R2, nos ciclos 8º e 10º, não se tenha observado diminuição da concentração de vermelho do congo.

Pant *et al.* (2008) trabalharam com o fungo *Phanerochaete chrysosporium* para remoção de corante Vermelho do Congo (15 mg/L) em meio sintético, por uso de reatores em batelada sob agitação, investigando a presença de fonte de carbono e nitrogênio, e obtiveram 88,8% de remoção de corante em quinze dias de operação, na presença de 5 g de glicose/L. Semelhantemente a estes autores, na presente pesquisa foram obtidos percentuais médios de remoção de corante de 85% (R1) e 50% (R2), utilizando menor concentração de cossustrato,

1 g/L de glicose (R1) e 0,5 g/L de glicose (R2), e em menor período de tempo (48 horas), mostrando assim que uma maior concentração de cossubstrato não implicou necessariamente em uma maior remoção do poluente.

Figura 26–Espectro UV-Vis para as amostras retiradas após os ciclos de 48 horas nos reatores R1 e R2.

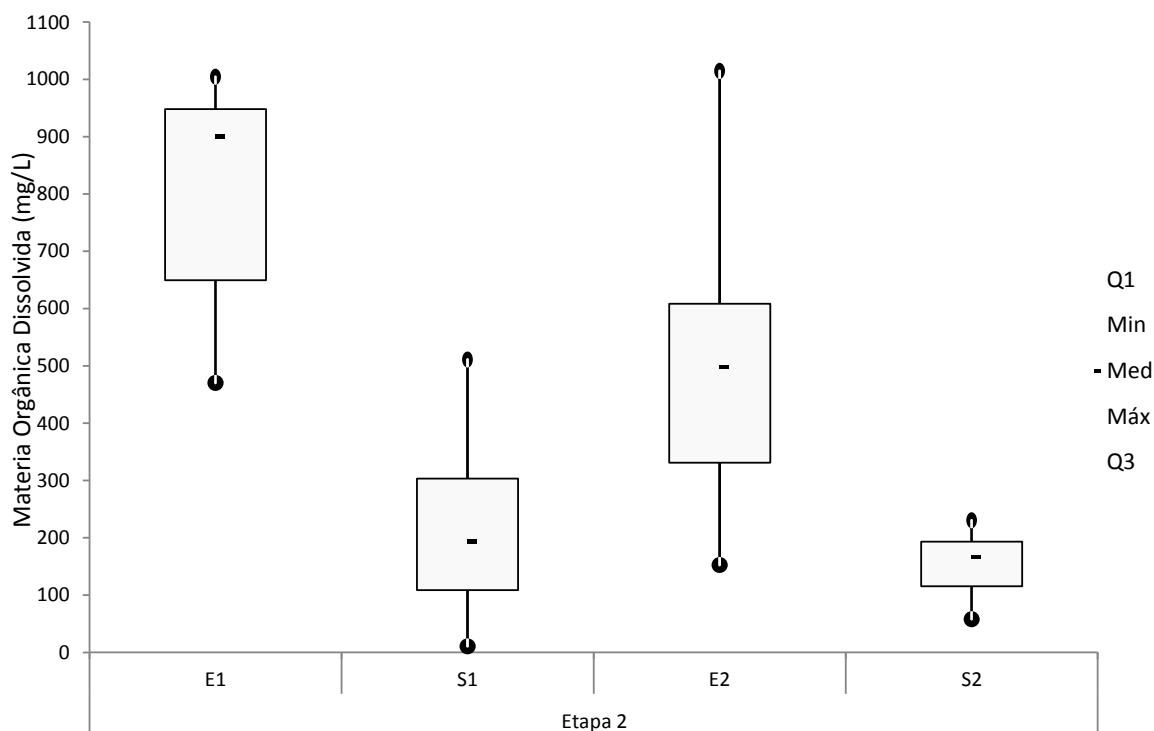


Fonte: Autor (2013).

Quanto à matéria orgânica carbonácea, em termos de DQO dissolvida, o valor médio afluente para o reator R1 foi de 809 mg/L. Vale ressaltar que os valores afluentes de matéria orgânica no reator R2 têm seu valor maior, em virtude da adição de 0,5 g/L de glicose (cossubstrato) no efluente do R1, que compõe o meio afluente do reator R2. Na Figura 27 está apresentada a variação na concentração de matéria orgânica nos reatores R1 e R2.

Quanto à remoção de matéria orgânica, expressa em DQO dissolvida, o reator R1 apresentou remoção média de 70%, e variou na faixa de 51% a 98%, excetuando-se o 8º ciclo, onde não houve remoção, nos outros ciclos foram observadas remoções, mostrando a capacidade dos micro-organismos de consumirem o vermelho do congo como matéria orgânica.

Figura 27–Variação na concentração de DQO dissolvida nos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série, durante a 2ª Fase.



Fonte: Autor (2013).

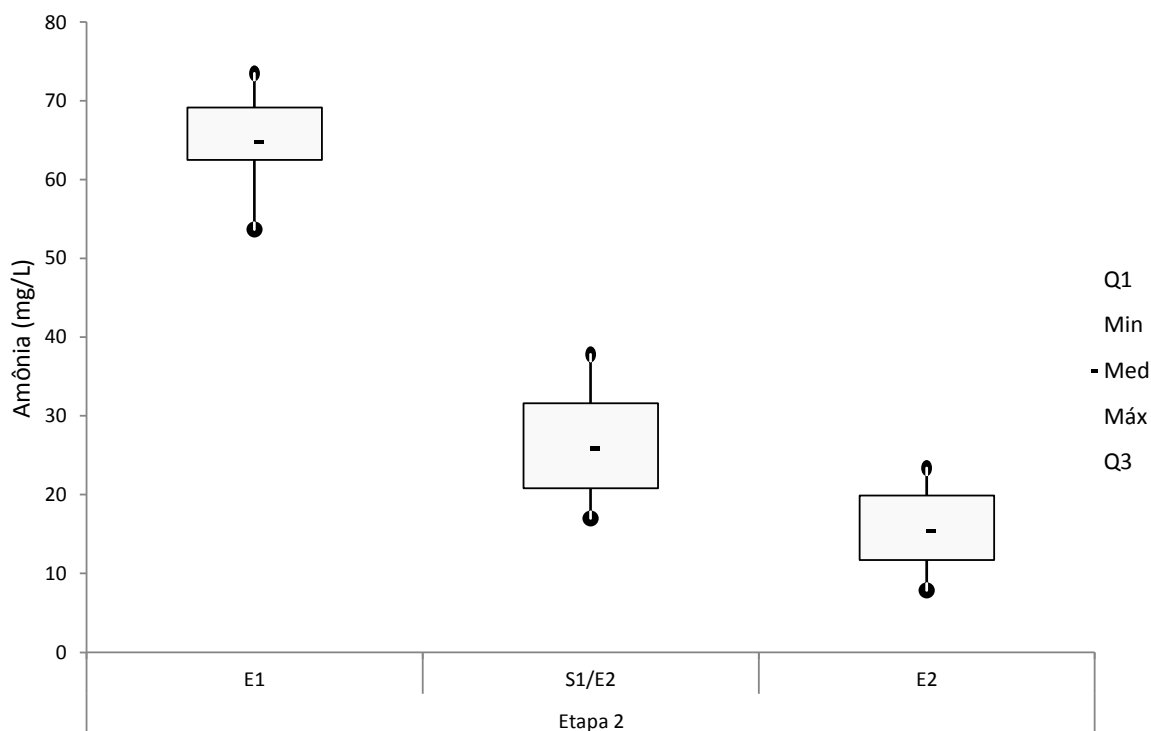
Ainda para esta mesma variável, o reator R2 apresentou remoção média de 61% que oscilou para os 10 ciclos estudados, entre 20% e 91%. No 8º ciclo, apesar de não se ter registrado remoção de corante no reator R1, verificou-se que o reator R2 foi responsável pelo percentual de 64%, gerando uma média global de 59%. Contudo, a média do percentual de remoção global para o sistema durante a operação dos reatores foi de 80%.

Os percentuais de remoção de DQO dissolvida, comparados aos de corante, podem indicar que os micro-organismos foram capazes de remover o corante e seus subprodutos, além da glicose adicionada, a qual também é fonte de carbono, em ambos os reatores.

Os dados pertinentes às frações nitrogenadas (amônia e nitrato) confirmam o bom desempenho do reator R1 quanto ao consumo de amônia, alcançando percentual de remoção de 65%, em contraposição ao reator R2 que apresentou percentual médio de 28%. Contudo, a remoção global para o sistema operado em série alcançou percentual de remoção de amônia superior, de 76%.

Na Figura 28 estão exibidas as concentrações de amônia em ambos os reatores.

Figura 28–Variação na concentração de amônia nos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série, durante a 2ª Fase.



Fonte: Autor (2013).

Já para nitrato, observou-se que o reator R1 apresentou uma baixa remoção média, situada em 29%, contrapondo-se ao reator R2, que alcançou para este mesmo parâmetro, remoção média de 80%. Da mesma forma que para amônia, a eficiência global do sistema foi muito melhor, tendo a mesma atingido remoção global de nitrato de 88%. Na Figura 29 estão exibidas as concentrações de nitrato no afluente efluente dos reatores.

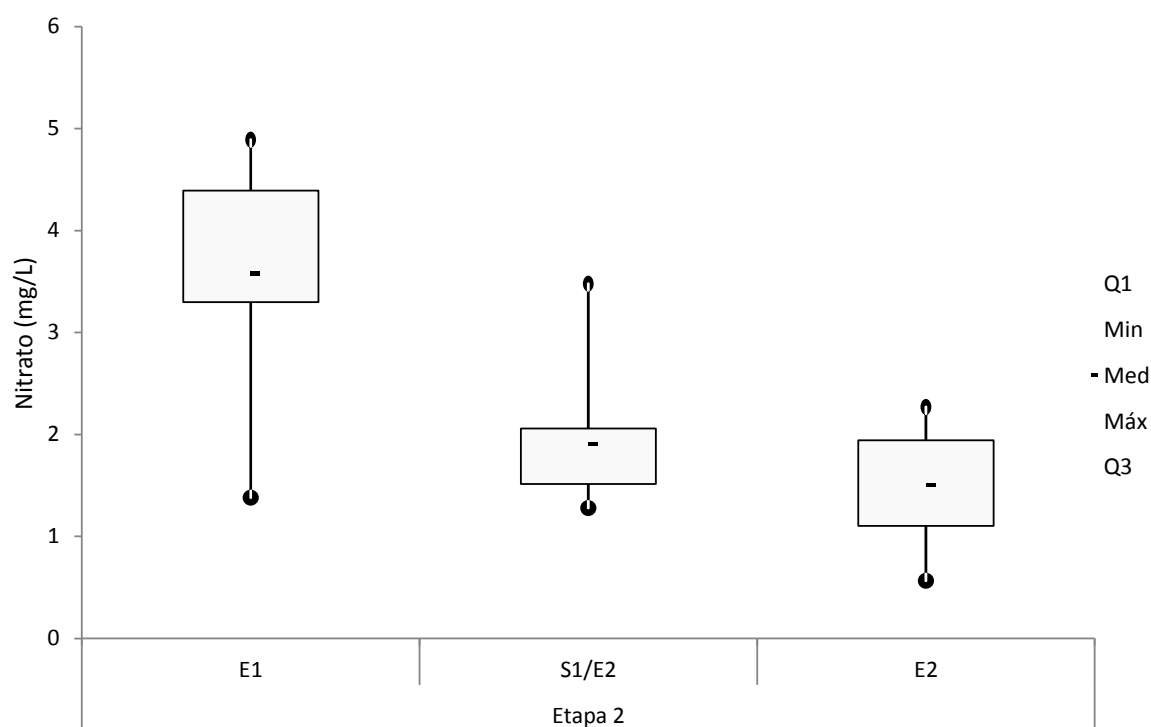
Embora a amônia seja a fonte preferencialmente assimilada pelos fungos houve considerável remoção de nitrato, o que mostrou a versatilidade do *Phanerochaete chrysosporium* em consumir ambas as formas de nitrogênio. A assimilação de nitrato ou de nitrito pelos micro-organismos conduz à redução de ambas as formas de nitrogênio a amônia, através de vias metabólicas específicas (GRIFFIN, 1994), o que corrobora com os percentuais de remoção registrados.

Provavelmente, a adição do reator em série (R2) propiciou maior consumo do nitrato pelos micro-organismos no meio, conseqüentemente, havendo maior remoção de nitrato. Fato similar foi observado no trabalho de Santaella *et al.* (2009) onde trabalharam com reatores biológicos inoculados com o fungo *Aspergillus niger* para tratamento de efluentes de refinaria

de petróleo e quanto a remoção de fontes nitrogenadas, perceberam que houve produção de amônia, seguida de remoção de nitrato.

Os autores citados justificam que os fungos possuem sistemas desnitrificantes nos quais a respiração na mitocôndria está acoplada com a síntese de trifosfato de adenosina (ATP), como na respiração bacteriana. Assim, em concentrações muito baixas de oxigênio livre estes organismos usam duas rotas metabólicas diferentes: a desnitrificação na qual transformam NO_3^- e NO_2^- em N_2O e N_2 e a amonificação na qual NO_3^- é reduzido a NH_4^+ . Durante a desnitrificação, óxido nítrico (NO) é reduzido a N_2O (óxido nitroso) e é catalisada pelo citocromo P4502 (P450nor), que é mais eficiente que o citocromo NO redutase das bactérias. Durante a amonificação, NO_3^- é reduzido a NO_2^- e o mesmo a NH_4^+ pela ação das enzimas NO_3 redutase (Nar) e NO_2 redutase (Nir) (TAKAYA, 2002).

Figura 29–Variação na concentração de nitrato nos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série, durante a 2ª Fase.



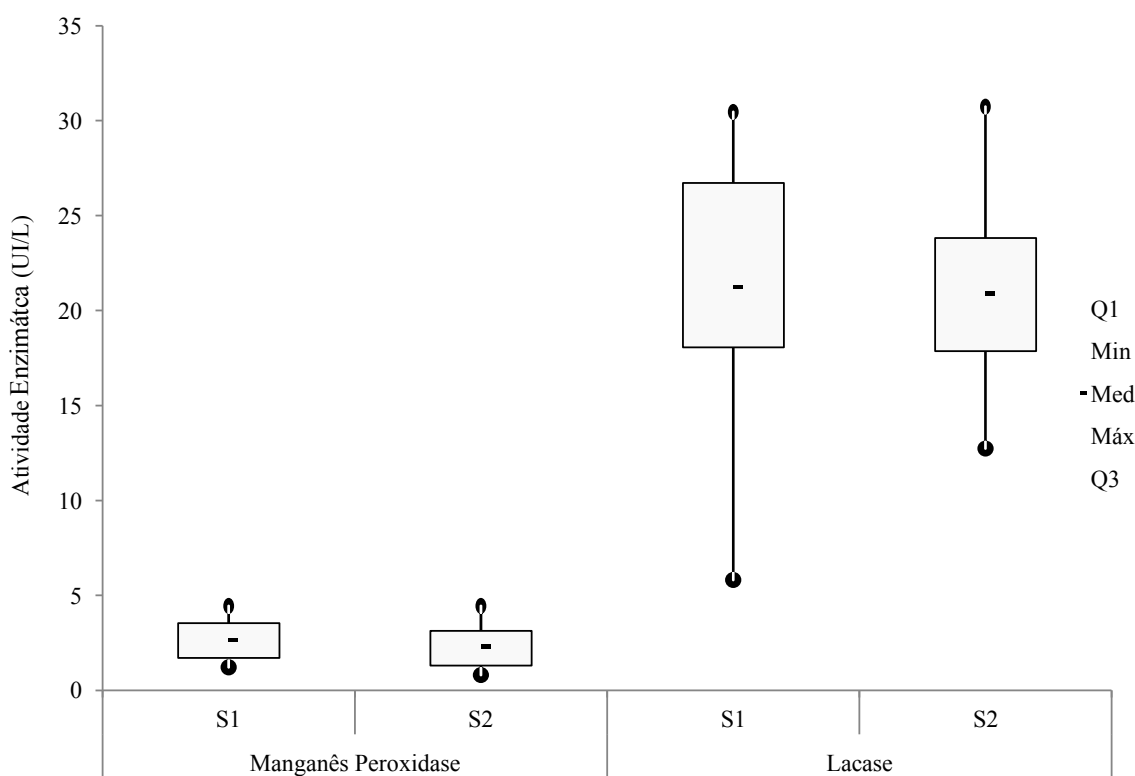
Fonte: Autor (2013).

Quanto ao fósforo total, o reator R1 apresentou remoção média de 8%, e o reator R2, remoção média de 9%, perfazendo uma remoção global de 8%. Estes resultados mostraram que houve remoções baixas desta variável, de modo que o fósforo removido deve ter sido

possivelmente, utilizado para o suprimento metabólico quanto à geração de ATP e produção de biomassa.

A enzima *manganês-peroxidase* (MnP) foi secretada e encontrada em valores baixos em ambos os reatores, 2,6 $\mu\text{mol}/\text{min}$ no reator R1 e 2,3 $\mu\text{mol}/\text{min}$ no reator R2. Esta enzima está implicada nos processos biotecnológicos e há indícios de sua participação frente à remoção de diversos poluentes, principalmente corantes. Na Figura 30 são mostradas as variações da atividade enzimática da MnP e na Lacase.

Figura 30—Atividade da enzima *manganês peroxidase* nos reatores com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* operado em série, durante a 2ª Fase.



Fonte: Autor (2013).

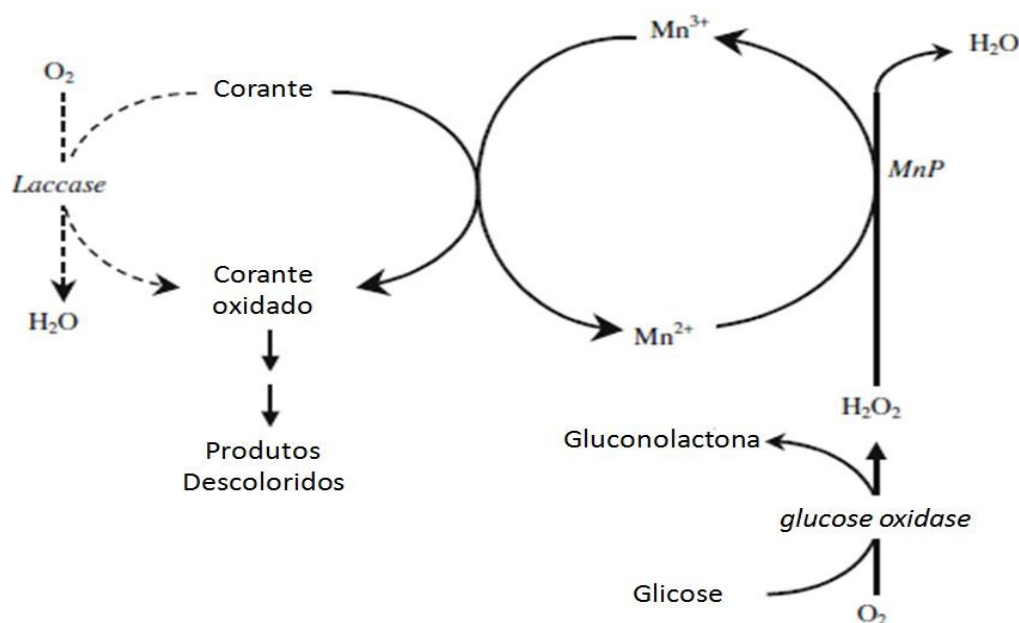
A *lacase* teve atividade máxima em 30 UI/L em ambos os reatores (R1 e R2), e apresentou menores valores se comparado à Etapa I desta fase, o que coincidiu com a redução da concentração de glicose no reator R2.

A secreção de enzimas ligninolíticas é influenciada pelas concentrações de nutrientes como carbono e nitrogênio (ELISASHVILI e KACHLISHVILI, 2009). Mesmo havendo nos reatores condições nutricionais adequadas (corante e DQO – fonte de C; amônia e nitrato – fonte de N) houve baixa produção enzimática quando da enzima *manganês-peroxidase*,

entretanto houve atividade intermediária da lacase, sugerindo efeito aditivo de ambas as enzimas da descoloração do meio aquoso, onde, possivelmente, lacase desempenhou papel mais atuante na degradação do corante.

Fato similar ocorreu no trabalho de Champagne e Ramsay (2005), que usaram as enzimas *manganês peroxidase* e *lacase* para descoloração dos corantes amaranth, vermelho do congo, e remazol blue brilliant R. Estes autores registraram maior atividade da enzima *lacase* em detrimento a *manganês peroxidase*, mas indicaram efeito cooperativo entre ambas no processo de degradação do corante. A Figura 31 exibe uma possível rota mecanística para a degradação do poluente, levando-se em conta o sinergismo das enzimas citadas.

Figura 31—Mecanismo proposto para degradação de corantes e a interação entre as enzimas *lacase* e *manganês-peroxidase*.



Fonte: Champagne e Ramsay (2005).

Outro fato que pode contribuir para diferenças no comportamento da atividade enzimática é a afinidade destas enzimas pela estrutura do corante, conforme relata Pasti-Grigsby *et al.* (1992). Estes autores trabalharam com o fungo *Streptomyces* sp para degradar o corante azo sulfonado e encontraram enzimas da classe peroxidases, capazes de degradar as estruturas deste corante pelo ataque de grupos hidroxila nas posições para e orto.

5.3. Ensaio de Adsorção na Fase II

O ensaio de adsorção na espuma de poliuretano revelou que o material foi capaz de adsorver 6 mg em 5 g de espuma de poliuretano. Já o ensaio de adsorção de corante na biomassa após a finalização do experimento, mostrou que a biomassa foi capaz de adsorver 7 mg de corante por grama de biomassa.

Durante as duas etapas de estudo para o reator R1 foram adicionados ao reator o total de 280,65 mg de corante. Descontando o montante referente à adsorção no meio suporte (18 mg/5g de meio suporte) e na biomassa (7 mg/g de biomassa) o valor afluente de corante no reator foi de 136 mg e o valor efluente foi de 40,3 mg. Desta forma a remoção biológica promovida pelo fungo foi resultante em 70%.

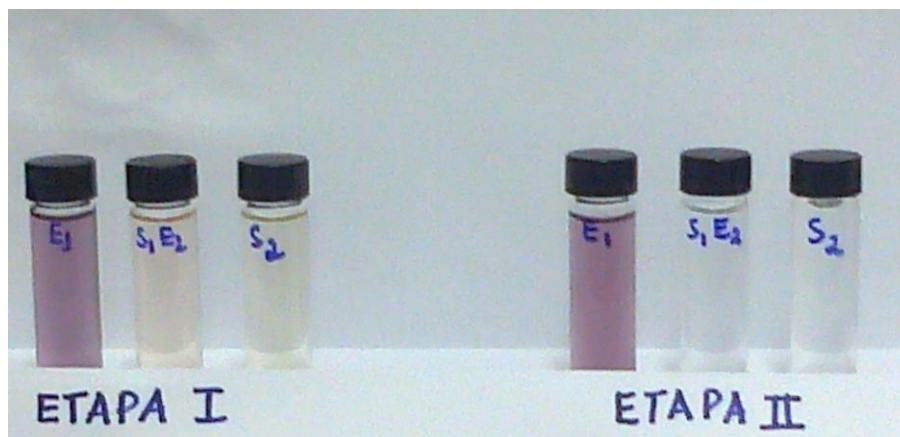
Já para o reator R2, ao se realizar os descontos de adsorção na biomassa e na espuma de poliuretano, teoricamente, este fenômeno seria responsável pela remoção da concentração residual de corante oriunda do reator R1 ao longo das etapas que foi de 40,3 mg, neste sentido, grande parte da adsorção ocorrida, deve-se a grande quantidade de espuma de poliuretano no reator R2. Contudo, cabe ressaltar que houve registro de atividade enzimática neste reator, e a concentração afluente a cada ciclo foi baixa, em virtude dos ótimos percentuais de remoção de corante registrados em R1.

5.4. Comparação Estatística entre as Etapas I e Etapas II

Ao se confrontar os percentuais globais de remoção de corante das duas etapas, na Fase II, com auxílio da análise estatística ANOVA, verificou-se que a Etapa II foi aquela que propiciou o melhor desempenho ao fungo para a remoção de corante vermelho do congo no meio, sendo endossado pelo percentual médio de remoção que atingiu 95%. Já a etapas I registrou 84% de remoção global de corante, diferindo estatisticamente da etapa II ($p < 0,004$). A Figura 32 ilustra a coloração dos afluentes e efluentes dos reatores R1 e R2 em ambas as etapas estudadas.

A análise estatística ANOVA identificou que não houve diferenças significativas nos percentuais de remoção de DQO dissolvida no reator R1, durante as Etapas I e II ($p > 0,9361$). De forma semelhante, o reator R2, durante as Etapas I e Etapa II, não exibiu diferença estatística ($p > 0,3831$).

Figura 32–Amostras afluentes e efluentes aos reatores R1 e R2 durante as Etapas I e II, respectivamente.



Fonte: Autor (2013).

Os percentuais globais de remoção de amônia durante as Etapas I e II analisados pela ANOVA mostraram que houve diferenças significativas ($p < 0,0002$). Em relação a nitrato, a análise dos percentuais de remoção permitiu inferir que não houve diferença estatística entre as Etapas I e Etapa II, ($p > 0,3388$).

A análise do nível de significância dos dados experimentais obtidos pela ANOVA, em relação aos dados de atividade enzimática, indicou que houve semelhança estatística ($p > 0,05$) entre as etapas, quando do comportamento da enzima *manganês peroxidase* no reator R1. Em contraposição, quando se comparou os dados experimentais da atividade da enzima para o reator R2, houve diferença estatística significativa ($p < 0,0377$).

Em relação a enzima *lacase*, ao se confrontar os dados relativos no reator R1, observou-se que não há diferença estatística associada ($p > 0,1047$), o mesmo fato, se repetiu quando da comparação entre as Etapas I e II para o reator R2, registrando $p > 0,4372$.

6. CONCLUSÕES

A investigação dos dados obtidos na pesquisa permitiu concluir que:

- ✓ Para o sistema operado em batelada sequencial convencional (Fase I):
 - A adição de cossubstrato, nas condições estudadas favoreceu a remoção do corante vermelho do congo pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, destacando-se a concentração de 1 g de glicose/L.
 - Durante todas as Etapas estudadas houve boa remoção de matéria orgânica, expressa em termos de DQO, sendo registrado o maior percentual (96%) durante a Etapa II (1g/L).
 - O pH efluente manteve-se constante com valores característicos de meio ácido, sendo 3 na Etapa I e 3,2 na Etapa II.
 - Houve remoção de nitrogênio nas formas de amônia e nitrato em todas as Etapas, contudo, os maiores percentuais registrados foram obtidos na Etapa I (83% em amônia, 74% em nitrato), onde o reator foi operado com maior concentração de cossubstrato (5g/L), confirmando a importância da glicose para a remoção de nutrientes do meio.
 - A remoção de fósforo foi baixa, e seus maiores percentuais foram obtidos quando o reator foi submetido à alta concentração de glicose, sendo de 11% na Etapa I.
 - Aparentemente, a concentração de glicose influenciou na secreção da enzima *manganês peroxidase* pelo fungo havendo maior liberação da enzima durante a Etapa II (1g/L).
- ✓ Para o sistema em batelada sequencial operado em série (Fase II):
 - O emprego da espécie *Phanerochaete chrysosporium* inoculado nos reatores biológicos permitiu remoção média de corante em 75% no reator R1, e 23% para o reator R2 durante a Etapa I, na Fase II.

- Em relação à remoção de corante durante a Etapa II na Fase II houve média de 92% para o reator R1 e 45% para o reator R2, havendo diferença estatística entre as etapas I e II, mostrando possivelmente, a influência da fonte de carbono adicionada no reator R2.
- Em relação à matéria orgânica dissolvida houve remoção média de 71% para o reator R1 e 48% para o reator R2, durante a Etapa I (Fase II), enquanto que para Etapa II houve remoção de 70% para o reator R1 e 60% para o reator R2.
- Em relação às frações nitrogenadas houve remoção de amônia durante as Etapas I e II registradas em 33% e 65% para o reator R1, respectivamente, e 6% e 28% para o reator R2, exibindo acréscimo percentual de remoção da fração amoniacal com a mudança na concentração de carbono, diferindo-as e sendo tal fato corroborado pela análise estatística.
- Já para nitrato houve remoção de 40% e 29% no reator R1, durante as Etapas I e II, respectivamente, e remoção em 61% e 80% para o reator R2, na mesma ordem acima. Aparentemente, a adição do reator em série propiciou um melhor aproveitamento desta fonte de nitrogênio pelo micro-organismo.
- A análise enzimática realizada durante as Fases I e Fase II desta pesquisa mostra que o comportamento e a liberação destas para o meio extracelular é dependente de diversos fatores, e pode ser influenciado pela concentração de nitrogênio, carbono, quantidade de inóculo, presença de indutores, micronutrientes, dentre outros. Entretanto, na pesquisa as oscilações na atividade das enzimas *manganês peroxidase* e *lacase* devem estar associadas à adaptação do biofilme as condições nutricionais e fatores abióticos como temperatura e pH.
- De forma geral, o micro-organismo foi capaz de remover o corante vermelho do congo nas condições propostas, e mediante a mudança na concentração de cossubstrato nos reatores em série, influenciou nos percentuais de remoção de corante e amônia registrados.
- O emprego de reator em batelada sequencial convencional foi eficiente na remoção de corante e matéria orgânica, mostrando-se mais viável que os reatores em batelada operados em série, contudo, o emprego da configuração de reatores em série possibilitou aumento na eficiência de remoção de nitrogênio.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade do trabalho sugere-se:

- Avaliar a influência da concentração de nitrogênio adicionada ao meio aquoso sobre a atividade enzimática do micro-organismo.
- Estudar o comportamento da enzima MnP e Lacase sob concentrações diferentes de fontes (orgânicas e inorgânicas) de nitrogênio.
- Avaliar o consumo de glicose durante a operação dos reatores.
- Desenvolver metodologia analítica através da espectrometria de massa em aliança a outras técnicas como o Espectro em Infravermelho, para avaliar a mineralização do poluente;
- Realizar experimentos com reatores em série reduzindo a concentração de espuma de poliuretano, a fim de se investigar de que forma a mesma pode influenciar na remoção de corante no reator.
- Avaliar os reatores biológicos em efluentes *in natura*.

REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira de Indústria Química, ABIQUIM. Disponível em http://canais.abiquim.org.br/braz_new/Resultado.aspx?lang=br&busca_texto=C&busca_por=produtos&inicia=1. Acesso em: 23 de abril. 2012.
- AFKHAMI, A.; MOOSAVI, R. Adsorptive removal of Congo red, a carcinogenic textile dye, from aqueous solutions by maghemite nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p. 398–403, 2010.
- AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana de açúcar**. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – São Paulo, 2008.
- AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. A. comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. **Chemosphere**, v. 50, p. 1075-1083, 2003.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996, 896p.
- ALVES, M. M. A new device to select microcarries for biomas immobilization to an anaerobic consortium. **Water Environment Research**, v. 71, n. 2, p. 209– 217, 1999.
- APHA (American Public Health Association). **Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater** (21thed). Washington DC, USA, 2005.
- ANDRADE, M. V. F.; CUNHA, A. L.; MÁXIMO, H. O.; MARINHO, G., RODRIGUES, K. Influência da concentração de cossubstrato na remoção de corante azo e produção de manganês peroxidase. **Anais do VICONNEPI – Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação – Natal – RN** (Anais eletrônico), 2011.
- ANJANEYULU, Y., CHARY, N.S., RAJ, D.S.S. Decolourization of industrial effluents available methods and emerging technologies-a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 4, p. 245 – 273, 2005.

BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215–242, 2006.

BARBOSA, B. C. A. **Biorremediação de água residuária sintética têxtil por uso de tratamento biológico conjugado anaeróbio/aeróbio**. 2009. 76f. Monografia de Conclusão do Curso de Tecnologia em Gestão Ambiental – IFCE - 2009.

BEN HAMMAN, O; La RUBIA, T; MARTINEZ, J. Effect of carbon and nitrogen limitation on lignin peroxidase and manganese peroxidase production by *Phanerochaete flavidocalba*. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.751–757, 1997.

BERGSTEN-TORRALBA, L.R.; NISHIKAWA, M.M; BAPTISTA, D.F; MAGALHÃES, D.P; DA SILVA, M. Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.808–817, 2009.

BHATTI, H.; AKRAM, N.; ASGHER, M. Optimization of Culture Conditions for Enhanced Decolorization of Cibacron Red FN-2BL by *Schizophyllum commune* IBL-6. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 149, p. 255– 264, 2008.

BHATTACHARYA, S.; MANGAI, A. D.; VIGNESH, G.; SANGEETHA, K. Mycoremediation of congo red dye by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1526–1536, 2011.

BINUPRIYA, A.R.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K., KU, C.S.; YUN, S.E. Comparative studies on removal of Congo red by native and modified mycelial pellets of *Trametes versicolor* in various reactor modes. **Bioresource Technology**, v.99, p.1080–1088, 2008.

BÖHMER, U.; KIRSTEN, C.; BLEY, T.; NOACK, M. White-rot fungi combined with lignite granules and lignitic xylite to decolorize textile industry wastewater. **Eng. Life Sci.** v. 10, n. 1, p. 26– 34, 2010.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 81–88, 1995.

CAMERON, M. D.; TOMIFEEVSKI, S.; AUST, D.S. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 751–758, 2000.

CARDOSO, M. L.; OLIVEIRA, H.; UETANABARO, A. P.; KAMIDA, H. Biodegradação de celulose e lignina por fungos: uma breve revisão. **Sitientibus Série Ciências Biológicas** Volume 9 - Número 1, Janeiro-Março, 2009.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2. Ed., London: Academic Press, 2001, 750p.

CHAMPAGNE, P. P.; RAMSAY, J. A. Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 69. p. 276–285, 2005.

CHANDER M, ARORA D. S. Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourize industrial dyes. **Dyes and Pigments**, v.2, p.192–198, 2007.

CORREA, C. A. R. **Efeito da adição do extrato de levedura na degradação de corante azo em reator UASB**. 2009. 103f. Dissertação (Mestrado), Ouro Preto, Minas Gerais, 2009.

COUTO, S. R. Dye removal by immobilized fungi. **Biotechnology Advances**, v.27, p.227–235, 2009.

CORSO, C.R.; ALMEIDA, A.C.M. Bioremediation of dyes in textile effluents by *Aspergillus oryzae*. **Microb Ecol**. v.57, p.384–390, 2009.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.4, p. 1118– 1118, 1990.

CUNICO, P.; MAGDALENA, C. P.; CARVALHO, T. E. M.; FUNGARO, D. A. Adsorção de corante reativo preto 5 em solução aquosa utilizando cinzas leves de carvão. **2nd International Workshop**, Advances in Cleaner Production, São Paulo – Brazil – May 20th-22nd – 2009.

DAMASCENO, O. I. C. **Remoção de corantes em solução aquosa e efluentes de indústria têxteis por adsorção em cabelo humano**. 2008. 147f. Dissertação (Mestrado) – Viçosa, Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa, 2008.

DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação de corantes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuárias de Americana/SP**. 2005. 137f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

DUPONT, R. R.; BRUELL, C. J.; MARLEY, M. C.; DOWNEY, D. C.; NORRIS, R. D.; HULLING, S. G.; PIVETS, B. **Bioremediation**. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 596p, 1998.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Biotechnology**, v.144, p.37– 42, 2009.

ENAYATIZAMIR, N.; TABANDEH, F.; COUTO, S. R.; YAKHCHALI, R.; ALIKHANI, H. A.; MOHAMMADI, A. Biodegradation pathway and detoxification of the diazo dye Reactive Black 5 by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10359–10362, 2011.

FRANCISCON, E. **Biodegradação de azo corantes por bactérias isoladas de efluentes industriais**. Dissertação de Mestrado. 2005. 114f. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Unicamp, Campinas - São Paulo, Brasil, 2005.

FOSTER, J. W. **Chemical Activities of Fungi**. New York: Academic Press, 1949, 648p.

GAO, D.; WEN, X.; QIAN, Y. Comparative study on using carbon or nitrogen limited medium to culture white rot fungi for reactive brilliant red dye K-2BP decolorization under non-sterile conditions. **Sci China Ser B-Chem**, vol. 50, p. 718-724, 2007.

GODOY-ILHA, C. E. **Degradação de corantes e pigmentos: Utilização de processos oxidativos avançados para a degradação de quatro pigmentos monoazóicos**. Tese (Doutorado). 2004. 110f. Instituto de Química. Universidade de Brasília, 2004.

GUARANTINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, 23, n.1, 2000.

GOMES, E., AGUIAR, A.P., CARVALHO, C.C., BONFA, M.R.B., SILVA, R., BOSCOLO, M. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosis agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. **Braz. J. Microbiol**, v.40, p.31–39, 2009.

GOMES, L. **Degradação eletroquímica do corante têxtil alaranjado remazol 3R utilizando diferentes eletrodos**. 2009. 149f. Tese (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – SP, 2009.

GOPINATH, K. P.; MUTHUKUMAR, K.; VELAN, M. Sonochemical degradation of Congo red: Optimization through response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, v.157, p.427–433, 2010.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1994, 458p.

JENNINGS, D. H. **The Physiology of Fungal Nutrition**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, p. 622.

HAILEI, W.; PING, L.; MINA, P.; ZHIJUN, Z.; GUANGLI, Y.; GUOSHENG, L. JIANMING, Y. Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: *Phanerochaete* sp. HSD. **Biochemical Engineering Journal**, v.46, p.327–333, 2009.

HENN, C. **Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas Atrazina e Diurom – produção de enzimas ligninolíticas e degradação dos compostos**. Dissertação (Mestrado) – SP. 2009.105f. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. **Chimia**, v. 48, p. 520-522, 2003.

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

KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. 1nd ed. New York: Wiley, 2005, 293p.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolorization, recent advances and future potential. **Environ. Int.** v. 35, p. 127–141, 2009.

KWON, H.; CHUNG, E.; OH, J.; LEE, C.; ANH, I. Optimized production of lignolyticmanganese peroxidase in immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, p. 108-114, 2008.

KOUPAIE, E. H.; MOGHADDAN, M. R.; HASHEMI, R. H. Post-treatment of anaerobically degraded azo dye Acid Red 18 using aerobic moving bed biofilm process: enhanced removal of aromatic amines. **Journal of Hazardous Materials**, V. 195, P.147–154, 2011.

LEUNG, P. C; POINTING, S.B. Effect of different carbon and nitrogen regimes on Poly R decolorization by white-rot fungi. **Mycological Research**. v. 106, p. 86-92, 2002.

LI, S.C.; KANE, P.M. The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, n. 4, p. 650-663, 2009.

LIANG, H.; GAO, D.; ZENG, Y. Effects of phosphorus concentration on the growth and enzyme production of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**. v. 107, p. 535–538, 2012.

LIBRA, J. A.; BORCHERT, M.; BANIT, S. Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 82, p. 736 - 744, 2003.

LOPES, M. S. S.; OLIVEIRA, P. C. C.; ANDRADE, M. V. F.; ARAÚJO, R. S.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. A. Removal of macronutrients from effluent of a cashew nut industry by using a batch aerobic reactor with fungal inoculums. **Eng. Sanit. Ambient**, v.16, n.1, p. 17-26, 2011.

LOUGUERCIO, L.; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul. Editora Caxias do Sul, p. 12-44, 2004.

MALIYEKKAL, S. M.; RENE, E. R.; PHILIP, L.; SWAMINATHAN, T. Performance of BTX degraders under substrate versatility conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 109, n. 1–3, p. 201–211, 2004.

MARTÍNÉZ-HUITLÉ, C. A.; BRILLAS, E. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 87, p. 105-145, 2009.

MARZLUF, G. A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 61, p. 17–32, 1997.

MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariuna – São Paulo, 2008, 647p.

MENDEZ-PAZ, D.; OMIL, F.; LEMA, J.M. Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. **Enzyme and Microbial Technology** v. 36, p. 264–272, 2005.

MIELGO, I.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO G.; LEMA, J. M. Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilised *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Research**, v. 36, p. 1896-1901. 2002.

MIKIASHVILI, N.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 22, p. 999-1002, 2006.

MINILLO, A.; ISIQUE, W. D.; PRADO, H. F. A.; TANGERINO, E. P. Biodegradação de fármacos na água por microrganismos associados em filtros biológicos de carvão. **Revista DAE**, v.179, p.42 – 49, 2009.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos na saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 370 – 374, 2002.

MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. Fungal bioreactors: Applications to white-rot fungi. **Reviews in Environmental Science and BioTechnology** v. 2, p. 247–259, 2003.

NASCIMENTO, C. R. S. **Avaliação do potencial de descoloração e detoxificação de corantes utilizados em indústria têxtil por fungos isolados de sedimento do Parque Nacional da Serra da Capivara (PI)**. 2008. 96f. Dissertação (Mestrado) – RJ. Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

NIEBISCH, C. **Biodegradação do corante têxtil remazol azul por *Lentinus crinitus*, *Lepista sordida* e *Hydnopolyporus fimbriatus***. Dissertação (Mestrado). 2009. 105f. Universidade Federal do Paraná, 2009.

NIGAM, P.; ARMOUR, G.; BANAT, I. M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-absorbed agricultural residues. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 219-226, 2000.

NOVOTNY, C., SVOBODOVA, K., ERBANOVA, P., CAJTHAML, T., KASINATH, A., LANG, E. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1545–1551, 2004.

OLIVEIRA, P.L. DE, DUARTE, M.C.T., PONEZI, A.N., DURRANT, L.R. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.818-826, 2009.

OLIVEIRA, L.; BARRETO, M.; VITALLI, V.; MACHADO, K.; MATHEUS, D. Descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetostropicais Brasileiros. **Naturalia**, v.33, p. 85-99, 2010.

PAPAGIANNI, M.; WAYMAN, F. M.; MATTEY, M. Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. **Appl. Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7178-7186, 2005.

PANT, D.; SINGH, A.; SATYAWALI, Y.; GUPTA, R. K. Effect of carbon and nitrogen source amendment on synthetic dyes decolourizing efficiency of white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Environmental Biology**, v.29, n.1, p.79-84, 2008.

PARK, C.; LEE, M.; LEE, B.; KIM, S. W.; CHASE, H. A.; LEE, J. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. **Biochemical Engineering Journal**, v.36, p.59–65, 2007.

PASCHOAL, F. M. M., TREMILIOSI-FILHO, G. Aplicação da tecnologia de eletrofloculação na recuperação do corante índigo blue a partir de efluentes industriais. **Química Nova**, v.28, n.5, p.766-772, 2005.

PASTI-GRIGSBY, M. B.; PASZCZYNSKI A.; GOSZCZYNSKI S.; CRAWFORD, D. L.; CRAWFORD R. L. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Environ Microbiol**. V. 58,

pag.3605–3613, 1992.

PEREIRA, J. F. Nitrato Redutase em Fungos Filamentosos. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** – Ed. nº 31, julho/dezembro 2003.

PINHEIRO, H. M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 61, p. 121-139, 2004.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219-226, 2006.

RODRÍGUES, S.; FERNÁNDEZ, M.; BERMÚDEZ, R. C. Tratamiento de efluentes industriales coloreados com *Pleurotus* spp. **Rev. Iberoam Micol**, n. 20, p. 164-168, 2003.

RODRIGUES, K.; MARINHO, G. **Fungos e Águas Residuárias Industriais: uma nova tecnologia**. Fortaleza, Editora Imprima, 2012, 414p.

RODRIGUES, K. A., SAMPAIO, G. M. M. S., ZAIAT, M., SANTAELLA, S. T. Influência da glicose no consumo de fenol por *Aspergillus niger* AN 400 de meio sintético em reatores em batelada. **Engenharia Sanitária**, jun/jul/ago, 2007.

RODRIGUES, K.; LIMA, K. M.; SILVA, G. M.; SILVA, G.; CUNHA, P. PESSOA, R. Remoção de corante por uso de *Aspergillus niger* AN400 em reator em bateladas sequenciais. **Quím. Nova**, vol.34, n.7, 2011.

ROMAŠKEVIČ, T.; BUDRIENĖ, S.; PIELICHOWSKI, K.; PIELICHOWSKI, J. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. **Chemija**, v. 17, p. 74–89, 2006.

ROSALEN, L. A. Biodegradação de Efluente Têxtil e Nove Corantes Técnicos Utilizando Fungos Basidiomicetos. **Química Têxtil**, n.76, p.44-52, 2004.

SALGADO, B. C. B.; NOGUEIRA, I. C.; RODRIGUES, K. A.; MARINHO, G.;

BUARQUE, H. B.; ARAÚJO, R. S. Descoloração de efluentes aquosos sintéticos e têxtil contendo corantes índigo e azo via processos Fenton e foto-assistidos (UV e UV/H₂O₂). **Eng Sanit Ambient**, v.14 n.1, 2009.

SAMPAIO, G. M.; SANTOS, E. M., SANTAELLA, S. T. Pós-Tratamento de efluente de um reator UASB através de um reator biológico com fungos. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.9, n.1, p.73-81. 2004.

SANGHI, R.; DIXIT, A.; VERMA, P.; PURI, S. Design of reaction conditions for the enhancement of microbial degradation of dyes in sequential cycles. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 1646–1651, 2009.

SANGHI, R.; DIXIT, A.; VERMA, P. Evaluation of *Coriolus versicolor* for its tolerance towards toxic sulphonate azo dyes in sequential batch mode. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 89, p. 15-21, 2011.

SANTAELLA, S.T.; SILVA JÚNIOR, F. C.; GADELHA, D.; COSTA, K.; LEITÃO, R. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus Níger*. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.14, n.1, p.139-148, 2009.

SANTOS, V. L.; MONTEIRO, A. S.; BRAGA D.T.; SANTORO, M. M. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. **J Hazard Mater**, v. 30, p. 161-168, 2009.

SILVA FILHO, H. A.; SANTOS, M. V. E.; SAMPAIO, G. M. M. S.; ARTHAUD, I. Ensaio de Toxicidade e Remoção de corantes têxteis por processo biológico. **Anais... II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, João Pessoa – PB – 2007.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Curso de Capacitação de monitores e educadores – Instituto de Botânica de São Paulo, 2009.

SINGH, P. **Mycoremediation: Fungal Bioremediation**. Canada: Wiley, 2006, 617p.

SINGH, D.; CHEN, S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 81, p. 399–417, 2008.

SINGH, D.; ZENG, J.; CHEN, S. Increasing manganese peroxidase productivity of *Phanerochaete chrysosporium* by optimizing carbon sources and supplementing small molecules. **Letters Appl Microbiol.** V. 53, p. 120–123, 2011.

SRINIVASAN, A.; VIRARAGHAVAN, T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 1915-1929, 2010.

SONGULASHVILI, G.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S.P.; NEVO, E.; HADAR, Y. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. **Enzyme Microb. Technol.** v.41, p.57-61, 2007.

SOUSA, A.F; ROSADO, F.R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, 2009.

SOUZA, A.A., MELO, A.R., U. SOUZA S.M.A. Re-utilisation conditions of wastewaters from textiles industries, **Res. Conserv. Recycl.**, v.49, p.1–13, 2006.

SOUZA, S.M.A. G.; BONILLA, K.A. S.; ULSON DE SOUZA, A.A. Removal of COD and color from hydrolyzed textile azo dye by combined ozonation and biological treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v.179, p.35–42, 2010.

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

TAKAYA, N. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 506-510, 2002.

VERMA, A. K.; DASH, R. R.; BHUNIA, P. A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. **Journal of Environmental Management**, v. 93, p.154 – 168, 2012.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Vol. 1: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG. 3a ed., 2005, 452 p.

YANG, X. Q.; ZHAO, X. X.; LIU, C. Y.; ZHENG, Y.; QIAN, S. J. Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. **Process Biochemistry**, v.44, p.1185–1189, 2009.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances** v. 22, p. 161-187, 2003.

ÜREK, R. PAZARLIOGLU, N. Production and stimulation of manganese peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry** v. 40, p. 83–87, 2005.

ANEXO A - Fase I - Análise de Significância Estatística - ANOVA

Corante

Table Analyzed	Data 1		
One-way analysis of variance			
P value	0,0120		
P value summary	*		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	2		
F	4,666		
R squared	0,1022		
ANOVA Table			
	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1787	2	893,3
Residual (within columns)	15700	82	191,5
Total	17490	84	
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?
1º Etapa vs 2º Etapa	-10,73	3,854	Yes

Table Analyzed	Data 1	
Tukey's Multiple Comparison Test	P value	Significant? P < 0.05?
1° Etapa vs 2° Etapa	< 0.0001	Yes

DQO

Table Analyzed	Data 1		
One-way analysis of variance			
P value	0,0008		
P value summary	***		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	2		
F	7,826		
R squared	0,1603		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	4891	2	2446
Residual (within columns)	25620	82	312,5
Total	30520	84	
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?
1º Etapa vs 2º Etapa	-19,59	5,507	Yes

Table Analyzed	Data 1	
Tukey's Multiple Comparison Test	P value	Significant? P < 0.05?
1º Etapa vs 2º Etapa	0,0036	Yes

AMÔNIA

Table Analyzed	Data 1		
One-way analysis of variance			
P value	0,0010		
P value summary	***		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	2		
F	7,556		
R squared	0,1572		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	4806	2	2403
Residual (within columns)	25760	81	318,1
Total	30570	83	
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?
1º Etapa vs 2º Etapa	17,79	4,923	Yes

Table Analyzed	Data 1	
Tukey's Multiple Comparison Test	P value	Significant? P < 0.05?
1° Etapa vs 2° Etapa	0,0005	Yes

NITRATO

Table Analyzed	Data 1		
One-way analysis of variance			
P value	< 0.0001		
P value summary	***		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	2		
F	38,08		
R squared	0,4755		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	31630	2	15810
Residual (within columns)	34880	84	415,3
Total	66510	86	
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?
1º Etapa vs 2º Etapa	18,20	4,496	Yes

Table Analyzed	Data 1	
Tukey's Multiple Comparison Test	P value	Significant? P < 0.05?
1º Etapa vs 2º Etapa	0,0034	Yes

FÓSFORO TORAL

Table Analyzed	Data 1
One-way analysis of variance	
P value	0,0309
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	2
F	3,630
R squared	0,08226

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	895,1	2	447,6
Residual (within columns)	9986	81	123,3
Total	10880	83	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?
1° Etapa vs 2° Etapa	6,331	2,814	Yes

Table Analyzed	Data 1
Tukey's Multiple Comparison Test	P value Significant? P < 0.05?
1° Etapa vs 2° Etapa	0, 0440 Yes

ENZIMA MANGANÊS PEROXIDASE

Table Analyzed	Data 1		
One-way analysis of variance			
P value	0,0361		
P value summary	*		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	2		
F	3,460		
R squared	0,07782		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1807	2	903,4
Residual (within columns)	21410	82	261,1
Total	23220	84	
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?
1º Etapa vs 2º Etapa	-5,820	1,790	Yes

Table Analyzed	Data 1	
Tukey's Multiple Comparison Test	P value	Significant? P < 0.05?
1° Etapa vs 2° Etapa	0,0037	Yes

ANEXO B - Fase II - Análise de Significância Estatística - ANOVA

Corante – Global

Table Analyzed	Corante
Column A	Global -Etapa 1
vs	vs
Column B	Global -Etapa 2
Paired t test	
P value	0,0004
P value summary	***
Are means signif. different? ($P < 0.05$)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5.415 df=9
Number of pairs	10
How big is the difference?	
Mean of differences	-10,93
95% confidence interval	-15.50 to -6.364
R squared	0,7651
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0,6581
P Value (one tailed)	0,0193
P value summary	*
Was the pairing significantly effective?	Yes

DQO – Reator R1

Table Analyzed	Reator R1
Column A	Etapa 1
vs	vs
Column B	Etapa 2
Paired t test	
P value	0,9361
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.08241 df=9
Number of pairs	10
How big is the difference?	
Mean of differences	1,100
95% confidence interval	-29.09 to 31.29
R squared	0,0007540
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0,05377
P Value (one tailed)	0,4414
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No

DQO - Reator R2

Table Analyzed	Reator R2
Column A	Etapa 1
vs	vs
Column B	Etapa 2
Paired t test	
P value	0,3831
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.9169 df=9
Number of pairs	10
How big is the difference?	
Mean of differences	-11,20
95% confidence interval	-38.83 to 16.43
R squared	0,08543
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0,1524
P Value (one tailed)	0,3371
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No

Amônia Global – Reatores R1 e R2

Table Analyzed	Amônia R1 e R2
Column A	Global -Etapa 1
vs	vs
Column B	Global -Etapa 2
Paired t test	
P value	0,0002
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=7.717 df=6
Number of pairs	7
How big is the difference?	
Mean of differences	-62,49
95% confidence interval	-82.30 to -42.67
R squared	0,9085
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0,6427
P Value (one tailed)	0,0598
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No

Nitrato Global – Reatores R1 e R2

Table Analyzed	Nitrato R1 e R2
Column A	Global -Etapa 1
vs	vs
Column B	Global -Etapa 2
Paired t test	
P value	0,3388
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.039 df=6
Number of pairs	7
How big is the difference?	
Mean of differences	11,83
95% confidence interval	-16.02 to 39.68
R squared	0,1525
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0,1675
P Value (one tailed)	0,3598
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No

Enzima *manganês peroxidase* – R1

Table Analyzed	R1
Column A	R1 - Etapa 1
vs	vs
Column B	R1 - Etapa 2
Paired t test	
P value	0,4880
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.7269 df=8
Number of pairs	9
How big is the difference?	
Mean of differences	-0,4933
95% confidence interval	-2.058 to 1.072
R squared	0,06196
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0,07059
P Value (one tailed)	0,4284
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No

Enzima *manganês peroxidase* – R2

Table Analyzed	R2
Column A	R2 - Etapa 1
vs	vs
Column B	R2 - Etapa 2
Paired t test	
P value	0,0377
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.558 df=7
Number of pairs	8
How big is the difference?	
Mean of differences	2,069
95% confidence interval	0.1561 to 3.982
R squared	0,4832
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0,4574
P Value (one tailed)	0,1272
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No

Enzima *lacase* – R1

Table Analyzed	Lac R1
Column A	R1 - Etapa 1
vs	vs
Column B	R1 - Etapa 2
Paired t test	
P value	0,1047
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.804 df=9
Number of pairs	10
How big is the difference?	
Mean of differences	8,723
95% confidence interval	-2.213 to 19.66
R squared	0,2656
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0,1454
P Value (one tailed)	0,3443
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No

Enzima *lacase* – R2

Table Analyzed	Lac R2
Column A	R2 - Etapa 1
vs	vs
Column B	R2 - Etapa 2
Paired t test	
P value	0,4372
P value summary	ns
Are means signif. different? ($P < 0.05$)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.8178 df=8
Number of pairs	9
How big is the difference?	
Mean of differences	4,308
95% confidence interval	-7.840 to 16.46
R squared	0,07715
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0,4460
P Value (one tailed)	0,1145
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No