Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de
Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP**

Priscila Maria Dellamatrice

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ecologia de Agroecossistemas

Piracicaba
2005

Priscila Maria Dellamatrice
Engenheiro Agrônomo

**Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de
Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP**

Orientadora:
Prof^a. Dra. **REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ecologia de Agroecossistemas

**Piracicaba
2005**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Dellamatrice, Priscila Maria

Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP / Priscila Maria Dellamatrice. - - Piracicaba, 2005.
137 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1. Algas 2. Corante – Toxicidade 3. Ecossistema de água doce 4. Efluente
5. Lodo 6. Poluição da água I. Título

CDD 628.168

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

Ao Sr. José e Sra. Sirlei

Meus pais

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

À Prof. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro pelo carinho, confiança, incentivo, paciência e apoio indispensável em todas as etapas do trabalho;

Aos amigos do laboratório Hélio M. Kamida, Eduardo D. de Armas, Maria Alice P.F. dos Santos, Luciana A. Rosolen e Paula M. Antunes pelo apoio e amizade;

À Prof. Dra. Marli de Fátima Fiori e Dra. Stella, do Laboratório Biologia Celular e Molecular e Prof. Dr. Luiz Alberto B. de Moraes, do Departamento de Química (FFCLRP-USP) pela importante colaboração nos experimentos com as cianobactérias;

Ao Dr. Ives C. da S. Bueno do Laboratório de Ciências Animais pela ajuda nos testes de degradação anaeróbia;

À Mônica L. Rossi e Prof. Dra. Neusa L. Nogueira por viabilizar a realização do trabalho de microscopia eletrônica;

À Clarice Matraia e a Prof.Dra. Raquel Domarco do Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia pela análise de refletância realizada;

À Thaís C. C. Fernandes e Prof. Dra. Maria Aparecida Marin Morales, do Laboratório de Citologia de Insetos e Mutagênese, Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro pelo auxílio nos testes de mutagenicidade;

À Estação de Tratamento de Esgoto de Americana (ETE/DAE), em especial ao Engenheiro Leandro Tresoldi, por possibilitar a realização deste trabalho;

À Indústria Toyobo Ltda que forneceu material da planta Raiz-Forte e do fungo *Pleurotus ostreatus* necessários para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Christian Blaise, do Center Saint Laurent, Environmental Canadá, pela oportunidade, confiança, orientação e acolhida em seu laboratório;

À Capes pela oportunidade concedida através da bolsa de doutorado-sanduíche.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO	16
Referências.....	17
2 DEGRADAÇÃO DE CORANTES E EFLUENTES POR MICRORGANISMOS E PLANTA RAIZ-FORTE (<i>Cochlearia armoracia</i>)	18
Resumo	18
Abstract.....	20
2.1 Introdução	21
2.2 Desenvolvimento	22
2.2.1 Revisão de Literatura	22
2.2.1.1 Degradação de compostos xenobióticos	22
2.2.1.2 Estação de Tratamento.....	24
2.2.1.3 Corantes Têxteis	25
2.2.1.4 Tratamentos Físico-Químicos.....	28
2.2.1.5 Degradação de corantes por bactérias.....	31
2.2.1.6 Degradação de corantes por Cianobactérias	35
2.2.1.7 Degradação de corantes por fungos basidiomicetos	36
2.2.1.8 Fitorremediação através do uso de materiais de plantas.....	43
2.2.1.9 Toxicidade	45
2.2.2 Material e Métodos	48
2.2.2.1 Degradação do efluente, lodo e corantes técnicos	48
2.2.2.1.1 Efluente e Lodo Têxtil	48
2.2.2.1.2 Corantes	48
2.2.2.1.3 Organismos utilizados na degradação.....	49
2.2.2.1.4 Avaliação da degradação do efluente	49
2.2.2.2 Degradação pelos fungos basidiomicetos <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus sajor-caju</i>	49
2.2.2.2.1 Manutenção das culturas.....	49
2.2.2.2.2 Degradação do efluente	49

2.2.2.2.3	Degradação por cianobactérias	50
2.2.2.2.4	Degradação pela planta Raiz Forte	50
2.2.2.2.5	Degradação por <i>Acinetobacter johnsonnii</i>	50
2.2.2.2.6	Degradação anaeróbia.....	51
2.2.2.3	Degradação do lodo	51
2.2.2.3.1	Degradação do lodo pela planta raiz forte	51
2.2.2.3.2	Degradação do lodo por <i>P. ostreatus</i> e <i>P. sajor-caju</i>	51
2.2.2.3.3	Degradação do lodo por cianobactérias	52
2.2.2.4	Atividade enzimática	52
2.2.2.5	Testes de toxicidade.....	53
2.2.2.5.1	Manutenção dos organismos.....	53
2.2.2.5.2	<i>Hydra attenuata</i>	53
2.2.2.5.3	<i>Selenastrum capricornutum</i>	54
2.2.2.5.4	Alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	54
2.2.2.6	Análise do efeito tóxico do efluente sobre os fungos basidiomicetos através de microscopia eletrônica.....	55
2.2.2.7.1	Descoloração do índigo	55
2.2.2.7.2	Degradação do índigo com diferentes soluções de nutrientes	56
2.2.2.7.3	Teste de genotoxicidade utilizando raiz de cebola (<i>Allium cepa</i>)	57
2.2.2.7.4	Análise dos Metabólitos.....	58
2.2.3	Resultados e Discussão	58
2.2.3.1	Degradação pela planta Raiz-forte.....	58
2.2.3.1.1	Atividade da enzima peroxidase na planta	58
2.2.3.1.2	Descoloração dos corantes técnicos.....	59
2.2.3.1.3	Descoloração do efluente.....	60
2.2.3.1.4	Descoloração do lodo têxtil	60
2.2.3.1.5	Testes de Toxicidade	61
2.2.3.1.5.1	Efluente têxtil.....	61
2.2.3.1.5.2	Efluente tratado com raiz-forte + inóculo da Estação de Tratamento (ETE)	64
2.2.3.1.5.3	Efluente tratado com raiz-forte + <i>Acinetobacter johnsonnii</i>	65
2.2.3.1.5.4	Lodo	66
2.2.3.2	Degradação do efluente e lodo por cianobactérias	67
2.2.3.2.1	Descoloração dos corantes técnicos.....	67

2.2.3.2.2 Descoloração do efluente.....	68
2.2.3.2.3 Testes de toxicidade com o efluente	68
2.2.3.2.4 Descoloração do Lodo	70
2.2.3.2.5 Testes de toxicidade com o Lodo	70
2.2.3.3 Degradação do efluente por <i>Acinetobacter johnsonii</i>	71
2.2.3.3.1 Descoloração dos corantes técnicos e efluente	71
2.2.3.3.2 Teste de toxicidade	72
2.2.3.4 Degradação dos corantes técnicos, efluente e lodo pelos fungos basidiomicetos	73
2.2.3.4.1 Descoloração dos corantes técnicos pelos fungos basidiomicetos	73
2.2.3.4.2 Testes de Toxicidade com o efluente têxtil	73
2.2.3.4.3 Produção de enzimas	75
2.2.3.4.4 Degradação do lodo têxtil pelos fungos basidiomicetos.....	76
2.2.3.4.4.1 Avaliação da descoloração por refletância	76
2.2.3.4.4.2 Testes de toxicidade com o lodo têxtil.....	77
2.2.3.4.4.3 Produção de enzimas	79
2.2.3.4.4.4 Carbono Orgânico Total	79
2.2.3.4.4.5 Análise de metais pesados e outros cátions	80
2.2.3.4.5 Análise em microscopia eletrônica	82
2.2.3.5 Degradação do efluente em meio anaeróbico e anaeróbico + aeróbico	85
2.2.3.5.1 Descoloração do efluente.....	85
2.2.3.5.2 Testes de Toxicidade	86
2.2.3.6 Degradação do corante índigo em Bioreator pela cianobactéria <i>Phormidium</i>	87
2.2.3.6.1 Descoloração do índigo	87
2.2.3.6.2 Descoloração do índigo em diferentes soluções de nutrientes	89
2.2.3.6.3 Teste de toxicidade com <i>Hydra</i>	91
2.2.3.6.4 Teste de Mutagênicidade com <i>Allium cepa</i>	91
2.2.3.6.5 Análise dos metabólitos	94
2.3 Considerações Finais	96
Referências.....	98
3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SEDIMENTOS UTILIZANDO O TESTE LUMINOTOX	112
Resumo	112
Abstract.....	113

3.1 Introdução	114
3.2 Desenvolvimento	115
3.2.1 Material e Métodos	115
3.2.1.1 Local	115
3.2.1.2 Sedimentos.....	115
3.2.1.3 Testes de toxicidade.....	116
3.2.1.3.1 Microtox fase sólida.....	116
3.2.1.3.2 Luminotox fase líquida	116
3.2.1.4 Testes com sedimentos de referência para Luminotox fase sólida.....	116
3.2.1.4.1 Técnicas diretas.....	117
3.2.1.4.2 Técnicas do Elutriato	117
3.2.1.5 Otimização das condições do teste	117
3.2.1.6 Teste Luminotox com outros sedimentos de referência	117
3.2.1.7 Teste Luminotox (TDF) com amostras naturais coletadas em três diferentes localidades	118
3.2.2 Resultados e Discussão	118
3.2.2.1 Teste Luminotox com os sedimentos Sud-1 e Ec-6.....	118
3.2.2.2 Otimização das condições do teste	120
3.2.2.3 Teste Luminotox com outros sedimentos de referência	121
3.2.2.4 Teste Luminotox (TDF) com amostras naturais coletadas em três localidades	126
3.3 Conclusões	129
Referências.....	130
ANEXOS	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem da Estação de Tratamento de Americana (ETE/DAE) com vista parcial do decantador secundário e ao fundo o reator biológico	25
Figura 2 - Fórmula Estrutural do Índigo	58
Figura 3 - <i>Pleurotus sajor-caju</i> F2: a. controle MEV (1000x); b. controle MET; c. efluente MEV (1000x); e d. efluente MET.....	83
Figura 4 - <i>Pleurotus sajor-caju</i> F6: a. controle MEV (1000x); b. controle MET; c. efluente MEV (1000x); e d. efluente MET	84
Figura 5 - <i>Pleurotus ostreatus</i> : a. controle MEV (1000x); b. controle MET; c. efluente MEV (1000x); e d. efluente MET	85
Figura 6 - Bioreator inoculado com a cianobactéria <i>Phormidium</i> após 16 dias de incubação	88
Figura 7 - Porcentagem de degradação do corante índigo em Bioreator por <i>Phormidium</i>	88
Figura 8 - Descoloração do índigo nos diferentes meios de cultura (na ordem): Controle Escuro, Controle luz, índigo, Solução A, Solução B, Solução C, macronutrientes, NPK, NP, N e P.....	90
Figura 9 - Branco: Micronúcleos	92
Figura 10 - Índigo: a. Micronúcleos; b. ponte cromossômica; c. atraso cromossômico e d. aderência	93
Figura 11 - <i>Phormidium</i> : a. aderência; b. atraso cromossômico e c. poliplóide	94
Figura 12 - Passos da degradação do índigo	95
Figura 13 - Porcentagem de inibição das enzimas PECs nas diferentes concentrações do sedimento Sud- 1, pela Técnica Direta (TD), Direta Filtrada (TDF), Elutriato Filtrado (TEF), Elutriato Centrifugado (TEC) e Microtox	119
Figura 14 - Porcentagem de inibição das enzimas PECs nas diferentes concentrações do sedimento Ec-6, pela Técnica Direta (TD), Direta Filtrada (TDF), Elutriato Filtrado (TEF), Elutriato Centrifugado (TEC) e Microtox	119
Figura 15 - Porcentagem de inibição das enzimas PECs para o sedimento Sud-1 variando-se o tempo de incubação (15 e 30 min), a quantidade de enzima (100 e 200 µl) e o tempo de agitação (4 e 24 h) com as diferentes técnicas de exposição	120

Figura 16 - Porcentagem de inibição das enzimas PECs para o sedimento Ec-6 variando-se o tempo de incubação (15 e 30 min), a quantidade de enzima (100 e 200 µl) e o tempo de agitação (4 e 24 h), com as diferentes técnicas de exposição	121
Figura 17 - Porcentagens de inibição para TDF, TEC e Microtox para os oito sedimentos de referência orgânicos	123
Figura 18 - Porcentagens de inibição para TDF, TEC e Microtox para os seis sedimentos de referência inorgânicos	124
Figura 19 - Correlação entre o IC ₅₀ obtido através das técnicas TDF e Microtox para os oito sedimentos de referência orgânicos	125
Figura 20 - Correlação entre o IC ₅₀ obtido através das técnicas TDF e Microtox para 13 sedimentos de referência	125
Figura 21 - Porcentagens de inibição para TDF e Microtox para os sedimentos coletados no Rio Saint Lawrence (Canadá)	126
Figura 22 - Porcentagens de inibição para TDF e Microtox para os sedimentos coletados no Lago de Burlington (Canadá)	127
Figura 23 - Porcentagens de inibição para TDF e Microtox para os sedimentos coletados no Lagos de Berlim (Alemanha)	127
Figura 24 - Correlação entre o IC ₅₀ obtido através das técnicas TDF e Microtox para os 10 sedimentos naturais	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade da enzima peroxidase na planta raiz-forte	59
Tabela 2 - Porcentagem de descoloração dos corantes técnicos pela planta raiz-forte	59
Tabela 3 - Porcentagem de descoloração do efluente tratado com raiz-forte	60
Tabela 4 - Leituras da refletância do lodo tratado e não tratado com raiz-forte	61
Tabela 5 - Valores de NOEC e LOEC para <i>Hydra attenuata</i> para o efluente tratado e não tratado com raiz-forte	62
Tabela 6 - Porcentagens de inibição sobre a alga <i>Selenastrum capricornutum</i> para o efluente tratado e não tratado com raiz-forte	63
Tabela 7 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o efluente tratado e não tratado com raiz-forte	63
Tabela 8 - Valores de NOEC e LOEC para <i>Hydra attenuata</i> para o efluente tratado com raiz-forte + inóculo ETE	64
Tabela 9 - Porcentagens de inibição sobre a alga <i>Selenastrum capricornutum</i> para o efluente tratado com raiz-forte + inóculo ETE	64
Tabela 10 - Valores de NOEC e LOEC para <i>Hydra attenuata</i> para o efluente tratado com raiz-forte + <i>A.johnsonii</i>	65
Tabela 11 - Porcentagens de inibição sobre a alga <i>Selenastrum capricornutum</i> para o efluente tratado com raiz-forte + <i>A. johnsonii</i>	65
Tabela 12 - Porcentagem de inibição sobre a alga <i>Selenastrum capricornutum</i> para o lodo tratado e não tratado com raiz-forte	66
Tabela 13 - Porcentagem de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o lodo tratado e não-tratado com raiz-forte	67
Tabela 14 - Porcentagem de descoloração dos corantes técnicos por cianobactérias	67
Tabela 15 - Porcentagem de descoloração do efluente tratado com cianobactérias	68
Tabela 16 - Valores de NOEC e LOEC para o efluente tratado com cianobactérias sobre <i>Hydra attenuata</i>	69
Tabela 17 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o efluente tratado com cianobactérias	69
Tabela 18 - Valores de NOEC e LOEC para o lodo tratado com cianobactérias sobre <i>Hydra attenuata</i>	70

Tabela 19 - Inibição sobre a germinação das sementes de alface após tratamento do lodo com as cianobactérias	71
Tabela 20 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o lodo tratado com cianobactérias	71
Tabela 21 - Valores de NOEC e LOEC para o efluente tratado com <i>Acinetobacter johnsonii</i> sobre <i>Hydra attenuata</i>	72
Tabela 22 - Porcentagem de inibição sobre a alga <i>Selenastrum capricornutum</i> para o efluente tratado com <i>Acinetobacter johnsonii</i>	72
Tabela 23 - Porcentagem de descoloração dos corantes técnicos tratados com as linhagens de <i>Pleurotus</i>	73
Tabela 24 - Valores de NOEC e LOEC para o efluente tratado com as linhagens de <i>Pleurotus</i> ativas e inativadas sobre <i>Hydra attenuata</i>	74
Tabela 25 - Inibição sobre a germinação de sementes após tratamento do efluente com as linhagens de <i>Pleurotus</i>	74
Tabela 26 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o efluente inoculado com as linhagens de <i>Pleurotus</i> ativas e inativadas	75
Tabela 27 - Atividade das enzimas manganês peroxidase, lacase e lignina peroxidase dos fungos basidiomicetos na presença do efluente após 30 dias de incubação	76
Tabela 28 - Refletância do lodo tratado por 30 dias com as linhagens de <i>Pleurotus</i>	76
Tabela 29 - Valores de NOEC e LOEC para o lodo tratado com as linhagens de <i>Pleurotus</i>	77
Tabela 30 - Porcentagem de inibição sobre a alga <i>Selenastrum capricornutum</i> para o lodo tratado com as linhagens de <i>Pleurotus</i>	78
Tabela 31 - Inibição sobre a germinação das sementes após tratamento do lodo com as linhagens de <i>Pleurotus</i>	78
Tabela 32 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o lodo tratado com as linhagens de <i>Pleurotus</i>	78
Tabela 33 - Atividade das enzimas manganês peroxidase, lacase e lignina peroxidase pelos fungos Basidiomicetos na presença do lodo têxtil	79
Tabela 34 - Teor de Carbono Orgânico Total, Nitrogênio total e relação C/N do resíduo sólido após incubação a 28°C, por trinta dias	80

Tabela 35 - Porcentagens de elementos presentes no lodo tratado com as linhagens de <i>Pleurotus</i>	81
Tabela 36 - Teores ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de microelementos presentes no lodo tratado com as linhagens de <i>Pleurotus</i>	81
Tabela 37 - Porcentagem de descoloração do efluente em meio anaeróbio e anaeróbio + aeróbio	86
Tabela 38 - Valores de NOEC e LOEC (letal e sub-letal) para o efluente tratado anaeróbio e tratado anaeróbio+aeróbio sobre <i>Hydra attenuata</i>	86
Tabela 39 - Porcentagem de inibição sobre a alga <i>Selenastrum capricornutum</i> para o efluente tratado anaeróbio e anaeróbio + aeróbio	87
Tabela 40 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o efluente tratado anaeróbio e anaeróbio+aeróbio	87
Tabela 41 - Porcentagens de degradação do índigo por <i>Phormidium</i> em meios de cultura contendo um ou mais nutrientes	89
Tabela 42 - Crescimento da <i>Phormidium</i> em meios de cultura contendo um ou mais nutrientes	90
Tabela 43 - Índices Mitótico, de Micronúcleos e de Mutagenicidade e anormalidades mais comuns em amostras expostas ao corante índigo 0,02% e o mesmo tratado com <i>Phormidium</i>	92

RESUMO

Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP.

As indústrias têxteis da região de Americana geram grande quantidade de efluentes e resíduos sólidos com grande carga de corantes que são naturalmente de difícil degradação. Assim o objetivo do presente trabalho foi avaliar a possibilidade de biodegradação dos corantes têxteis RBBR, índigo e preto enxofre, e dos resíduos resultantes da Estação de Tratamento de Esgoto da cidade de Americana, SP, (DAE Americana), a qual trata 400 l s⁻¹ de esgoto municipal junto com efluentes de 43 indústrias têxteis. Foram testados quanto à capacidade de degradação a bactéria *Acinetobacter johnsonii*, os fungos basidiomicetos *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus ostreatus*, várias espécies de cianobactérias e também material da planta raiz-forte contendo alto teor de enzimas peroxidases. A eficiência da degradação foi avaliada em termos de descoloração através de espectrofotometria para as amostras líquidas e refletância para as amostras sólidas, e toxicidade utilizando como bioindicadores *Hydra attenuata*, a alga *Selenastrum capricornutum*, raízes de cebola (*Allium cepa*) e sementes de alface (*Lactuca sativa*). A atividade das enzimas ligninolíticas produzidas pelos fungos basidiomicetos foi determinada e alterações celulares durante a degradação foram estudadas através de microscopia eletrônica. Foi também padronizado um teste novo para uso com amostras sólidas, atualmente utilizado para amostras líquidas, chamado Luminotox. Este teste utiliza enzimas extraídas do sistema fotossintético de plantas para estimar a toxicidade das amostras, utilizando como parâmetro a redução na fluorescência emitida por estas enzimas. Vários procedimentos foram testados para exposição das enzimas às amostras e os resultados comparados com o teste Microtox. Os organismos testados foram capazes de degradar os corantes técnicos índigo e RBBR e foram eficientes na descoloração e diminuição da toxicidade do efluente da ETE. A cianobactéria *Phormidium* foi capaz de degradar o corante índigo completamente e foi então testada com sucesso em Bioreator de 6 l. Os fungos Basidiomicetos e a planta raiz-forte mostraram serem capazes de descolorir o lodo da ETE, entretanto a toxicidade foi aumentada após o tratamento.

Palavras-chave: Efluente, Lodo, Corantes têxteis, Cianobactérias, Bioensaios, Luminotox

ABSTRACT

Biodegradation and toxicity of textile dyes and wastes from a Municipal Treatment Station, Americana, SP.

The degradation of three textile dyes (RBBR, Indigo and Sulfur Black) and also the wastewater from the Municipal Treatment Station, Americana, SP, Brazil, which treats 400 l s⁻¹ of effluent from domestic and textiles mill, were studied. The decolorization was tested for several organisms including bacterium, white-rot fungi, cyanobacterium and horseradish roots. Detoxification was appraised with three bioassays comprising the cnidarian *Hydra attenuata*, the alga *Selenastrum capricornutum* and lettuce seeds. The ligninolytic enzyme activity of the white-rot fungi strains was evaluated and cellular alterations were also studied by electron microscopy. The organisms decolorized the dyes indigo, RBBR and the effluent studied, with color removal and toxicity reduction. The cyanobacterium *Phormidium* was able to degrade completely the indigo dye in a Bioreactor with 6 l of capacity without increase in the toxicity. The sludge was decolorized by white rot fungi and horseradish, but the toxicity increased after the treatment. However, since the organisms showed the ability to decolorize these residues, it can be used as pre-treatment resulting in a less complex composition of sludge. After that, a study for developing a protocol for analyzing sediment samples was made based in a recent toxicity test for liquid samples. This test uses enzymes extracted from thylacoids membranes of plant photosynthetic system for evaluate the toxicity, using as parameter the fluorescence emitted by the enzymes. Several procedures were tested for exposition of the enzymes to sediment and the results were compared with the Microtox test.

Keywords: Effluent, Sludge, Textile dyes, Cyanobacterium, Bioassays, Luminotox

1 INTRODUÇÃO

A questão do descarte de resíduos no ambiente tem sido ainda um problema sem solução adequada para muitos casos, os quais envolvem resíduos cujas características físico-químicas os tornam de difícil degradação pelas tecnologias convencionais. Vários tratamentos têm sido desenvolvidos para o tratamento de resíduos de diferentes características, os quais englobam tratamentos físico-químicos ou biológicos, sendo este último o mais utilizado. Vários organismos podem ser utilizados na degradação como bactérias, fungos ou plantas, e a eficiência de um ou outro depende em muitos casos da estrutura da molécula e da presença de enzimas hábeis para degradar o produto, as quais apresentam especificidade para a maioria dos substratos (MEYER, 1978).

Além da preocupação com a poluição dos nossos recursos naturais, outra preocupação são os efeitos que estas substâncias liberadas no ambiente podem trazer à saúde humana. Estes resíduos se bioacumulam nos organismos vivos vindo a atingir a cadeia alimentar. Muitas dessas substâncias possuem potencial mutagênico e cancerígeno e os efeitos de sua entrada constante nos organismos ainda não são completamente conhecidos (BUMPUS, 1995). Considerando que a maioria dos corantes possui meia-vida elevada, resíduos liberados persistem no ambiente por períodos muito longos e o tempo que seus efeitos continuam a serem sentidos podem superar décadas. A tendência tem sido a substituição de produtos muito tóxicos por outros menos prejudiciais ao ambiente, porém somente alguns corantes muito tóxicos à base de benzidina foram substituídos até agora (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Efluentes têxteis possuem características variadas e diferentes composições, que dependem do tipo de corante utilizado em cada caso e do processo de coloração (BRAILE; CAVALCANTI, 1993). Estas características, aliadas às características químicas que lhe conferem grande estabilidade, dificultam sua degradação. Estudos têm sido realizados com enzimas de largo espectro de ação, como as enzimas extracelulares produzidas por fungos basidiomicetos (BANAT et al., 1996).

Devido à complexidade desses resíduos, muitas vezes a degradação tem sido obtida com a combinação de mais de um tratamento. Assim, alguns tratamentos são capazes de remover a cor, porém não degradam completamente a molécula, necessitando um tratamento posterior para

completar a degradação dos metabólitos formados. Enzimas não específicas, em geral, são capazes de iniciar a degradação aumentando a degradabilidade para o tratamento seguinte.

O tratamento biológico por lodo ativado tem sido o tratamento mais utilizado para efluentes domésticos e de indústrias têxteis, embora não remova eficientemente a cor dos efluentes e produza um outro resíduo em grande quantidade, o lodo, o qual concentra elevada quantidade de corantes adsorvidos e não pode ser descartado em aterros comuns.

A região de Americana-SP concentra a maior parte das indústrias têxteis do país e seus efluentes são tratados conjuntamente em uma Estação Municipal de Tratamento, com parte do esgoto da cidade. A descoloração do efluente e lodo desta estação foi estudada utilizando vários organismos, buscando aumentar a eficiência na degradação e destoxificação destes resíduos.

Referências

- BANAT, I. M.; NIGAM, P.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R. The isolation of thermophilic bacterial cultures capable of textile dyes decolorization. **Environmental International**, New York, v. 23, p. 547-551, 1997.
- BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 1993. 764 p.
- BUMPUS, J. A. Microbial degradation of azo dyes. In: SINGH, V. P. **Biotransformations: microbial degradation of health risk compounds**. New York: Elsevier Science, 1995. p. 157-177.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 71-78, 2000.
- MEYER, U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: BROWN, A. W. A. **Ecology of Pesticides**. New York: John Wiley, 1978. 525 p.

2 DEGRADAÇÃO DE CORANTES E EFLUENTES POR MICRORGANISMOS E PLANTA RAIZ-FORTE (*Cochlearia armoracia*)

Resumo

As indústrias têxteis são responsáveis pela geração de grande quantidade de resíduos com baixos níveis de degradação, incluindo os corantes. A biodegradação de três corantes têxteis técnicos, RBBR, índigo e preto enxofre foi estudada utilizando diversos microrganismos, tais como: bactéria, fungos basidiomicetos, cianobactérias e também material da planta raiz-forte contendo alto teor de enzima peroxidase, buscando identificar um organismo com potencial para degradação destes compostos. Com o mesmo propósito, a degradação do efluente e resíduo sólido resultante da Estação de Tratamento de Esgoto da cidade de Americana, SP, (DAE Americana), a qual trata 400 l s⁻¹ de esgoto municipal junto com efluentes de 43 indústrias têxteis, foi estudada pelos mesmos organismos. A descoloração do efluente líquido foi avaliada através de espectrofotometria e do lodo através de refletância. A eficiência dos tratamentos foi determinada pela avaliação da toxicidade utilizando como bioindicadores *Hydra attenuata*, a alga *Selenastrum capricornutum* e sementes de alface (*Lactuca sativa*). A planta raiz-forte foi capaz de descolorir o efluente e lodo, no entanto ocorreu um aumento na toxicidade após o tratamento indicando a formação de compostos mais tóxicos que os produtos originais oriundos da degradação ou da própria planta. A toxicidade não diminuiu com a combinação de um tratamento aeróbio convencional, por bactérias. A toxicidade do efluente diminuiu após incubação com os fungos basidiomicetos, enquanto no lodo o tratamento resultou em aumento da toxicidade. As linhagens F2 e F6 de *Pleurotus sajor-caju* foram capazes de descolorir o lodo com maior eficiência que *P. ostreatus*. A atividade das enzimas ligninolíticas produzidas pelos fungos basidiomicetos foi determinada. A maior quantidade de enzimas, no entanto, foi encontrada na presença do fungo *P. ostreatus*, indicando que além das enzimas outros fatores devem estar envolvidos na degradação. O tratamento anaeróbio-aeróbio mostrou ser eficiente para a degradação do efluente, sendo que a cor foi totalmente removida durante o processo anaeróbio e a toxicidade foi reduzida após o tratamento aeróbio. As cianobactérias foram capazes de descolorir o efluente com redução na toxicidade, mas foram pouco eficientes na degradação do lodo. A cianobactéria *Phormidium autumnale* foi capaz de descolorir completamente o corante técnico índigo em meio de cultura e foi testada posteriormente em Bioreator com capacidade de 6 litros onde degradou o corante com

a mesma eficiência. Os corantes técnicos índigo e RBBR foram descoloridos/degradados pelos organismos estudados, enquanto preto-enzofre apresentou maior resistência à degradação. Os organismos foram eficientes na descoloração e diminuição da toxicidade do efluente e degradação do resíduo sólido, entretanto a toxicidade do resíduo sólido aumentou após o tratamento, mostrando que sua degradação requer tratamento mais complexo, com auxílio de vários organismos ou combinação de tecnologias.

Palavras-chave: Corantes têxteis, Bioensaios, *Pleurotus*, Cianobactérias, Raiz-forte

Degradation of textile mill effluents by microorganisms and horseradish (*Cochlearia armoracia*)

Abstract

The textile mill leads the formation of great amount of recalcitrant residues, including dyes. The decolorization of the dyes RBBR, Indigo and Black sulfur were studied by several organisms including bacterium, white-rot fungi, cyanobacterium and horseradish roots and the wastewater from a Municipal Treatment Station, Americana, SP, Brazil, which treats 400 l s⁻¹ of effluent from domestic and textile origin. The decolorization was evaluated by espectrophotometry for the effluent and reflectance for the sludge. Detoxification was appraised with three bioassays, comprising the cnidarian *Hydra attenuata*, the alga *Selenastrum capricornutum* and lettuce seeds. The plant horseradish, which contains high amount of peroxidase, was able to decolorize this effluent in 2 h and the solid waste in 2 days, at concentration of 10 and 50%, respectively. However, there was an increase in the toxicity for the bioassays, indicating formation of more toxic substances. Combining conventional bacterial aerobic treatment with horseradish did not result in toxicity reduction. The strains *P. sajor-caju* F2 and F6 were able to decolorize the sludge, but *P. ostreatus* was less efficient. The effluent toxicity decreased but not that of its sludge. The ligninolytic enzyme activities of the white-rot fungi strains were evaluated. The three strains produced manganese-peroxidase and laccase enzymes, with the highest production by *Pleurotus ostreatus*, indicating that others factors are involved in the decolorization. The anaerobic-aerobic treatment was able to degrade the effluent with complete decolorization in the anaerobic medium and toxicity reduction after the aerobic one. *P. autumnale* and *Synechococcus* sp. showed potential to remediate textile effluent, removing the color and reducing the toxicity for the three organisms tested, however the growth on the sludge was poor and its decolorization was insignificant. The cyanobacterium *P. autumnale* degraded completely the indigo dye in culture medium and it was further tested in a 6 l-capacity Bioreactor, showing the same degradation efficiency. The organisms decolorized the dyes and residues studied, but detoxification was obtained mainly for the effluent, while the sludge showed increase in the toxicity. It was concluded the solid residue needs a more complex treatment, with a variety of organisms or techniques combination.

Keywords: Textile dyes, Bioassays, *Pleurotus*, Cyanobacterium, Horseradish

2.1 Introdução

A poluição gerada pelo despejo de resíduos tóxicos no ambiente tem resultado em comprometimento de recursos essenciais à vida, como a água. O crescimento populacional e o desenvolvimento industrial têm elevado enormemente a quantidade de resíduos gerados, e estes não podem mais ser absorvidos e reciclados na natureza, devendo receber tratamento adequado antes do descarte no ambiente.

Muitas destas substâncias ainda não têm um método adequado de tratamento estabelecido e assim, efluente tratados não eficientemente têm sido descartados no ambiente contendo ainda alta carga poluidora. Muitos destes resíduos são tóxicos e podem ser cancerígenos, embora algumas substâncias tóxicas e persistentes tenham tido seu uso proibido e foram substituídas por outras menos poluentes. Cerca de 3.000 corantes azos comerciais foram considerados cancerígenos e não têm sido mais fabricados. Porém, em países do terceiro mundo continuam em uso alguns corantes de valor comercial elevado.

As indústrias têxteis são responsáveis pela geração de grande quantidade de resíduos com baixos níveis de degradação, incluindo os corantes e, conseqüentemente, dificuldade de tratamento e disposição final. A degradação biológica tem tido sucesso em alguns casos, porém a baixa degradabilidade destes compostos tem resultado em níveis de degradação não satisfatórios.

Estes resíduos apresentam grande potencial de poluição, principalmente dos mananciais. Devido às suas características químicas que lhe conferem grande estabilidade, eles são bastante persistentes no ambiente. Sua toxicidade varia com o grupo químico e estrutura, sendo os mais tóxicos os corantes à base de benzidinas e catiônicos.

Várias tecnologias têm sido empregadas para o tratamento destes resíduos, sendo mais comuns o uso de tratamento biológico por lodo ativado, reatores anaeróbios e tratamentos físico-químicos. Na maioria dos casos, o tratamento por lodo ativado tem resultado em incompleta remoção da cor e formação de grande volume de lodo. Este lodo não pode ser descartado no ambiente, necessitando de um novo tratamento, geralmente land-farming ou compostagem, ou ser armazenado como resíduo passivo em aterros industriais.

Para a degradação ser considerada eficiente deve resultar em redução nos níveis de toxicidade pela completa degradação das moléculas sem a formação de metabólitos tóxicos.

Assim sendo, a formação de metabólitos durante a degradação pode ser monitorada através de testes utilizando organismos sensíveis a substâncias tóxicas como bioindicadores.

Maiores níveis de degradação são obtidos através da seleção de microrganismos com habilidade para a degradação e estudo das condições favoráveis do meio. A ampla variedade estrutural dos corantes, porém, dificulta o isolamento de organismos capazes de degradar os diversos grupos químicos presentes. Ênfase tem sido dada ao estudo de enzimas com largo espectro de ação como peroxidases e lacases.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a degradação de corantes técnicos e resíduos contendo corantes têxteis da Estação de Tratamento de Americana, SP, por diversos organismos, tais como cianobactérias, bactérias, fungos basidiomicetos e também material vegetal com alta atividade enzimática, com a finalidade de encontrar organismos com potencial para biorremediação destes resíduos.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão de Literatura

2.2.1.1 Degradação de compostos xenobióticos

Xenobióticos são substâncias químicas produzidas pelo homem, que após cumprirem sua função, invariavelmente, são descartadas no ambiente alterando o equilíbrio dos ecossistemas e pondo em risco a saúde humana (VAZOLLER, 2001). Estas substâncias e seus metabólitos podem ser tóxicos, mutagênicos e até cancerígenos e ao entrar na cadeia alimentar podem causar sérios danos à saúde humana.

Estas substâncias após entrarem no ambiente podem sofrer degradação biótica ou abiótica e, dependendo das suas características químicas, persistir por longos períodos de tempo. A biodegradação, causada pela ação biológica de enzimas, resulta na decomposição desses compostos com a formação de dióxido de carbono, água, produtos orgânicos e inorgânicos de ocorrência comum, podendo haver a formação de metabólitos tóxicos, quando a degradação é incompleta (BOLLAG, 1992).

Na degradação anaeróbia o composto orgânico é degradado para vários metabólitos intermediários em várias etapas, tais como ácidos, álcoois, CO₂, hidrogênio, acetato, dentre outros, tendo como produto final o metano. Cada etapa da degradação é realizada por um tipo de microrganismo especializado e a degradação depende da cooperação entre as culturas bacterianas, pois o metabólito produzido por um grupo de bactérias pode servir como nutrientes para o crescimento de outras bactérias. Entre os grupos presentes estão bactérias hidrolíticas-fermentativas, acetogênicas produtoras de hidrogênio e metanogênicas (VAZOLLER, 2001).

A utilização de microrganismos no saneamento básico e ambiental é prática comum desde os primórdios do desenvolvimento dos processos biológicos de tratamento de águas residuárias e resíduos sólidos. É evidente que a capacidade microbiana de catabolizar diferentes compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e inorgânicos, extraindo desses compostos fontes nutricionais e energéticas, é o que possibilitou o emprego desses agentes biológicos, pela engenharia sanitária, como solução aos problemas gerados pelos rejeitos lançados no ambiente (VAZOLLER, 2001).

Os tratamentos de descontaminação biológica requerem a combinação de conhecimentos da ecologia microbiana e dos processos de engenharia, pois o envolvimento desses processos visa criar condições favoráveis de crescimento e atividades microbianas capazes de promoverem a descontaminação do solo sem prejuízos ambientais (SIQUEIRA et al., 1994). Os métodos de biorremediação são classificados em duas categorias principais: a biorremediação *in situ* e *ex-situ*.

A biorremediação *in situ* de áreas contaminadas pode ser feita através da estimulação da microbiota nativa com a adição de nutrientes e regulação das condições do meio ou através da inoculação de microrganismos com habilidade para a degradação. Estes são isolados em áreas contaminadas e, após estudo das condições do meio mais favoráveis para o crescimento e outros fatores que podem afetar a degradação, são enriquecidos e reinoculados. Alguns fatores a serem observados durante a biorremediação, além das condições do meio (pH, nutrientes, aeração), são a presença ou não de produtos inibitórios à atividade microbiana e se os produtos estão disponíveis para a ação dos microrganismos (SIQUEIRA et al., 1994).

Degradações *ex-situ* podem ser conduzidas em bioreatores aeróbios ou anaeróbios, contendo cultura de microrganismos mista ou pura. Geralmente, a completa mineralização é adquirida por culturas mistas onde metabólitos produzidos por uma cultura são degradados por outro grupo de microrganismos, produzindo assim um produto seguro, livre de metabólitos

tóxicos. Em geral culturas mistas são estáveis a variações de pH, temperatura e composição. Células podem ser imobilizadas de diversas formas dentro do reator, como por exemplo, em pellets ou em suportes fixos (SIQUEIRA et al., 1994).

2.2.1.2 Estação de Tratamento

As Estações de Tratamento são construídas com o objetivo de tratar resíduos domiciliares e industriais minimizando o impacto do descarte destes resíduos no ambiente. Os tratamentos visam remover a carga orgânica e também sólidos sedimentáveis. Geralmente engloba uma fase de decantação dos sólidos suspensos no efluente e uma fase biológica onde o material biodegradável é convertido por microrganismos a CO₂, produtos orgânicos e inorgânicos (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

A região de Americana é o maior pólo de indústrias têxteis do Brasil, contendo 85% das indústrias do gênero no país. Os resíduos de 43 indústrias da região são tratados na Estação de Tratamento de Americana (ETE-DAE/Americana, SP) juntamente com o esgoto de 73% da população da cidade, sendo que cerca de $\frac{3}{4}$ do volume tratado corresponde a efluentes de origem têxtil e $\frac{1}{4}$ do volume corresponde a águas residuárias. A quantidade tratada corresponde a 400 litros de efluente por segundo, sendo gerados 20 toneladas de lodo por dia contendo 30% de teor de sólidos.

O tratamento dessa Estação consiste, primeiramente, de gradeamento do material grosseiro, seguido de remoção de sólidos sedimentáveis em decantador. Em seguida é feito o tratamento biológico por filtros biológicos, onde os microrganismos utilizam a matéria orgânica para obtenção de energia. Após tratamento biológico, o efluente é descartado no ambiente contendo ainda cor, a qual não é eficientemente removida pelo sistema. A eficiência do processo corresponde a cerca de 50% de remoção da carga orgânica.

O lodo resultante deste processo é adensado para redução do teor de água em tanques de sedimentação contendo braços raspadores de lodo. O lodo adensado é retirado do fundo do tanque e o líquido sobrenadante escoar através dos vertedores periféricos para tratamento biológico. Em seguida, o lodo adensado sofre digestão anaeróbia para redução do teor de sólidos e finalmente vai para leitos de secagem para evaporação do excesso de água. Este resíduo é posteriormente armazenado como resíduo passivo.

O descarte do efluente é feito no Rio Piracicaba, o qual pertence à classe 4, a qual não possui qualquer regulamentação quanto à qualidade do efluente que pode ser descartado nos rios pertencentes a esta classe, de acordo com o decreto estadual nº 8468 (1976). Assim, embora o efluente seja descartado ainda contendo cor, a qual não é removida totalmente durante o processo de tratamento destes resíduos, isto não está previsto na lei que regulamenta o descarte destes resíduos (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

Figura 1 - Imagem da Estação de Tratamento de Americana (ETE/DAE) com vista parcial do decantador secundário e ao fundo o reator biológico

2.2.1.3 Corantes Têxteis

Existem cerca de 8.000 produtos químicos utilizados como corantes e cerca de 100.000 produtos comerciais. Estima-se que 7×10^5 toneladas de corantes são produzidas anualmente no mundo (BANAT et al., 1996). O Brasil produz 60% das substâncias que consome e também exporta cerca de 4000 toneladas. A demanda maior é por corantes ácidos e reativos resultantes da grande produção de materiais de couro e algodão no país (GUARATINI; ZANONI, 2000). Os principais grupos comercializados são os corantes azo, antraquinonas e indigóides.

Corantes por serem moléculas complexas são frequentemente degradados por consórcios de microrganismos e não por culturas puras (NIGAM et al., 1996; DANGMANN et al., 1996). Desta forma um microrganismo através de reações de oxidação, redução, hidroxilação, desalogenização, hidrólise, demetilação inicia a quebra da molécula tornando-a susceptível à ação de outros organismos (RAJAGURU et al., 2000). Em alguns casos, a degradação é iniciada em condições anaeróbias e os produtos resultantes são posteriormente degradados em condições aeróbias.

Os corantes estão agrupados em várias classes de acordo com sua estrutura química (antraquinona, azo, indigóides, ftalocianina, triarilmetano, etc.) e modo de fixação à fibra, dentre elas, corantes ácidos, reativos, básicos, diretos, dispersos, azóicos, à cuba, de enxofre e complexados com metais (BANAT et al., 1996). Devido à grande variedade de estruturas, microrganismos são às vezes hábeis para degradar um produto, mas não outro estruturalmente diferente, havendo especificidade entre microrganismo e composto (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002; PASTI-GRIGSBY et al., 1992). Enzimas de largo espectro como lacases, peroxidases, mono e dioxigenases têm sido estudadas como alternativas na degradação.

A degradação é influenciada pela estrutura química da molécula (MEYER, 1978; EKICI; LEUPOLD; PARLAR, 2001). Spadaro; Gold e Renganathan (1992) encontraram maiores taxas de degradação na presença de grupos hidroxila, amina, acetamida, ou nitro grupos ligados ao anel. Corantes contendo grupos como azo ou sulfonados são considerados recalcitrantes à degradação (PAGGA; BROWN, 1986; SHAUL et al., 1991). NIGAM et al. (1996) sugerem que corantes azos contendo grupos amino e hidroxila são degradados em maior extensão que corantes contendo grupos, metil, metoxi, sulfo e nitro. A degradação também foi correlacionada com o número de ligações azo. Corantes sulfonados são mais difíceis de atravessar membranas e, assim, são mais resistentes à degradação, porém podem ser degradados mais facilmente que carboxílicos devido à sua maior eletronegatividade, que faz com que recebam elétrons mais facilmente. Em geral, corantes com estruturas mais simples e pesos moleculares menores exibem maiores taxas de degradação, enquanto moléculas altamente substituídas com elevado peso molecular são mais difíceis de degradar (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003).

Meyer (1978) sugere que propriedades da molécula como solubilidade, característica iônica e grupos substituintes são importantes na degradação microbiana. Também fatores do meio

podem influenciar a degradação, principalmente, presença de carbono e nitrogênio, nutrientes, tempo de incubação, oxigênio, pH, temperatura, etc. (FU; VIRARAGHAVAN, 2001).

Cerca de 10 a 15% dos corantes empregados no processo de coloração dos tecidos são encontrados no efluente como resultado da incompleta fixação durante a etapa de tingimento (KANDELBAUER; GUBITZ, 2001). Propriedades dos corantes têxteis como brilho, cor visível em baixas concentrações, estrutura química estável a luz e ataques químicos tornam-os bastantes resistentes à degradação microbiana. As antraquinonas, que possuem estrutura aromática fundida, e os corantes básicos, que possuem cor muito brilhante e intensa, são muito resistentes à degradação e persistem no efluente por longo tempo. Segundo Robinson et al. (2001) corantes aniônicos, como os reativos e ácidos, são muito solúveis e tendem a passar inalterados pela estação de tratamento, principalmente os que contêm grupos azos, os quais têm forte afinidade por elétrons, o que confere a estas substâncias proteção contra oxigenases.

Durante a degradação, os corantes metálicos ou azo podem sofrer transformações que levam à formação de substâncias cancerígenas como as aminas e os metais livres (BANAT et al., 1996). As aminas são produzidas em condições anaeróbias pela ação de azo-redutases, que são enzimas de baixa especificidade que atuam na quebra da dupla ligação entre dois nitrogênios (azoligação), o qual é o principal passo na degradação destes compostos (BUMPUS, 1995). Corantes à cuba, os quais necessitam da adição de hidrossulfito de sódio como aditivo e corantes do grupo enxofre produzem resíduos muito tóxicos.

O fato dessas substâncias possuírem cor faz com que elas sejam ainda mais indesejáveis no ambiente, devido à poluição visual que causam nos aquíferos. Recentemente a legislação tem exigido a remoção da cor dos efluentes através do estabelecimento de limites, antes que estes possam ser descartados. Em geral, é feita a comparação direta entre a absorbância da amostra de um efluente e o padrão de qualidade requerido para coloração em rios (GUARATINI; ZANONI, 2000). Segundo Clark (1995), conforme o Bulletin Ecological Toxicological Association of Dyestuff – ETAD, níveis abaixo de $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ não causam problemas, enquanto níveis acima de 1 mg l^{-1} levam à poluição visual, depreciando a aparência dos ecossistemas aquáticos. De acordo com o decreto estadual nº 8468 (1976), é obrigatório o tratamento de efluentes têxteis antes do descarte no ambiente, respeitados os padrões para cada classe em que está inserido o corpo d'água. Para rios classe 2 e 3 é proibido o descarte de efluentes que contenham corantes artificiais que não tenham sido removidos durante o tratamento convencional. Para os rios classe 4 não é

feita qualquer referência, enquanto para os rios classe 1 não é permitido descarte de qualquer efluente (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

O efluente da indústria têxtil contém além dos corantes outras substâncias utilizadas durante o processo de colorização tais como gomas, soda cáustica, detergentes, sabões, antiespumantes, cloro, formóis, emulsões, dispersantes, óleos, resinas, etc. Suas características físico-químicas incluem pH entre 8 a 11, sólidos totais variando de 1000 a 1600 mg l⁻¹, teor de sólidos em suspensão de 30 a 50 mg l⁻¹. O volume de água utilizado é muito grande, variando de 120 a 380 litros por metro de tecido processado (BRAILE; CAVALCANTI, 1993). Assim, estes efluentes contêm elevada carga orgânica, possuem pH fortemente alcalino, além da coloração que varia em função dos corantes utilizados. Sua composição está sujeita a variações sazonais que são controladas pelo tipo e etapa do processo em andamento dentro da indústria.

Em alguns casos os efluentes têxteis são tratados juntamente com o esgoto da cidade em Estações de Tratamento convencionais empregando tratamento biológico. Os corantes, neste caso, não devem ser tóxicos aos microrganismos presentes nas Estações de Tratamento, de maneira a não prejudicar o processo biológico.

2.2.1.4 Tratamentos Físico-Químicos

Métodos físico-químicos têm sido testados na degradação de efluentes têxteis, além da degradação biológica. Geralmente, enquanto indústrias de maior porte dão preferência para processos biológicos, indústrias de médio porte têm adotado sistemas de tratamento envolvendo coagulação química, adsorção por carbono ativado e, menos frequentemente, ultrafiltração.

O sistema de coagulação utilizando polieletrólitos ou floculantes inorgânicos (poliacrilamidas e sais de ferro e alumínio) seguido de separação por flotação ou sedimentação apresenta elevada eficiência na remoção de material particulado, porém a remoção de cor e compostos dissolvidos é deficiente (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002). O resultado depende do tipo de corante, composição, concentração e fluxo de produção do rejeito. Entretanto, para se obter uma alta eficiência utiliza-se um excesso de polieletrólitos que pode acrescentar um resíduo adicional ao efluente (GUARATINI; ZANONI, 2000).

As técnicas de adsorção têm se baseado na remoção do corante através da passagem da amostra em carvão ativo ou outros materiais, como turfa, bentonita, lascas de madeira etc. Em geral, consistem em um método lento, não econômico, porém efetivo principalmente para rejeitos

de menor volume. Uma desvantagem deste sistema é que a superfície química do carbono possui cargas positivas, o que restringe a adsorção de corantes catiônicos.

Processos de separação moleculares fundamentados na utilização de membranas, como ultrafiltração e osmose reversa, são baseados na remoção de moléculas de corantes com dimensão suficientemente grande para serem retidas pelo sistema. O sistema pode ser muito eficiente, porém o custo é alto e a limpeza de membranas problemática. Este sistema tem a vantagem de permitir o reuso da água no processo industrial.

Estes sistemas possuem a característica de serem métodos não destrutivos, isto é, o volume dos resíduos é diminuído, porém a disposição das fases sólidas continua sem solução (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002).

Outro processo é a ozonização, o qual promove a clivagem das moléculas através da ação oxidante do ozônio, que se decompõe em oxigênio e espécies radicalares (principalmente OH[•]). A oxidação pode ocorrer de maneira direta através da reação do ozônio com as moléculas orgânicas, ou indireta, através da ação da hidroxila que é gerada pela decomposição do ozônio (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002).

Outro método é a degradação fotocatalítica através da exposição dos corantes à luz ultravioleta na presença de um semicondutor, como TiO₂, criando um meio altamente oxidante que leva à mineralização destes compostos (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002).

Porter e Gomes (2000) encontraram remoção de até 88% do corante Direct Red 2 por filtração em filtro de aço recoberto com camada de dióxido de titânio (TiO₂) e de 99% em filtro de cerâmica também recoberto com dióxido de titânio. Sojka-Ledakowicz et al. (1998) encontraram descoloração de 99,4 e 100% de um efluente sintético por nanofiltração e osmose reversa, respectivamente.

Shu e Huang (1995) encontraram que a ozonização do corante Acid Orange 10 reduziu sua concentração de 42,25 mg dm⁻³ para 0,1 mg dm⁻³. Quando um tratamento por radiação ultravioleta foi associado à ozonização não houve significativo aumento na degradação.

Peralta-Zamora et al. (1999) encontraram que o sistema fotocatalítico composto por radiação ultravioleta na presença de ZnO ou TiO₂ promoveu a completa descoloração e mineralização dos corantes antraquinona C.I. e Reactive Blue 19 após 120 e 60 minutos, respectivamente, enquanto o tratamento com a enzima lignina peroxidase foi capaz de degradar apenas 30% do corante.

Wang (2000) estudou a degradação de oito corantes de diferentes estruturas por radiação solar na presença de TiO_2 como fotocatalizador e encontrou porcentagens de descoloração variando de 81 a 100%. A remoção de carbono orgânico total foi menor que a descoloração, indicando que a degradação não foi total.

Wang et al. (2003) encontrou completa descoloração do corante Remazol Black 5 após 3 h de ozonização. A diminuição da DQO foi de 44% e do carbono orgânico total foi de 25%, indicando a formação de metabólitos de menor tamanho molecular. A DBO aumentou 8 vezes após o tratamento e a relação DBO/DQO aumentou de 1,4 para 30%. Avaliação da toxicidade pelo teste com *Vibrio fischeri* mostrou aumento na toxicidade após 120 minutos e posterior redução após 360 minutos, indicando que os compostos tóxicos foram degradados.

Swaminathan et al. (2003) estudaram a degradação de três corantes através da reação de Fenton (Fe^{2+} e H_2O_2) e encontraram completa descoloração e mineralização dos corantes Red M5B, Blue MR e do metabólito H-ácido.

A combinação de mais de um tratamento pode aumentar a eficiência do sistema, desde que um método pode suprir a deficiência apresentada por outro tratamento sozinho. Como os corantes geralmente são resistentes aos tratamentos convencionais, combinação de dois tratamentos pode aumentar significativamente a degradação. Muitas indústrias têm utilizado o sistema físico-químico de precipitação-coagulação seguido de tratamento biológico por lodo ativado. O sistema tem apresentado alta eficiência com remoção de 80% da carga de corantes (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002).

Arslan-Alaton (2003) encontrou que o tratamento combinado de ozonização com tratamento biológico aumentou a remoção da DQO, que era de 20-30% no tratamento biológico para 70% no tratamento combinado, com completa remoção da cor de 14 corantes reativos.

Ghoreishi e Haghighi (2003) encontraram que o agente redutor NaBH_4 foi capaz de remover 81 a 99% da cor de 7 diferentes corantes dos grupos ácido, reativo e básico. A adição do agente catalítico $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ foi capaz de promover a descoloração de outros 10 corantes que NaBH_4 não havia degradado. Porém, como a DBO continuou elevada e até aumentou após o tratamento pelo decréscimo da DQO, foi realizado um tratamento biológico conjugado. Este tratamento conjugado em dois efluentes promoveu descoloração entre 74 a 88%, redução na DBO de 97 a 100%, redução na DQO de 76 a 83% e de sólidos suspensos de 92 a 97%.

Verificou-se que o tratamento químico converteu compostos não biodegradáveis para compostos biodegradáveis que foram completamente removidos no tratamento biológico.

2.2.1.5 Degradação de corantes por bactérias

A degradação de corantes é usualmente feita em sistemas aeróbios por bactérias, como o sistema de lodo ativado, porém este sistema tem apresentado baixa eficiência na degradação (FU; VIRARAGHAVAN, 2001; MEYER, 1978). A causa desta baixa degradação pode ser a falha em se isolar bactérias com capacidade para a degradação destes compostos (PAGGA; BROWN, 1986; SHAUL et al., 1991), pois degradação de alguns corantes por linhagens de *Pseudomonas* e *Sphingomonas* tem sido documentada na literatura (COUGHLIN; KINKLE; BISHOP, 1999; SARNAIK; KANEKAR, 1999). No entanto, devido à grande variedade de corantes presentes nos efluentes é difícil selecionar uma cultura que degrade a ampla variedade estrutural presente.

Pagga e Brown (1986) avaliaram 87 corantes quanto à descoloração, remoção de carbono orgânico dissolvido e adsorção sob sistema de lodo ativado e verificaram que estes corantes foram pouco degradados neste sistema, resultando em elevada adsorção ao lodo. Shaul et al. (1991) avaliaram a degradação de 18 corantes azos em lodo ativado e observaram que apenas três deles foram biodegradáveis. A baixa degradação dos outros corantes foi atribuída à presença de grupos substituintes do tipo ácido sulfônico.

No entanto, Sarnaik e Kanekar (1999) encontraram descoloração de 99% do corante metil violeta por *Pseudomonas mendocina* após 24 h, em meio aeróbio, com redução de 86,53% do carbono orgânico total. Foram encontrados três metabólitos não identificados, além de fenol, com mineralização de 4,9%. Chen (2002) encontrou degradação do corante azo Reactive Black B por *Pseudomonas luteola*, através da quebra das ligações azo e formação de aminas.

Coughlin; Kinkle e Bishop (1999) encontraram uma espécie de *Sphingomonas* capaz de degradar aeróbicamente vários corantes do grupo azo, dentre eles, Orange II, Acid Orange 8 e Acid Orange 10, com porcentagens de até 99% após 96 h. Todos estes corantes continham em sua estrutura 1-amino-2-naftol, e os corantes que não continham esta estrutura não foram degradados. Acid Red 4, o qual possui 2-amino-1-naftol na sua estrutura, foi degradado em meio rico, mas não em meio mineral contendo o corante como única fonte de carbono, indicando cometabolismo. Kudlich et al. (1996) também observaram degradação do corante Mordant

Yellow 3 pela bactéria *Sphingomonas*. Esta foi imobilizada em alginato de cálcio, que permitiu que ocorresse degradação anaeróbia nos centros dos pellets. Durante a degradação foram produzidos os metabólitos 6-amino-naftaleno-2-sulfonato e 5-aminosalicilato, os quais foram também degradados nas zonas aeróbias dos pellets. Keck et al. (2002) isolaram uma espécie de *Sphingomonas* capaz de utilizar mediadores oxi-redutores gerados durante o metabolismo aeróbio de 2-naftalenosulfonato para aumentar em 20 vezes a habilidade para degradar o corante sulfonado Amaranth.

Dangmann et al. (1996) encontraram degradação do corante 4-aminobenzenosulfonato por uma associação simbiótica entre duas bactérias *Hydrogenophaga palleronii*, que degradou o composto até catecol-4 sulfonato, e *Agrobacterium radiobacter* que foi capaz de degradar o metabólito formado. Blumel et al. (1998) submeteu este consórcio à contínua adaptação ao composto azo 4-carboxi-4-sulfoazobenzeno e obteve uma linhagem derivada de *Hydrogenophaga palleronii* capaz de degradar completamente esta substância como única fonte de carbono.

Foi isolado por Coughlin; Kinkle e Bishop (2002) um consórcio composto por duas bactérias aeróbias que foram hábeis para mineralizar acima de 90% do corante Acid Orange 7, com a formação temporária dos metabólitos ácido sulfanílico e 1-amino-2-naftol.

Nortemann et al. (1986) isolaram um consórcio microbiano contendo duas espécies de *Pseudomonas* sp. após prolongado período de cultivo, as quais degradaram o ácido 2-sulfônico-6-aminonaftaleno com a produção de 5-aminosalicilato como metabólito intermediário.

Segundo Banat et al. (1997), um consórcio de microrganismos termofílicos, contendo como principal componente uma bactéria do gênero *Corynebacterium*, foi hábil para descolorir em condições facultativas os corantes azos, diazos, reativos e dispersos a temperatura de 50°C com descoloração variando de 70 a 99%.

Chang; Chou e Chen (2001) estudaram a degradação do corante Reactive Red 22 por células de *Pseudomonas luteola* livres ou imobilizadas em alginato de sódio, k-carrageenan e poliacrilamida e encontraram completa degradação em todos os tratamentos, embora células livres mostraram degradação mais rápida. As células imobilizadas foram mais estáveis a mudanças de pH e oxigênio e puderam ser reutilizadas novamente com eficiência semelhante.

A degradação do corante azo Acid Red 151 foi estudada em reator aeróbio preenchido com rocha vulcânica, o qual foi capaz de descolorir acima de 99% deste corante com mineralização de 73%. Além da degradação aeróbia, os autores sugerem a presença de

degradação anaeróbia no interior do material poroso (BUITRÓN; QUEZADA; MORENO, 2004).

Vários corantes azos foram degradados por um consórcio de bactérias composto principalmente pela bactéria *Aeromonas hydrophyla*, incluindo Acid Orange 7, Acid Red 106, Direct Orange 39, Direct Yellow 4, Direct Yellow 12, Reactive Black NR, Reactive Blue 160 e Reactive Red 198. A degradação foi correlacionada com a estrutura e complexidade dos corantes, particularmente a natureza e posição dos grupos substituintes no anel aromático e interação com a ligação azo (CHEN et al., 2003).

Ekici; Leupold e Parlar (2001), investigando a degradação de alguns metabólitos do grupo azo, encontraram que todos foram metabolizados em meio aeróbio a diferentes razões, que dependeram de sua estrutura química. Em meio anaeróbio, apesar de alguns compostos terem sido degradados, houve a formação de aminas aromáticas como resultado da degradação. No entanto, Razo-Flores et al. (1997) encontraram completa degradação do corante azo-dissalicilato em meio anaeróbio. Este foi completamente degradado para metano e amônia, com a formação temporária de ácido 5-aminosalicílico e acetato. Segundo estes autores, os corantes podem ser degradáveis anaeróbiamente e, embora possa haver formação de aminas como metabólitos, estas poderiam ser degradadas anaeróbiamente.

Foi encontrada degradação de 99% do corante azo Direct Fast Scarlet 4BS por um consórcio composto principalmente pela bactéria *Pseudomonas* em condições anaeróbias facultativas. A imobilização em gel PVA acelerou a degradação (HE; HU; LI, 2004).

Nigam et al. (1996) observaram completa degradação de sete corantes dos grupos azo, diazo e reativos por um consórcio de bactérias anaeróbias composto por *Alcaligenes faecalis* e *Commamonas acidovorans*. Este consórcio não foi capaz de degradar eficientemente um corante do grupo ftalocianina e outro do grupo disperso.

Nyman et al. (1997) verificaram dehalogenação de 3,3-Diclorobenzidina, um intermediário da produção de corantes, em meio anaeróbio com a formação de benzidina, que é mais tóxica que a molécula parental e carcinogênica.

Van der Zee; Lettinga e Field (2001) obtiveram degradação de 20 corantes do grupo azo em meio anaeróbio com remoção completa da cor. Houve formação de metabólitos, provavelmente aminas, indicando a necessidade de um tratamento aeróbio secundário para estes compostos.

Khehra et al. (2005) encontraram degradação de vários corantes do grupo azo com porcentagens variando de 78 a 100% por um consórcio de bactérias anaeróbias composto por *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescence* e *Bacillus cereus*.

Manu e Chaudhari (2003) estudaram a degradação do corante índigo em bioreator anaeróbio na concentração de 100 mg l⁻¹, na presença de dextrose, e obtiveram descoloração acima de 95%. Também os corantes Reactive Blue H3R e Reactive Red HE7B foram degradados 98% e 96%, respectivamente.

Vários autores têm encontrado degradação completa de corantes em sistema anaeróbio-aeróbio, onde as aminas formadas no primeiro estágio pela quebra da ligação azo são completamente degradadas na fase aeróbia, com a hidroxilação e quebra do anel benzênico (MEYER, 1978). Brown e Hamburger (1987) estudando a degradação de 16 corantes azos observaram que estes foram degradados em condições anaeróbias com a formação de aminas como metabólitos, os quais foram degradados após reaeração do meio.

Haug et al. (1991) testaram um consórcio isolado por Nortemann et al. (1986) na degradação de corantes azos sulfonados em condições anaeróbias e aeróbias, sendo que na fase anaeróbia encontraram a formação de 2-sulfonato-6-aminonaftaleno e 5-aminosalicilato. Os autores observaram que quando os frascos foram reaerados estes produtos foram completamente degradados na presença de glicose. A glicose neste caso poderia fornecer redutores como NADH e FADH₂ para a degradação.

Zissi; Lyberatus e Pavlou (1997) observaram degradação de até 90% de uma amina, p-aminoazobenzeno, em meio aeróbio, na presença de glicose (6 g l⁻¹), pela bactéria *Bacillus subtilis*. Foram encontrados os metabólitos anilina e p- fenilenediamina como sub-produtos, os quais não foram degradados posteriormente.

A degradação dos corantes sulfonados Orange G, Amido Black 10 B, Direct Red 4BS e Congo Red foi estudada em bioreatores compostos de fase anaeróbia sucedida por fase aeróbia onde foram observadas quebras das moléculas na fase anaeróbia com a produção de aminas, as quais foram totalmente degradadas na fase aeróbia (RAJAGURU et al., 2000).

O'Neill et al. (2000) estudando a degradação em sistema anaeróbio-aeróbio encontraram remoção da cor de um efluente com porcentagens de 63,9% na fase anaeróbia contra 11,1% na fase aeróbia. Análises em HPLC indicaram a formação de metabólitos na fase anaeróbia que

foram consumidos posteriormente na fase aeróbia. Testes de toxicidade indicaram a presença de compostos tóxicos após a degradação anaeróbia, porém esta toxicidade foi removida após o tratamento aeróbio.

A degradação do corante Acid Orange 7 foi obtida em meio anaeróbio com 90% de remoção da cor, porém com a formação de duas aminas como metabólitos, o ácido sulfanílico e o 1-amino-2-naftol. Durante o tratamento aeróbio posterior somente o ácido sulfanílico foi degradado (BRÁS et al.; 2002).

Libra et al. (2004) encontraram 65% de degradação do corante Reactive Black 5 (díazotizado e sulfonado) em sistema anaeróbio-aeróbio com formação de dois metabólitos na fase anaeróbia, *p*-ABHES e TAHNDS. Somente *p*-ABHES foi mineralizado na fase aeróbia e a toxicidade aumentou após o tratamento anaeróbio sendo parcialmente reduzida com o tratamento aeróbio.

Supaka et al. (2004) estudaram a degradação dos corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Remazol Black B e Remazol Brilliant Violet em sistema anaeróbio-aeróbio e verificaram porcentagens de degradação de 100; 78,2 e 100%, respectivamente, com formação de aminas na fase anaeróbia que foram totalmente consumidas na fase aeróbia.

Sponza e Isik (2005) observaram degradação completa do corante azo Direct Red 28 em sistema anaeróbio-aeróbio com formação do metabólito benzidina, o qual foi consumido significativamente após tratamento aeróbio. A toxicidade foi reduzida no final. Também a degradação do corante Direct Black 38 em sistema anaeróbio-aeróbio produziu benzidina como metabólito, a qual foi parcialmente degradada resultando em redução na toxicidade ao final do tratamento (ISIK; SPONZA, 2004).

2.2.1.6 Degradação de corantes por Cianobactérias

Cianobactérias são organismos procariotos, unicelulares, fotoautotróficos e em alguns casos fixadores de nitrogênio atmosférico. Sua possível utilização na degradação de compostos xenobióticos vem sendo estudada, principalmente na descontaminação de águas. Por ser um organismo fotossintético não necessita de adição de fonte de carbono, sendo uma cultura de fácil manutenção. Além disso, nas Estações de Tratamento de Esgotos já tem sido utilizada no tratamento terciário para remover nitrogênio e fósforo e poderia ser usada para remover poluentes e metais (HIROOKA et al., 2003).

Vários trabalhos têm relatado a habilidade das cianobactérias em remover metais pesados do meio, dentre eles cádmio (MATSUNAGA et al., 1999; MOHAMED, 2001), manganês (MOHAMED, 2001), cromo (KHATTAR; SARMA; SINGH, 1999) e níquel (ASTHANA; CHATTERJEE; SINGH, 1995). Outras substâncias foram encontradas serem degradadas por cianobactérias, tais como fenantrene (NARRO et al., 1992a), naftaleno (NARRO et al., 1992b) e o herbicida lindane (KURITZ; WOLK, 1995).

Jinqi e Houtian (1992) estudaram a degradação de 30 corantes do grupo azo pelas algas verdes *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris* e pela cianobactéria *Oscillatoria tenuis* e encontraram porcentagens de descoloração variando de 7 a 100% para *Chlorella vulgaris*, sendo que 14 dos corantes testados tiveram degradação acima de 50%. A descoloração foi correlacionada com a estrutura química do composto, sendo que grupos amina ou hidroxila neutralizam a ação inibitória dos grupos sulfonados e apresentaram maiores taxas de degradação, enquanto a presença de grupos metil, metoxi, nitro ou sulfonados inibiram a degradação.

Kalavathi; Uma e Subramanian (2001) verificaram descoloração de 64 a 75% do pigmento melanoidina presente em resíduos de destilarias pela cianobactéria *Oscillatoria boryana*, entretanto em altas concentrações do pigmento houve inibição do crescimento das cianobactérias pela interferência na penetração da luz.

Shah; Garg e Madamwar (2001) observaram descoloração acima de 90% para os corantes Acid Red, Acid Red 119 e Direct Black 155 pela cianobactéria *Phormidium valderianum*. A eficiência aumentou com pH acima de 11, indicando que esta cianobactéria pode ser utilizada em efluentes de características alcalinas como os têxteis.

Degradação de 90% do corante Tectilon Yellow 2G foi encontrada pela alga *Chlorella vulgaris*, principalmente com a aclimação da cultura. Durante a degradação, houve formação de anilina como metabólito intermediário, porém esta também foi degradada completamente (ACUNER; DILEK, 2004).

2.2.1.7 Degradação de corantes por fungos basidiomicetos

Os fungos basidiomicetos ou fungos da podridão branca são capazes de degradar lignina, celulose e hemicelulose, que são moléculas complexas e, assim, suas enzimas têm sido utilizadas na degradação de outras moléculas recalcitrantes. Tanto as moléculas de lignina como alguns poluentes contêm compostos fenólicos, diésteres e bifenilas. Os principais fungos envolvidos são

Phanerochaete chrysosporium, *Coriolus versicolor*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* e outros.

As enzimas responsáveis pela degradação dos corantes têxteis são peroxidases e lacases. Estas enzimas são extracelulares e apresentam baixa especificidade para o substrato tornando estes organismos bastante interessantes para o tratamento de resíduos de características variadas como os resíduos têxteis. As principais enzimas envolvidas são lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases.

Estes fungos dividem-se em cinco grupos baseados em sua atividade em produzir as três enzimas lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase. O gênero *Pleurotus* não produz lignina peroxidase (RODRÍGUEZ; PICKARD; VAZQUEZ-DUHALT, 1999) enquanto *Phanerochaete chrysosporium* é caracterizado por produzir insignificante quantidade de lacase.

Lacase é uma enzima que pertence à família das multicobre-oxidases e oxida principalmente compostos fenólicos. LiP é uma heme-proteína com alto potencial de oxidação para substratos fenólicos e não fenólicos. MnP pode oxidar uma grande faixa de substratos através da oxidação de Mn^{2+} para Mn^{3+} , ligando-se a substâncias quelantes excretadas também pelo fungo (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2004).

Segundo Durán e Esposito (1997), a degradação por fungos basidiomicetos ocorre principalmente a pHs baixos que correspondem ao pH ótimo para a atividade das enzimas atuando na degradação, porém pode haver variação entre as espécies. Foi encontrado que a enzima lignina peroxidase de *Pleurotus chrysosporium* teve atividade ótima a pH 3,0 e manganês peroxidase a pH 4,5. Para a lacase de *Pleurotus noxius* o pH foi 4,6.

Alguns compostos têm capacidade para induzir o sistema ligninolítico, dentre elas o álcool veratril e o silício. O álcool veratril é um metabólito produzido por diversos fungos basidiomicetos que atua como restaurador da enzima lignina peroxidase após sua ação oxidativa sobre o substrato, protegendo-a da inativação por excesso de H_2O_2 . Segundo Heinfling et al. (1998), a atividade da LiP na ausência do álcool veratril foi de 1 a 12% menor que na presença do indutor. Também a adição do surfactante Tween 80 elevou a degradação de uma mistura de corantes azo e antraquinona de 31% para 85% por *Phanerochaete sordida* (HARAZONO; NAKAMURA, 2005).

A contribuição relativa de cada enzima (LiP, MnP ou lacase) para a descoloração de corantes pode ser diferente para cada fungo indicando alguma seletividade na degradação. Dey;

Maiti e Bhattacharyya (1994) estudaram a degradação dos corantes Metileno Blue e Congo Red pelos fungos basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium* e *Polyporus ostreiformes*, e encontraram degradação principalmente por *P. ostreiformes* com aumento na produção das enzimas MnP e LiP, as quais seriam responsáveis pela degradação destes corantes. Ollikka et al. (1993) encontraram que a enzima lignina peroxidase foi a maior responsável pela degradação de diversos corantes estudados, enquanto a enzima manganês peroxidase sozinha não foi capaz de promover a degradação. A presença de álcool veratril foi essencial para a degradação e a descoloração variou de 46 a 93%.

Bumpus e Block (1988) encontraram descoloração completa do corante cristal violeta e outros 6 corantes por *Phanerochaete chrysosporium*. A enzima lignina peroxidase foi purificada e apresentou descoloração similar às culturas para cristal violeta. Adição de H₂O₂ foi necessária para a degradação. A degradação ocorreu via N-dealquilação com remoções sucessivas de grupos metil.

Vários autores encontraram degradação na presença de lacase. Chivukula e Renganathan (1995) utilizaram a enzima lacase purificada para a degradação de corantes do grupo azo e verificaram que esta enzima pode promover a destoxificação destes resíduos, pois promove a liberação do nitrogênio da ligação azo como nitrogênio molecular.

Rodríguez; Pickard e Vazquez-Duhalt (1999) observaram que *Pleurotus ostreatus* foi hábil para degradar 12 de 23 corantes estudados, os quais pertenciam a diversas classes de corantes, dentre elas os reativos, dispersos, vat, de enxofre e ácidos. Porém, o extrato enzimático extracelular deste fungo degradou apenas cinco corantes (grupos ácido e reativo) indicando que há outros sistemas enzimáticos envolvidos na degradação. *P. Chrysosporium* foi capaz de degradar apenas cinco corantes (grupos: ácido, disperso, enxofre e vat). Extrato de *Trametes hispidus* degradou 11 dos 23 corantes (grupos: ácido, disperso e reativos). A principal enzima envolvida na degradação foi a lacase. Os autores consideram que diferenças estruturais nas isoenzimas causaram a diferença entre a degradação por lacase de *P. ostreatus* e *T. hispidus*.

Swamy e Ramsay (1999) estudaram a degradação do corante azo Amaranth por *Trametes versicolor* e encontraram descoloração completa após 48 h. Extratos dos meios contendo lacase e manganês peroxidase não foram capazes de promover a degradação.

Wong e Yu (1999) encontraram degradação de corante do grupo antraquinona por lacase, mas não de corantes dos grupos azo e índigo. Porém, a adição de um substrato para lacase ABTS

[2,2'-azino-bis (3-etiltiazolina-6-sulfonato)], o qual funciona como um mediador na degradação, aumentou a degradação destes corantes.

Peralta-Zamora et al. (2003) utilizaram as enzimas lacase e peroxidase imobilizadas em sílica quimicamente modificada com grupos imidazol e fosfato de zinco para descoloração dos corantes RBBR (Remazol Brilliant Blue R) e Remazol Black B, encontrando elevada adsorção ao material de suporte, porém quando associaram o tratamento enzimático com um tratamento fotoquímico prévio obtiveram descoloração acima de 90% para ambos os corantes.

Nyanhongo et al. (2002) estudaram a degradação de oito corantes (antraquinonas, azo, índigo e triarilmetano) por lacases extraídas de quatro fungos, *Trametes modesta*, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor* e *Sclerotium rolfsii*. As lacases destas linhagens diferiram na eficiência da degradação. Isto é causado por diferenças existentes entre as isoenzimas produzidas por cada linhagem, não ocorrendo tendência na degradação para determinada classe, e sim influência da estrutura para cada corante individual. A degradação foi favorecida em pH ácido e variou com o corante estudado, mostrando influência do pH na estabilidade das moléculas. Aumentos na temperatura também favoreceram a degradação.

Vários mecanismos de degradação enzimática têm sido propostos. Segundo Kandelbauer e Gubitz (2001) a lacase promove a desestabilização das moléculas através da retirada sequencial de dois elétrons permitindo a hidrólise da molécula. Para Kunz e Peralta-Zamora (2002) a lacase promove demetilação da molécula e posterior rompimento de anéis aromáticos e ligações entre carbonos em estruturas fenólicas. Para Rodríguez; Pickard e Vazquez-Duhalt (1999) corantes azo são degradados por peroxidases e lacases através da oxidação do grupo fenólico produzindo um radical no carbono ligado a ligação azo. A seguir, a água atacaria o carbono fenólico clivando a molécula e produzindo fenildiazeno, que posteriormente é degradado gerando N₂.

Dominguez et al. (2001) observaram principalmente produção de manganês peroxidase em reator semi-sólido por *Phanerochaete chrysosporium*, o qual produziu 1350 U l⁻¹ de enzima. Este extrato resultou na degradação de 19% do corante Poly R-478 após 15 minutos de incubação.

Kamida et al. (2001) verificaram descoloração completa de efluente contendo o corante índigo por *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus flabellatus* e *Pleurotus sajor-caju* após 10 dias de incubação. A descoloração foi acompanhada de aumentos na atividade das enzimas lacase e manganês peroxidase.

Moldes et al. (2003) estudaram a degradação dos corantes Poly R-478 e cristal violeta por enzimas extracelulares produzidas pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, principalmente manganês peroxidase (MnP) e encontraram degradação de 22 a 24% de Poly R-478, porém não observaram degradação significativa do corante cristal violeta. Rodríguez-Couto et al. (2000) encontraram que a presença da enzima manganês peroxidase foi essencial para a degradação do corante Poly R-478 por *Phanerochaete chrysosporium*.

Levin; Papinutti e Forchiassin (2004) observaram que a incorporação de condições favoráveis e suplementos ao meio aumentou a produção da enzima MnP e glioxal oxidase em 100 vezes e de lacase em 500 vezes, o que resultou em aumento na degradação dos corantes Ponceau 2R, Malachite Green e Anthraquinone Blue por *Trametes trogii*. O meio contendo glicose (20 g l⁻¹), asparagina (4 g l⁻¹), Cu (667 µM), Mn (0,5 µM) e álcool veratril (2 mM) em pH 6,5 resultou na maior taxa de degradação.

Vários autores têm sugerido que condições limitadas de nutrientes, principalmente nitrogênio, estimulam a atividade ligninolítica de fungos ligninolíticos (CRIPPS; BUMPUS; AUST, 1990; SPADARO; GOLD; RENGANATHAN, 1992). Glenn e Gold (1983) encontraram degradação dos corantes Poly B, Poly R e Poly Y por *Phanerochaete chrysosporium* em meio contendo baixos teores de nitrogênio. A exposição em atmosfera de oxigênio puro aumentou a degradação com relação à atmosfera de ar atmosférico e a exposição prévia das culturas ao oxigênio induziu a atividade ligninolíticas mesmo quando as culturas foram transferidas para atmosfera de ar durante a degradação.

Platt; Hadar e Chet (1985) encontraram degradação do corante Poly B por *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus* em meio sólido e líquido. O teor de nitrogênio no meio influenciou a degradação para *Phanerochaete chrysosporium*, mas não para *Pleurotus ostreatus*. Extratos produzidos na presença de celulose não induziram a degradação, enquanto extrato produzido por cultivo de *P. ostreatus* em palha de algodão resultou em aumento na degradação. O pH ótimo foi 5,5 e atividade foi destruída após aquecimento a 60°C por 60 min. Após 21 dias de crescimento o extrato apresentou capacidade para degradação embora a atividade de lacase tenha sido detectada somente até 12 dias de crescimento.

Spadaro; Gold e Renganathan (1992) avaliaram a degradação de vários corantes azo por *Phanerochaete chrysosporium* e encontraram taxas de mineralização variando entre 23 a 48% em

condições limitadas de nitrogênio. A degradação foi correlacionada com a presença dos grupos hidroxila, amino, acetamida ou nitro substituintes no anel aromático destes compostos.

Paszczynski et al. (1992) estudaram a degradação de corantes azos sulfonados por linhagens de *Phanerochaete chrysosporium* e *Streptomyces chromofuscus* e encontraram níveis de degradação variando de 17 a 34% por *Phanerochaete chrysosporium* e valores abaixo de 3,6% para *Streptomyces chromofuscus*.

Rápida descoloração dos corantes Orange II, Tropaeolin O, Congo Red e Azure B foi obtida por *Phanerochaete chrysosporium* em meio de cultura sem a presença de nitrogênio, porém em meio contendo nitrogênio a descoloração foi mais lenta e houve maior adsorção do corante ao fungo (CRIPPS; BUMPUS; AUST, 1990). A presença de nitrogênio também inibiu a atividade da enzima lignina peroxidase.

Knapp; Newby e Reece (1995) avaliaram a degradação de 14 corantes estruturalmente diferentes por 7 linhagens de fungos basidiomicetos, dentre elas *Phanerochaete chrysosporium*, *Piptoporus betulinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor* 556, e observaram que todos os corantes foram degradados por ao menos um isolado, sendo que oito corantes foram eficientemente degradados por quatro ou mais linhagens. Os corantes Índigo Carmim, Cibacron, Brilliant Red, Brilliant Green e Cristal Violeta foram degradados com porcentagens acima de 99%. Houve especificidade de algumas linhagens para alguns compostos e a degradação foi correlacionada com a estrutura química da molécula. Pequenas modificações na estrutura inibiram a degradação, sendo que Brilliant Yellow que tem estrutura semelhante ao corante Crisofenina foi degradado em muito maior extensão.

Kirby; McMullan e Marchant (1995) observaram degradação de seis de nove corantes testados na presença de glicose por *Phanerochaete chrysosporium*, enquanto três deles foram degradados como fonte de carbono. Alguns corantes estruturalmente semelhantes não foram degradados mostrando a especificidade para com a molécula.

Vyas e Molitoris (1995) estudaram a degradação do corante RBBR por um extrato enzimático produzido na presença de palha de trigo por *Pleurotus ostreatus*. Encontraram produção de uma enzima oxigenase que pareceu ser a principal degradadora do corante, pois na ausência de oxigênio não houve degradação.

Raghukumar et al. (1999) isolaram o fungo basidiomiceto *Flavodon flavus* de ambiente marinho e observaram degradação completa dos corantes Azure B, Congo Red, Poly B e RBBR em meio de cultura contendo água do mar (50:50 v/v).

Kapdan et al. (2000) avaliaram o efeito de várias fontes de carbono, de nitrogênio e concentração inicial sobre a degradação do corante Everzol Turquoise Blue G. A adição de fonte de carbono aumentou a degradação, sendo que a glicose foi mais eficiente que frutose e amido. A melhor fonte de nitrogênio foi a uréia, embora sulfato de amônio, cloreto de amônio e tartarato também apresentaram boas taxas de degradação. Completa descoloração foi obtida com concentrações do corante menores que 500 mg l⁻¹, enquanto concentrações maiores tiveram eficiência reduzida. Concentrações maiores que 1200 mg l⁻¹ tiveram efeito tóxico sobre o fungo.

Monteiro et al. (2001) avaliaram quatorze espécies de *Pleurotus* spp. na degradação de efluente e lodo têxtil contendo os corantes índigo e preto-enzofre, e encontraram completa descoloração por duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju*.

Os fungos basidiomicetos *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju* e *Pycnoporus sanguineus* foram testados na degradação do corante índigo em meio líquido. Após quatro dias verificou-se remoção da cor de 100% para *Phellinus gilvus*, 94% para *Pleurotus sajor-caju* e 91% para *Pycnoporus sanguineus*, e redução na toxicidade para *Daphnia similis* de 41%, 96% e 93%, respectivamente (BALAN; MONTEIRO, 2001).

P. chrysosporium degradou totalmente os corantes Direct Brown 2, Direct Green 6 e Direct Blue 15 e quase totalmente Direct Red 23 e Direct Orange 26, sendo que a enzima manganês peroxidase foi a principal enzima produzida (PAZARLIOGLU; UREK; ERGUN, 2005).

Martins et al. (2003) estudaram a degradação de oito corantes possuindo grupos carboxílicos ou sulfônicos por quatro fungos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* e *Aureobasidium pullulans*) e verificaram que os maiores valores de degradação foram produzidos por *T. versicolor*, entre 76 e 100%, seguido pelo fungo *P. ostreatus*. A degradação foi correlacionada com a presença de lacase no meio de cultura. A análise dos metabólitos em GC-MS permitiu identificar os passos da degradação. Após a clivagem da ligação azo, houve a hidroxilação dos produtos e posterior formação de derivados de catecol, os quais são susceptíveis à clivagem do anel benzênico.

O mecanismo de degradação de corantes ftalocianina-Cu por *Phanerochaete chrysosporium* foi proposto por Conneely; Smyth e McMullan (2003). Primeiramente o átomo de Cu é removido e em seguida a estrutura ftalocianina é quebrada. O mesmo mecanismo foi encontrado por Heinfling-Weidtmann et al. (2001) na degradação de Reative Blue 15 e Reactive Blue 38 por *Bjerkandera adusta*.

2.2.1.8 Fitorremediação através do uso de materiais de plantas

A aplicação de enzimas para a degradação de alguns compostos recalcitrantes tem mostrado alta eficiência, porém o isolamento e purificação destas enzimas e a necessidade de cofatores como NAD(H), NADP(H) ou FAD(H) encarecem seu uso tornando-a inviável (GIANFREDA; BOLLAG, 1994). Porém, materiais vegetais contendo alta atividade enzimática podem ser aplicados diretamente no campo com a mesma eficiência que a enzima purificada (DEC; BOLLAG, 1994). A enzima peroxidase de raiz-forte (HRP) necessita apenas da adição de H_2O_2 .

O uso de enzimas tem grande vantagem sobre microrganismos, os quais necessitam de produção de inóculo e são inibidos por fatores desfavoráveis do meio, tais como: toxicidade dos corantes, predadores, pouca mobilidade dos microrganismos, necessidade de outras fontes de carbono e competição com microbiota nativa.

Peroxidases são enzimas que catalizam reações envolvendo a transferência de hidrogênio de moléculas orgânicas para peróxidos formando água. A sua ação enzimática provém da redução cíclica do átomo de ferro no grupo hematina. Na presença de H_2O_2 , a enzima se combina com a molécula de H_2O_2 , formando um complexo que pode oxidar uma variedade de doadores de elétrons formando água no final (MESULAM, 1982). Por causa da baixa especificidade do complexo enzimático peroxidase- H_2O_2 , este pode promover a oxidação de uma grande variedade de poluentes orgânicos.

Tong et al. (1997) encontrou que o pH onde houve a máxima atividade da enzima peroxidase raiz-forte foi na faixa de 5 a 9, sendo o pH ótimo próximo de 7.

Dec e Bollag (1994) testaram tubérculos de batatas, raiz-forte, raiz-branca e a enzima peroxidase de raiz-forte purificada na degradação de um efluente contendo clorofenóis, principalmente 2,4-diclorofenol. A enzima peroxidase da Raiz-forte promoveu 95% de remoção do 2,4-DCP. A remoção de 2,4-DCP pelos materiais de plantas na presença de H_2O_2 apresentou

eficiência comparável à enzima peroxidase purificada, enquanto sem H_2O_2 houve elevada adsorção ao material da planta. As máximas remoções foram 96% para batata, 99% para raiz branca e 100% para raiz-forte. A remoção aumentou gradualmente com o decréscimo no tamanho dos pedaços de tubérculos e estes materiais mantiveram sua atividade quando reutilizados mais de uma vez.

Gianfreda e Bollag (1994) encontraram remoção quase completa de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) do meio de cultura com a adição de lacase e peroxidase de raiz-forte. A remoção foi dependente da quantidade de enzima adicionada e suporte utilizado para a enzima.

Tonegawa; Dec e Bollag (2003) também estudando a degradação de 2,4-DCP pela planta raiz-forte avaliou o efeito de aditivos como polietileno glicol (PEG) e surfactantes na degradação e encontrou aumento na remoção de 2,4-DCP de 28,5% para 54% para PEG e 61% para Triton X-100. Estes aditivos suprimem a adsorção da enzima com os produtos formados liberando-a para degradar novas moléculas.

O uso da planta raiz-forte na degradação de corantes azos foi estudado por Pasti-Grigsby et al. (1992), que verificaram degradação em 6 dos 22 corantes estudados com valores entre 3,91 a 30,68% de degradação.

A reação enzimática promovida por estas enzimas foi rápida, segundo Bhunia; Durani e Wanikar (2001), que encontraram que a maior parte da degradação de Remazol Blue ocorreu dentro de 3 h.

Stiborová; Asfaw e Anzenbacher (1988) encontraram degradação do corante Sudan I (1-fenilazo-2-hidroxinaftaleno) por peroxidase de raiz-forte produzindo quinona e o metabólito benzenodiazonium, o qual é carcinogênico e foi encontrado ligar-se ao DNA.

Spadaro e Renganathan (1994) encontraram descoloração do corante disperso Yellow 3 por peroxidase de raiz-forte. Análises por HPLC indicaram a presença dos metabólitos 4-metil-1,2-benzoquinona, acetanilida e um dímero de Yellow 3.

Ferreira-Leitão; Silva e Bon (2003) estudaram a degradação do corante Metileno Blue (MB) por HRP e LiP e observaram que quando a relação corante/ H_2O_2 foi de 1:1, permaneceram cerca de 45,3 e 16,9% do corante em solução para HRP e LiP, respectivamente. Porém, quando a razão foi aumentada para 1:10, a degradação aumentou significativamente e apenas 4,7% do MB permaneceu em solução para HRP, enquanto na presença da LiP a degradação foi completa.

Extração e imobilização das enzimas em gel acrilamida mostrou aumentos na eficiência da degradação, sendo que 79% do corante Acid Black foi degradado com a enzima imobilizada e apenas 67% com a enzima livre. A enzima imobilizada permitiu o reuso e a eficiência na segunda aplicação foi 10% menor e as subseqüentes foram 26, 39 e 50% inferiores (MOHAN et al., 2005).

Segundo Tonegawa; Dec e Bollag (2003) a enzima peroxidase possui capacidade para degradar aminas tóxicas, que são conhecidos metabólitos da degradação de corantes azo, para radicais livres ou quinonas que são sujeitos a polimerização e precipitação em soluções aquosas.

Raiz-forte também é capaz de remover fenóis na presença de H_2O_2 , numa reação chamada de “oxidação pareada”, onde a enzima oxida substâncias fenólicas formando radicais fenólicos, os quais reagem com fenol formando substâncias insolúveis que podem ser removidas por filtração ou floculação (TONG et al., 1997). Eles encontraram remoção de 80 % de 4-clorofenol e de 99% de fenol na presença de floculante.

Existem várias patentes da utilização de peroxidases de raiz-forte para biorremediação e podem ser vistos no site <http://www.uspto.gov/patft>.

2.2.1.9 Toxicidade

A toxicologia envolve o estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos adversos de substâncias químicas ou outros materiais antropogênicos sobre os organismos expostos. Os testes de toxicidade consistem em se expor organismos representativos durante um período determinado a várias concentrações de uma ou mais substâncias e avaliar os efeitos causados. Os efeitos tóxicos vão desde a mortalidade até efeitos chamados sub-letais, tais como mudanças no crescimento, no desenvolvimento, na reprodução, no comportamento etc (ABRAHÃO; SILVA, 2002).

Os efeitos deletérios podem ser de dois tipos, agudo ou crônico. O efeito agudo é definido como uma resposta severa e rápida a um estímulo, a qual se manifesta num intervalo curto variando de 0 a 96 h. Para se avaliar efeitos agudos utiliza-se em geral o parâmetro LC_{50} , que é a concentração do agente tóxico que causa letalidade ou outro efeito em 50% dos organismos em teste.

O efeito crônico é normalmente resultado de exposições repetidas ou de longa duração, geralmente com baixas concentrações de exposição. Normalmente determina-se o NOEC, que é a

maior concentração sem efeito tóxico sobre o organismo e o LOEC, que é a mais baixa concentração com efeitos adversos sobre os organismos.

Vários contaminantes têm sido adicionados acidentalmente ou deliberadamente à água, alimentos e ar resultando numa poluição química de baixas concentrações, porém generalizada. A questão é se a presença destes poluentes, embora a baixas concentrações, afeta a saúde das pessoas e outros organismos vivos. Os efeitos são sutis e difíceis de serem detectados, porém estima-se que 80-90% do câncer humano pode ter causa ambiental (BAIRD, 2002).

Via de regra, são recomendados testes com três tipos de organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente, sendo eles produtores primários, representados por algas ou plantas superiores, consumidores primários, tais como microcrustáceos, e consumidores secundários, representados por peixes.

O efeito tóxico dos corantes tem sido estudado e em geral, os corantes não apresentaram toxicidade aguda na maioria dos testes. Os grupos mais tóxicos foram os básicos e diazo diretos. De 4461 corantes testados, somente 44 (~1%) tiveram LD_{50} menor que 250 mg kg^{-1} , enquanto 314 (~7%) tiveram LD_{50} entre 250 e 2000 mg kg^{-1} e 434 (~9,7%) tiveram LD_{50} entre 2000 e 5000 mg kg^{-1} . Cerca de 3669 tiveram LD_{50} maiores que 5000 mg kg^{-1} . Porém, não se sabe o efeito destas substâncias a longo prazo e estudos indicam que muitas são carcinogênicas ou mutagênicas (BUMPUS, 1995).

Os corantes à base de benzidina e aminas podem liberar estas substâncias como metabólitos, as quais são cancerígenas. Segundo Gottlieb et al. (2003), a quebra da ligação azo em meio anaeróbico do corante Acid Orange 7 gerou compostos causadores de genotoxicidade, a qual foi relacionada com a produção do metabólito 1-amino-2-naftol.

Estes corantes também podem ser reduzidos por microrganismos anaeróbios presentes no trato digestivo, sugerindo que estes corantes podem ser potenciais causadores de câncer e outras desordens. Segundo Méndez-Paz; Omil e Lema (2005), o metabólito 1-amino-2 naftol, produzido pela redução do corante Acido Orange 7, induziu a formação de tumores no sangue e o corante Amaranth foi carcinogênico para ratos. Outros efeitos adversos causados pelos corantes incluem as alergias rinopáticas, asmáticas e cutâneas. O corante comporta-se como hapteno, reage com a albumina do sangue e então, por ação como um antígeno gera IgEs, desencadeando os fenômenos alérgicos (SALEM, 1995).

Corantes contendo grupos amino, aquilamino ou acetilamino são propensos a sofrer oxidação, através da hidroxilação das moléculas com formação de grupos nitrenium (NH^+), o qual pode apresentar potencialidade mutagênica ou carcinogênica devido a interações com grupos nucleofílicos do DNA (GUARATINI; ZANONI, 2000). Outros corantes portadores de grupos reativos e grupos cromóforos diazo sulfonados são configurados para reagirem fortemente com substâncias portadoras dos grupos amina e hidroxila, presentes em todos os organismos vivos na forma de proteínas, enzimas, dentre outras. A inativação destas substâncias normalmente é feita pela hidrólise de seus grupos funcionais, porém estudos têm mostrado que estes corantes podem permanecer estáveis por períodos superiores a 50 anos em ambientes aquáticos.

Rajaguru et al. (2000) encontraram que o corante Direct Red 2 induziu formação de micronúcleos em células da medula óssea de ratos, após 24 h de exposição, e concluíram que esta substância tem potencial cancerígeno. Ress et al. (2002) encontraram danos cromossômicos na presença de diazoaminobenzênio, um intermediário na síntese de corantes e presente como impureza na composição destes.

Villegas-Navarro et al. (2001) avaliaram a toxicidade do efluente de 5 indústrias têxteis para o organismo *Daphnia magna* e encontraram que alguns efluentes foram muito tóxicos. Os valores de ATU ($100/\text{LC}_{50}$) encontrados variaram de 2,2 a 960 ATU (unidades de toxicidade aguda).

Oros; Cserháti e Forgács (2003) encontraram inibição do crescimento de bactérias por vários corantes, sendo que os mais hidrofóbicos foram os mais tóxicos. Eles provavelmente se ligam a componentes também hidrofóbicos das células inibindo atividade enzimática e outras funções. Isto indica que os corantes podem ser tóxicos também à população microbiana presente nos tratamentos microbiológicos dificultando ainda mais o tratamento destes resíduos como sugere Brown (1981). Sponza e Isik (2005) também encontraram que o corante Direct Black 38 reduziu a atividade metanogênica pela metade a altas concentrações.

Também *P. chrysosporium* mostrou ser sensível ao corante Malachite Green a concentrações acima de $64 \mu\text{M}$. Em meio líquido o efeito tóxico foi maior e toxicidade foi observada na concentração de $4 \mu\text{M}$ (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2004).

Balan (2002) encontrou valores de LOEC de 6,25% para um efluente equalizado após 48 h de exposição sobre o organismo *Hydra attenuata*.

Abrahão e Silva (2002) encontraram redução na toxicidade de um efluente têxtil após tratamento por lodo ativado, onde a CL_{50} que era de 11,2% aumentou para 49,3% sobre o organismo *Daphnia similis*.

O efluente de uma indústria têxtil contendo corantes azos apresentou potencial altamente mutagênico pelo Teste de Ames com produção de $1,1$ a 3×10^5 rev I^{-1} (UMBUZEIRO et al., 2004), mostrando que estes corantes não estão sendo degradados pelo sistema de tratamento por lodo ativado realizado pela indústria. Análises realizadas no Ribeirão dos Cristais, onde estes efluentes são despejados, também apresentaram potencial mutagênico. Linhagens sensíveis à presença de aminas apresentaram número de revertentes 5-17 vezes maior. Além disso, outro problema observado por Umbuzeiro et al. (2004) foi a combinação destes compostos com o cloro em Estações de Tratamento de Água, formando compostos nitroaromáticos halogenados altamente mutagênicos.

2.2.2 Material e Métodos

2.2.2.1 Degradação do efluente, lodo e corantes técnicos

2.2.2.1.1 Efluente e Lodo Têxtil

As amostras de efluente e lodo foram coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto de Americana (ETE -DAE/Americana - SP), que é responsável pelo tratamento de efluentes oriundos de 43 indústrias têxteis diferentes, sendo que $\frac{3}{4}$ do efluente corresponde a resíduos têxteis e $\frac{1}{4}$ a esgoto da região. O efluente, coletado após o tratamento biológico, continha mistura de corantes pertencentes às classes das antraquinonas e indigóides.

2.2.2.1.2 Corantes

Foi estudada a degradação dos corantes técnicos índigo (Índigo BAN 30) em solução aquosa 30% e preto enxofre (Preto Enxofre - SODYESUL ECO IV) em solução aquosa 30%, cedidos pela indústria têxtil na forma em que esta os adquire. A concentração empregada, em ambos os casos, foi de 0,02% (p/v). O corante polimérico Remazol Brilliant Blue R – RBBR (C.I. 61200; Reactive Blue 19, Sigma R-8001) foi empregado na mesma concentração.

2.2.2.1.3 Organismos utilizados na degradação

Foram estudados os fungos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* e duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 (F2) e PSC 94/03 (F6). A planta raiz-forte (*Cochlearia armoracia*), cuja raiz contém alta teor de enzima peroxidase, foi testada na degradação do efluente e lodo, sendo utilizados a raiz moída, o bagaço resultante da extração industrial da enzima peroxidase e o extrato da planta (líquido) contendo a enzima, fornecidos pela indústria (Toyobo Ltda). Um tratamento anaeróbio combinado com aeróbio foi aplicado na degradação do efluente. Foram utilizados também outros organismos de reconhecida capacidade de resistência e degradação de compostos tóxicos como as cianobactérias *Anabaena flos-aquae*, *Phormidium autumnale* e *Synechococcus* sp PCC e a bactéria *Acinetobacter johnsonii*, isolada por Dellamatrice e Monteiro (2004).

2.2.2.1.4 Avaliação da degradação do efluente

A descoloração foi avaliada por espectrofotometria na região do visível em dois comprimentos de onda que correspondem à absorbância máxima (680 nm) e mínima (583 nm) determinados por varredura. Segundo Glenn e Gold (1983), se a razão Abs max/min permanece constante houve adsorção do corante ao micélio, enquanto se houve modificação na razão Abs max/min significa que o corante foi degradado pelas culturas.

2.2.2.2 Degradação pelos fungos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*

2.2.2.2.1 Manutenção das culturas

As culturas foram mantidas sobre grãos de trigo (50 g), previamente deixados em água por 24 h, acrescidos de carbonato de cálcio/sulfato de cálcio (1:4) a 1% e esterilizados. Para inoculação do efluente e lodo, o inóculo foi preparado em meio sólido malte-ágar (2% malte e 0,2% extrato de levedura) e incubado a 28°C durante oito dias. Foram retirados 3 e 5 discos de 9 mm de diâmetro para inoculação do efluente e lodo, respectivamente.

2.2.2.2.2 Degradação do efluente

Foram adicionados 3,5 g de bagaço de cana e 1,5 g de farelo de trigo em frascos Erlenmeyers de 125 ml (umidade de 70%), onde primeiramente os fungos foram crescidos. Após

12 dias de crescimento, 3 repetições de cada tratamento foram levados à estufa a 55°C para inativação dos fungos com a finalidade de verificar se a degradação foi devido somente a adsorção ao micélio. Em seguida, 30 ml de efluente não esterilizado foram aplicados sobre os fungos ativos e inativos e a degradação foi comparada. Os corantes técnicos índigo, preto-enxofre e RBBR foram preparados na concentração de 0,02% em H₂O destilada e 30 ml foram colocados em Erlenmeyers de 125 ml, onde os fungos foram inoculados e incubados durante 15 dias em BOD a 28°C.

2.2.2.2.3 Degradação por cianobactérias

Para preparo do inóculo foram utilizados 50 ml de meio AA (ALLEN; ARNON, 1955) para fixadoras de N₂ (*Anabaena flós-aquae*) ou BG-11 (ALLEN, 1968) para não-fixadoras de N₂ (*Phormidium autumnale* e *Synechococcus* sp.). Frascos Erlenmeyers de 125 ml contendo 50 ml de efluente foram inoculados com as culturas após 14 dias de crescimento. A degradação dos corantes técnicos Índigo, RBBR e preto-enxofre foi estudada na concentração de 0,02% em 50 ml de meio AA ou meio BG-11. Os frascos inoculados e controles foram incubados sob condição de luminosidade contínua ($4000 \pm 10\%$ lux) a 25°C. Também um controle escuro foi utilizado para verificar se houve efeito da fotodegradação.

2.2.2.2.4 Degradação pela planta Raiz Forte

Foram testados a planta moída no laboratório, planta moída na indústria, bagaço resultante da extração da enzima peroxidase e extrato líquido da planta fornecido pela indústria. Foram adicionados os tubérculos da raiz da planta na proporção de 10% (peso úmido) em 30 ml de efluente ou corantes índigo, RBBR e preto-enxofre (0,02%) em frascos Erlenmeyers de 125 ml. O peróxido de hidrogênio foi acrescentado na concentração de 20 mM, conforme Dec e Bollag (1995). Após período de incubação de 4 h, as amostras foram centrifugadas para leitura da absorbância e testes de toxicidade.

2.2.2.2.5 Degradação por *Acinetobacter johnsonii*

Frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 30 ml de efluente ou corantes técnicos na concentração de 0,02% foram inoculados com *A. johnsonii*, previamente cultivada por 48 h em

meio J.E. (JONES; EDINGTON, 1968). Os frascos foram incubados por 15 dias a 28°C em BOD e ao final do período de incubação a descoloração e a toxicidade foram avaliadas.

2.2.2.2.6 Degradação anaeróbia

Frascos tipo penicilina de 150 ml foram totalmente preenchidos com efluente, fechados com tampa de borracha e selados com fita de alumínio em atmosfera de CO₂. Após período de incubação de 20 dias sob anaerobiose, os frascos foram reabertos e 30 ml foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 125 ml, os quais foram incubados por mais 20 dias em condições aeróbias. Estes frascos foram reinoculados com microrganismos coletados do próprio efluente. Para preparo do inóculo, 100 ml do efluente foram centrifugados e o pellet ressuspendido em solução salina NaCl (0,89%). Os frascos foram incubados em BOD a 28°C.

2.2.2.3 Degradação do lodo

2.2.2.3.1 Degradação do lodo pela planta raiz forte

Material da planta macerado ou finamente picado foi misturado a 300 g de lodo em saquinhos de poliestireno, nas proporções de 10, 25 e 50%. A descoloração foi avaliada por refletância em aparelho espectrofotômetro (Minolta Chroma Meter Cr-200), o qual emite um feixe de luz sobre o material e em seguida captura a luz refletida, fornecendo três parâmetros representados pela letra “L” (cor variando de preto a branco), “a” (de verde a vermelho) e “b” (de azul a amarelo).

2.2.2.3.2 Degradação do lodo por *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*

O lodo residual misturado a bagaço de cana foi inoculado com três linhagens de *Pleurotus* (*P. ostreatus* e *P. sajor-caju* F2 e F6). O lodo foi colocado em vapor de água durante uma hora em autoclave aberta para diminuir o número de microrganismos presentes e então foi misturado ao bagaço de cana na proporção de 5:1 (peso). Foram colocados 300 g deste substrato em sacos plásticos de 2 l de capacidade, os quais foram inoculados com 30 g do inóculo (grãos de trigo) em 5 repetições. Após 30 dias de incubação, a descoloração foi avaliada por refletância em aparelho espectrofotômetro (Minolta Chroma Meter Cr-200) e foram realizadas análises: a) químicas, da concentração de C e N (realizados no Laboratório de Biogeoquímica do CENA/USP) e metais pesados (realizados no Laboratório de química analítica do CENA/USP); b) bioquímicas, das

enzimas ligninolíticas manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase e c) biológicas, com testes ecotoxicológicos. Para as análises ecotoxicológicas e bioquímicas, amostras de 100 g de cada tratamento foram extraídas utilizando 200 ml de água destilada em duas vezes, sob agitação, e posteriormente centrifugadas.

2.2.2.3.3 Degradação do lodo por cianobactérias

Foram utilizados frascos com 50 ml de meio AA (ALLEN; ARNON, 1955) para fixadoras de N₂ ou BG-11 (ALLEN, 1968) para não fixadoras, contendo lodo na concentração de 10%, os quais foram inoculados e incubados durante 15 dias (DIELS, 1997) sob iluminação contínua ($4000 \pm 10\%$ lux). As análises foram feitas conforme descrito no item 3.4.2.

2.2.2.4 Atividade enzimática

A atividade das enzimas ligninolíticas lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase dos fungos selecionados e da enzima peroxidase da planta raiz-forte foi avaliada, como descrito a seguir:

Lignina peroxidase: O meio de reação foi composto de 0,6 ml do meio de cultura, 0,2 ml de álcool veratrílico 2,0 nM em tampão tartarato de sódio a 0,4 M (pH 3,0) e 0,2 ml de H₂O₂ 2,0 mM, que é o iniciador da reação. Foram comparadas as leituras da absorbância a 310 nm no início da reação e após 10 min (TIEN; KIRK, 1984).

Manganês peroxidase: Para esta reação foram adicionados 0,5 ml do meio de cultura; 0,1 ml de lactato de sódio 0,25 M; 0,05 ml de MnSO₄; 0,2 ml de albumina bovina 0,5%; 0,05 ml de H₂O₂ em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 ml de vermelho de fenol 0,1%, que é o iniciador da reação. Após 10 min a reação foi interrompida pela adição de 0,04 ml de NaOH 2,0 N, sendo feitas leituras da absorbância a 610 nm no início e final da reação (KUWAHARA et al., 1984).

Lacase: a atividade da lacase foi determinada utilizando-se 0,6 ml de sobrenadante; 0,3 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0) e 0,1 ml de seringaldazina, que é o iniciador da reação. Foram feitas leituras em espectrofotômetro a 525 nm no início da reação e após 10 min (SZKLARZ et al., 1989).

Peroxidase: Pelo método da seringaldazine, a atividade foi determinada adicionando-se 0,2 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0) e 0,1 ml de H₂O₂ a 0,6 ml de sobrenadante. A reação

foi iniciada com a adição de 0,1 ml de seringadazine e as leituras feitas a 460 nm no início e após 10 min. Pelo método da o-dianisidina, 0,2 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0) e 0,1 ml de H₂O₂ foram adicionados a 0,6 ml de sobrenadante. Após a adição de 0,1 ml de o-dianisidina foram realizadas leituras a 460 nm imediata e novamente após 10 minutos.

2.2.2.5 Testes de toxicidade

A toxicidade do efluente foi avaliada utilizando como bioindicadores os organismos *Hydra attenuata*, a alga *Selenastrum capricornutum* e sementes de alface (*Lactuca sativa*).

2.2.2.5.1 Manutenção dos organismos

A cultura da *Hydra* foi mantida em frascos de vidro circulares (20 cm de diâmetro) com 2/3 preenchidos com meio para *Hydra* (TROTIER et al., 1997). Os frascos foram mantidos em temperatura ambiente (20-24°C) e as culturas foram alimentadas com camarões brine (*Artemia salina*) recém-eclodidos e desinfetados com iodo. Aproximadamente 2 h após o início da alimentação, o meio foi trocado para remoção das *Artemias* restantes e exoesqueletos regurgitados. Para o crescimento da alga *Selenastrum capricornutum* o meio utilizado foi AAM 30% contendo macro e micronutrientes (BLAISE; FORGET; TROTIER, 2000). A alga foi repicada semanalmente para meio novo em condições assépticas e a cultura foi mantida em condições de luminosidade contínua (4000 ± 100 lux). As sementes de alface foram conservadas em refrigerador a 4°C.

2.2.2.5.2 *Hydra attenuata*

As amostras de efluente e lodo foram preparadas adicionando 14,7 mg de CaCl₂.2H₂O e 11 mg de tampão TES para 100 ml de amostra, e ajustando o pH para 7,0 ± 0,1. As amostras foram filtradas a 0,22 µm para evitar crescimento microbiano e diluídas em meio para *Hydra* (TROTIER et al., 1997) nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56%, utilizando como controle meio de cultura. Se necessário, as amostras foram diluídas para a filtração. Foram colocados 4 ml de amostra e 3 organismos por repetição em placas de poliestireno contendo 12 “pocinhos” (3 repetições x 4 concentrações). As alterações na morfologia (doses sub-letais) e morte das *Hydras* foram avaliadas após 24, 48, 72 e 96 h de exposição e os valores de NOEC

(maior concentração sem efeito sobre o organismo) e LOEC (menor concentração que apresentou efeito sobre o organismo) foram calculados.

2.2.2.5.3 *Selenastrum capricornutum*

Foram utilizados cinco controles e três repetições das diluições 100, 50; 25; 12,5 e 6,25% da amostra filtrada a 0,22 μm em 2,5 ml de meio (BLAISE; FORGET; TROTTIER, 2000). Se necessário, foram realizadas diluições do extrato para a filtração. O inóculo foi coletado durante a fase exponencial de crescimento da cultura. Uma solução de 20 ml contendo $2,6 \cdot 10^5$ cel ml^{-1} foi preparada, de maneira que foram adicionadas 10.000 células para cada repetição, sendo o número de células determinado por contagem em microscópio utilizando a câmara de hemacitômetro de Neubauer. As amostras foram incubadas por 72 h a 24°C sob constante iluminação ($4.000 \pm 10\%$ lux) com lâmpadas frias fluorescentes. As amostras foram agitadas manualmente três vezes ao dia em períodos diferentes. Foram feitas contagens do número final de algas para verificar se houve inibição sobre o crescimento destes organismos, a partir dos quais foram determinados os valores da CI_{50} , que é a concentração que apresenta efeito sobre 50 % dos indivíduos analisados.

2.2.2.5.4 Alface (*Lactuca sativa*)

Foram colocadas 20 sementes de alface (*Lactuca sativa*) sobre papel de filtro Whatman n.1 em placa de poliestireno ($\varnothing = 9$ cm) contendo 2 ml de cada diluição da amostra (100, 50; 25; 12,5 e 6,25%), previamente filtradas em membrana Millipore 0,22 μm . As amostras foram incubadas no escuro envoltas por folha de alumínio e após 72 h foram avaliadas a germinação das sementes e o comprimento das radículas para o cálculo da CI_{50} (DUTKA, 1989). A porcentagem de inibição foi calculada segundo a eq.(1):

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{comprimento médio amostra} - \text{comprimento médio controle}}{\text{comprimento médio do controle}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.2.6 Análise do efeito tóxico do efluente sobre os fungos basidiomicetos através de microscopia eletrônica

O fungo foi crescido sobre o efluente em meio sólido (15 g de ágar em 1000 ml de efluente contendo bagaço de cana a 2%), sendo utilizado para o controle o meio malte-ágar (20 g malte, 2 g de extrato de levedura, 20 g de ágar e 1000 ml de H₂O destilada).

Para a análise em microscopia de transmissão (MET), as amostras foram fixadas utilizando uma solução contendo 2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 0,001 M de CaCl₂ e 0,05 M de tampão cacodilato de sódio a pH 7,2 durante 3 h. Foram feitas três transferências de 15 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, e então o material foi fixado em OsO₄ (1%) no mesmo tampão por 2 h a 4°C. Após lavagem do material por três vezes de 5 minutos em solução salina (0,9%), as amostras foram coradas utilizando solução de acetato de uranila (2,5%) por 16 h a 4°C. Em seguida, as amostras foram desidratadas em acetona em trocas de 5 min utilizando as concentrações de 25, 50, 75%, duas vezes na concentração de 90% por 10 minutos e três vezes em 100% de acetona por 20 minutos. O material foi embebido em resina epon nas concentrações crescentes de resina/acetona 1:1, 2:1 e resina pura e emblocado por 48 h a 60°C em estufa. As secções foram cortadas em ultramicrotomo e os cortes foram corados utilizando acetato de uranila 2,5% por 10 minutos e citrato de chumbo por 6 minutos.

Para a microscopia de varredura (MEV), as amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, CaCl₂ 0,001 M e tampão cacodilato de sódio 0,05 M, por um período de 24 h, e em seguida foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,1 M por 20 minutos. As amostras foram tratadas com solução de OsO₄ (1%) por 1 h a 4°C. Em seguida, as amostras foram desidratadas em banhos sucessivos de 20 min em soluções de etanol nas concentrações crescentes de 35, 50, 60, 75, 85 e 95% e três vezes em acetona 100% por 20 minutos. Após secagem em ponto crítico, as amostras foram colocadas sobre stubs e cobertas com ouro na espessura de 200 nm e levadas para observação ao microscópio eletrônico.

2.2.2.7 Degradação do corante índigo por *Phormidium* em Bioreator

2.2.2.7.1 Descoloração do índigo

Foi utilizado um Bioreator de bancada, de tamanho 15 cm x 60 cm com 6 l de capacidade, o qual recebeu aeração constante e iluminação por 4 lâmpadas fluorescentes, uma delas

simulando a luz solar. O corante foi adicionado ao meio de cultura BG-11 (ALLEN, 1968) na concentração de 0,02%, o qual foi esterilizado em autoclave a 120° C e 1 atm.

O inóculo foi crescido em 500 ml de meio BG-11, o qual tem a característica de formar um biofilme aderido à superfície do frasco, necessitando ser ressuspensionado no meio de cultura para inoculação.

Foram retiradas amostras do bioreator periodicamente aos 2, 4, 7, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 dias para leitura da descoloração em espectrofotômetro (583 e 680 nm), análise da toxicidade utilizando o celenterado *Hydra attenuata* e análise dos metabólitos. Ao final do experimento, 1 l de amostra foi retirada para realização do teste de micronúcleos utilizando raiz de cebola para avaliação da genotoxicidade.

2.2.2.7.2 Degradação do índigo com diferentes soluções de nutrientes

Foi testada a degradação do índigo pela cianobactéria *Phormidium* em meio de cultura contendo um ou mais nutrientes, onde foram avaliados o crescimento e degradação do corante. Foram utilizados 50 ml dos seguintes meios em frascos Erlenmeyers de 125 ml:

Solução A (mg l⁻¹): 4,39 KH₂PO₄; 50 MgSO₄.7H₂O; 5 NaCl; 5 KCl; 15,85 NaHCO₃; 10,87 Na₂SiO₃.5H₂O; 0,485 Fe-EDTA; e solução de micronutrientes 1,43 H₃BO₃; 0,195 Na₂MoO₄.2H₂O; 0,024 NiSO₄.7H₂O; 0,905 MnCl₂.4H₂O; 0,0395 CuSO₄.5H₂O; 0,11 ZnSO₄.7H₂O e 0,0245 Co(NO₃)₂.6H₂O (WHITTON, 1996).

Solução B (mg l⁻¹): 4,39 KH₂PO₄; 50 MgSO₄.7H₂O; 40 Ca(NO₃)₂.4H₂O; 5,64 NH₄Cl; 5 NaCl; 5 KCl; 15,85 NaHCO₃; 10,87 Na₂SiO₃.5H₂O; 0,242 Fe-EDTA; e solução de micronutrientes 1,43 H₃BO₃; 0,195 Na₂MoO₄.2H₂O; 0,024 NiSO₄.7H₂O; 0,905 MnCl₂.4H₂O; 0,0395 CuSO₄.5H₂O; 0,11 ZnSO₄.7H₂O e 0,0245 Co(NO₃)₂.6H₂O (WHITTON, 1996).

Solução C (mg l⁻¹): 0,878 KH₂PO₄; 50 MgSO₄.7H₂O; 80 Ca(NO₃)₂.4H₂O; 7,76 NH₄Cl; 5 NaCl; 5 KCl; 15,85 NaHCO₃; 10,87 Na₂SiO₃.5H₂O; 0,242 Fe-EDTA; e solução de micronutrientes, 1,43 H₃BO₃; 0,195 Na₂MoO₄.2H₂O; 0,024 NiSO₄.7H₂O; 0,905 MnCl₂.4H₂O; 0,0395 CuSO₄.5H₂O; 0,11 ZnSO₄.7H₂O e 0,0245 Co(NO₃)₂.6H₂O (WHITTON, 1996).

Macronutrientes (mg l⁻¹): 4,39 KH₂PO₄; 50 MgSO₄.7H₂O; 50 Ca(NO₃)₂.4H₂O; 5,64 NH₄Cl; 5 NaCl; 5 KCl; 15,85 NaHCO₃.

Meio NPK (mg l⁻¹): 4,39 KH₂PO₄; 5,64 NH₄Cl; 50 Ca(NO₃)₂.4H₂O; 5 KCl.

Meio NP (mg l⁻¹): 4,39 KH₂PO₄; 5,64 NH₄Cl; 50 Ca(NO₃)₂.4H₂O.

Meio N (mg l^{-1}): 5,64 NH_4Cl ; 50 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Meio P (mg l^{-1}): 4,39 KH_2PO_4 .

Índigo: sem adição de nutrientes

O crescimento da cianobactéria foi avaliado visualmente e a descoloração do índigo avaliada por espectrofotometria (583 e 680 nm) aos 7, 14 e 21 dias.

2.2.2.7.3 Teste de genotoxicidade utilizando raiz de cebola (*Allium cepa*)

Bulbos de cebola comprados no comércio foram limpos e as raízes secas removidas para exposição das gêmulas radiculares. Os bulbos foram deixados imersos em água de torneira por 2 h para destoxificação de qualquer substância adicionada no armazenamento. Foram testados o controle (corante índigo a 0,02%), o efluente final após 26 dias de incubação na presença da cianobactéria *Phormidium* e, como controle positivo, água mineral. Tubos de ensaio com capacidade de 30 ml (5 repetições) foram totalmente preenchidos e as cebolas foram inseridas sobre a boca do tubo e o volume completado periodicamente, conforme as raízes absorviam a solução ou esta evaporava. Após 3 dias de exposição, foram cortados 1 cm do ápice das raízes, sendo 2 raízes por bulbo, as quais foram colocadas em solução Carnoy (álcool/ ácido acético 3:1) por 24 h para fixação. Em seguida, as raízes foram transferidas para solução de etanol 70% e conservadas em geladeira até a realização dos testes.

Para o preparo das lâminas, as raízes foram lavadas 3 vezes em banhos de H_2O destilada por 5 minutos para retirada da solução fixadora e transferidas para solução HCl 1 N a 60°C , onde permaneceram durante 8 minutos. Após lavagem rápida em H_2O destilada, foram colocadas na presença do corante (Reagente de Schiff) por 2 h no escuro. Em seguida, foram transferidas novamente para H_2O destilada para retirada do excesso de corante. Foram cortados cerca de 2 mm do ápice sobre uma lâmina onde foi adicionado 1 gota do corante carmim acético 2%, cobrindo-se com lamínula e esmagando-se o material com leves batidas. As lâminas foram fixadas aquecendo-as sobre a chama do Bico de Bunsen em movimentos circulares durante alguns segundos.

As lâminas permanentes foram preparadas mergulhando-as em nitrogênio líquido por alguns segundos para retirada da lamínula e deixando-se secar por 24 h à temperatura ambiente. Após gotejar gotas de verniz sobre o material, colocou-se novamente a lamínula sobre o verniz e deixou-se secar por 2 dias para observação microscópica.

Foram avaliadas 500 células por lâmina sobre a inibição da mitose (divisão celular), o número de micronúcleos e a presença de anormalidades cromossômicas. Para o índice de mutagenicidade foram consideradas apenas a presença de micronúcleos, pontes e quebras cromossômicas. Os resultados foram expressos em porcentagem de células anômalas sobre o total de células. O índice mitótico corresponde à porcentagem de células em divisão sobre o total de células.

2.2.2.7.4 Análise dos Metabólitos

Para extração dos produtos do meio de cultura, 50 ml do meio foram extraídos 2 vezes com 50 ml de diclorometano, utilizando funil de separação (líquido/líquido). O extrato obtido foi concentrado em rotoevaporador até o volume de 3 ml. Os metabólitos foram analisados utilizando a técnica de cromatografia de camada delgada associada ao espectrômetro de massas Maldi-Tof, pelo Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, do Instituto de Química da Unicamp, Campinas, SP.

Figura 2 - Fórmula Estrutural do Índigo

2.2.3 Resultados e Discussão

2.2.3.1 Degradação pela planta Raiz-forte

2.2.3.1.1 Atividade da enzima peroxidase na planta

Foram encontrados valores semelhantes para a atividade da enzima peroxidase na planta moída no laboratório, na indústria e extrato líquido. No bagaço, o teor encontrado de enzima foi menor que os outros tratamentos. Os métodos da seringadazine e o-dianisidine apresentaram

valores semelhantes, sendo que nos tratamentos planta moída no laboratório e bagaço o método da o-dianisidine apresentou valores maiores que o método da seringadazine (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade da enzima peroxidase na planta raiz-forte

Tratamento	Atividade ($\text{U g}^{-1} \times 10^{-1}$)	
	Método da seringadazine	Método da o-dianisidine
Planta moída (laboratório)	4,969	7,520
Planta moída (indústria)	9,750	9,108
Bagaço	0,080	0,107
Extrato líquido	2,125	2,985

2.2.3.1.2 Descoloração dos corantes técnicos

Os corantes índigo e RBBR foram descoloridos em todos os tratamentos em maior ou menor grau, enquanto o corante preto-enxofre não descoloriu na presença do bagaço e do extrato da planta (Tabela 2). O tratamento com a planta moída no laboratório foi mais eficiente na degradação do índigo que a planta moída na indústria, porém para o preto-enxofre a planta moída na indústria foi mais eficiente. O extrato líquido foi menos eficiente que a planta moída. O bagaço também apresentou descoloração para o índigo e RBBR, embora a descoloração tenha sido menor que nos outros tratamentos, não sendo capaz de descolorir o preto-enxofre.

Tabela 2 - Porcentagem de descoloração dos corantes técnicos pela planta raiz-forte

Tratamentos	Índigo		RBBR	Preto-enxofre	
	583 nm	680 nm	595 nm	380 nm	454 nm
Planta moída (laboratório)	79,70	83,10	84,91	29,85	47,25
Planta moída (indústria)	44,44	66,47	82,14	41,21	68,35
Bagaço	32,88	48,74	46,44	0	0
Extrato líquido	37,77	47,14	76,67	0	12,79

2.2.3.1.3 Descoloração do efluente

Houve remoção visual da cor em todos os tratamentos com a aplicação da planta, porém as leituras da absorbância sofreram interferência da cor da planta, principalmente para os tratamentos planta moída na indústria e bagaço, devido à oxidação destes substratos durante o processo de moagem (Tabela 3). O extrato líquido foi o tratamento mais eficiente na descoloração do efluente. O bagaço apresentou descoloração visual, embora tenha o menor conteúdo de enzima. Completa descoloração ocorreu após 2 h de exposição. Não foi observada adsorção dos corantes à planta e a diferença entre as leituras de absorbância nos dois comprimentos de onda, conforme recomendado por Glenn e Gold (1983), também indicou que não houve adsorção.

Tabela 3 - Porcentagem de descoloração do efluente tratado com raiz-forte

Tratamentos	Descoloração (%)	
	583 nm	680 nm
Planta moída (laboratório)	30,0	28,99
Planta moída (indústria)	2,0	4,14
Bagaço	2,0	8,28
Extrato líquido	31,2	32,54

2.2.3.1.4 Descoloração do lodo têxtil

A planta raiz-forte foi capaz de descolorir o lodo em todos os tratamentos e a descoloração dependeu da quantidade do material aplicado. Na proporção de 50% houve rápida remoção da cor (2 dias), enquanto na proporção de 25% a remoção foi mais lenta e dependeu do revolvimento do material, mostrando que a degradação ocorre principalmente na superfície em contato com a planta. Na proporção de 10% a degradação foi incompleta e esta ocorreu apenas nas regiões em contato com a planta.

O lodo que apresentava cor preta após o período de incubação adquiriu coloração bege-acizentada. Nas leituras por refletância, o parâmetro L apresentou aumento significativo, o que indica clareamento da cor preta em direção ao branco. As leituras da descoloração por refletância estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Leituras da refletância do lodo tratado e não tratado com raiz-forte

Tratamentos	Tempo zero			Tempo 5 dias		
	L	a	b	L	a	b
Controle	19,93	0,065	-0,165	28,13	0,248	3,895
Planta moída no laboratório						
50%	24,78	0,13	2,7	27,96	0,345	4,61
25%	24,18	-0,045	1,195	26,55	0,0465	3,63
10%	24,66	0,05	1,13	22,31	-0,41	0,2
Planta moída na indústria						
50%	26,86	0,445	4,03	32,54	0,83	6,43
25%	26,15	0,185	2,48	26,41	-0,35	2,165
10%	23,51	-0,065	0,88	23,14	-0,595	0,315
Bagaço						
50%	26,46	0,43	3,38	29,58	0,43	5,545
25%	23,64	0,11	1,51	27,045	-0,08	3,565
10%	24,29	0,215	1,73	22,08	-0,46	0,0485

O bagaço foi também capaz de descolorir o lodo, embora contenha menor quantidade de enzima. A degradação neste caso pareceu depender mais do contato com a planta que da quantidade de enzima contida no material. Sendo assim o bagaço, que é um resíduo industrial, poderia ser aproveitado no tratamento do lodo.

2.2.3.1.5 Testes de Toxicidade

2.2.3.1.5.1 Efluente têxtil

Houve aumento na toxicidade (efeito sub-letal) após o tratamento do efluente com os tratamentos planta moída no laboratório, planta moída na indústria e extrato da planta para *Hydra attenuata*. O bagaço apresentou os mesmos valores de NOEC e LOEC que o controle, não apresentando aumento de toxicidade (Tabela 5). Também houve maior letalidade dos organismos após o tratamento com a planta. Esse aumento de toxicidade indica que provavelmente a degradação resultou na formação de metabólitos secundários, os quais foram mais tóxicos que as moléculas parentais.

Este aumento na toxicidade pode também ter sido causado pela própria planta raiz-forte, devido à presença de elevado teor de substâncias alcalóides que podem ter efeito inibitório sobre os organismos.

Tabela 5 - Valores de NOEC e LOEC para *Hydra attenuata* para o efluente tratado e não tratado com raiz-forte

Tratamentos	Letal		Sub-letal	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
Controle	12,5	25	12,5	25
Planta moída (laboratório)	6,25	12,5	0	1,56
Planta moída (indústria)	3,125	6,25	1,56	3,125
Bagaço	12,5	25	12,5	25
Extrato líquido	6,25	12,5	1,56	3,125

No teste do efluente controle com a alga *Selenastrum capricornutum* houve baixa toxicidade, sendo que na diluição de 100% foi encontrada apenas 23% de inibição sobre os organismos (Tabela 6), não sendo possível o cálculo da CI_{50} , pois esta está acima da diluição de 100%. No entanto, após o tratamento com a planta, foi detectada elevada toxicidade em todos os tratamentos indicando a formação de metabólitos altamente tóxicos, considerando que em baixas diluições do efluente tratado com raiz-forte houve elevado efeito tóxico sobre a alga.

No teste de germinação e crescimento de sementes com o efluente não foi detectada toxicidade para o tratamento controle (Tabela 7), porém após o tratamento com a planta raiz-forte os tratamentos apresentaram novamente aumento na toxicidade, sendo que os tratamentos que apresentaram maior efeito tóxico foram a planta moída no laboratório e indústria. O bagaço apresentou valores muito baixos de toxicidade, parecendo ser o tratamento que causou menor toxicidade ao organismo testado.

Segundo Tonegawa, Dec e Bollag (2003) a enzima peroxidase possui capacidade para degradar aminas, que seriam possíveis metabólitos produzidos na degradação de corantes. Também sugeriram que pode haver uma adsorção da enzima com os produtos formados causando a inativação da enzima, a qual poderia ser suprimida pelo uso de aditivos como polietileno glicol (PEG) e surfactantes.

Tabela 6 - Porcentagens de inibição sobre a alga *Selenastrum capricornutum* para o efluente tratado e não tratado com raiz-forte

Tratamentos	Concentração (%)					CI ₅₀
	100	50	25	12,5	6,25	
Controle	23	32,62	34	18,87	0	-
Planta moída (laboratório)	96,42	95,05	81,57	90,92	60,12	2,76
Planta moída (indústria)	83,22	98,62	96,15	95,60	66,72	1,86
Bagaço	96,56	95,73	95,32	98,79	99,94	1,70
Extrato líquido	94,22	96,97	99,61	95,60	98,90	1,70

Tabela 7 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o efluente tratado e não tratado com raiz-forte

Tratamentos	Concentração (%)				
	100	50	25	12,5	6,25
Controle	0	0	0	0	0
Planta moída (laboratório)	49,30	26,72	17,62	18,08	7,25
Planta moída (indústria)	40,09	17,05	0	10,71	13,01
Bagaço	0	1,49	6,10	3,2	11,29
Extrato líquido	18,77	13,36	21,08	6,10	0

Os corantes possuem biodegradabilidade baixa (baixa DBO) sendo refratários à maioria dos tratamentos convencionais, passando intactos pela maioria deles. O tratamento com a planta raiz-forte, embora tenha aumentado a toxicidade, poderia aumentar a biodegradabilidade se os metabólitos formados forem susceptíveis à ação microbiana dos tratamentos biológicos. Para tentar remover a toxicidade deixada pelo tratamento com raiz-forte, o efluente após tratamento com a planta foi incubado com a bactéria *Acinetobacter johnsonii* e também com inóculo coletado da própria Estação de tratamento de Americana (ETE) para verificar se esta toxicidade poderia ser removida posteriormente por estes tratamentos (Item 4.1.5.1.1 e 4.1.5.1.2).

2.2.3.1.5.2 Efluente tratado com raiz-forte + inóculo da Estação de Tratamento (ETE)

No teste com *Hydra attenuata* a toxicidade (efeito sub-letal) foi maior no tratamento do efluente com a planta e posterior tratamento aeróbio que no tratamento controle (Tabela 8). Em relação ao efluente tratado com raiz-forte apenas, o tratamento aeróbio parece ser capaz de remover a toxicidade residual. Também a letalidade foi mais elevada no tratamento com a planta e sistema aeróbio que no controle.

Tabela 8 - Valores de NOEC e LOEC para *Hydra attenuata* para o efluente tratado com raiz-forte + inóculo ETE

Tratamentos	Letal		Sub-letal	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
Controle	25	50	25	50
Raiz-forte + Inóculo ETE	6,25	12,5	3,125	6,25

Tabela 9 - Porcentagens de inibição sobre a alga *Selenastrum capricornutum* para o efluente tratado com raiz-forte + inóculo ETE

Diluição (%)	Inibição (%)	
	Controle	Raiz-forte + Inóculo ETE
50	0	71,84
25	0	40,43
12,5	0	0
6,25	0	0
3,125	0	0
CI ₅₀	-	32,22

Não foi detectada toxicidade para o efluente controle no teste da alga (Tabela 9), enquanto o efluente tratado com raiz-forte + inóculo da ETE apresentou toxicidade nas diluições de 50 e 25% de 71,84 e 40,43%, respectivamente, e CI₅₀ de 32,22%, a qual continua a ser maior que o efluente não tratado. No teste de sementes não foi detectado efeito tóxico para o controle e efluente tratado com raiz-forte + inóculo da ETE.

2.2.3.1.5.3 Efluente tratado com raiz-forte + *Acinetobacter johnsonii*

Para o teste com *Hydra attenuata* foram encontrados valores semelhantes de NOEC e LOEC para o controle e planta tratada com raiz-forte + *A.johnsonii*, porém com relação ao efluente tratado com raiz-forte apenas, a toxicidade parece ter sido reduzida (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores de NOEC e LOEC para *Hydra attenuata* para o efluente tratado com raiz-forte + *A.johnsonii*

Tratamentos	Letal		Sub-letal	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
Controle	12,5	25	12,5	25
Raiz-forte + <i>A.johnsonii</i>	12,5	25	12,5	25

Tabela 11 - Porcentagens de inibição sobre a alga *Selenastrum capricornutum* para o efluente tratado com raiz-forte + *A. johnsonii*

Diluição (%)	Inibição (%)	
	Controle	Raiz-forte + <i>A.johnsonii</i>
100	23,49	85,55
50	1,74	81,88
25	0	78,64
12,5	0	86,19
6,25	0	81,24
CI ₅₀	-	4,79

Porém, no teste da alga houve um aumento da toxicidade em relação ao controle (Tabela 11). A inibição foi elevada até para as maiores diluições, semelhante ao tratamento do efluente com raiz-forte somente, indicando a toxicidade não teria sido reduzida após o tratamento. O valor da CI₅₀ foi 4,79%, tão alto quanto a CI₅₀ do efluente tratado com raiz-forte apenas, indicando que não houve degradação dos metabólitos formados pela planta.

No teste de germinação de sementes não foram detectados efeitos tóxicos para o efluente tratado e controle sobre o crescimento das radículas, porém houve inibição sobre a germinação

das sementes após o tratamento de 47,36; 10,52 e 10,52% nas concentrações de 100, 50 e 25%, respectivamente.

2.2.3.1.5.4 Lodo

O lodo tratado com raiz-forte apresentou aumento na toxicidade com relação ao controle para o teste com a alga *Selenastrum capricornutum* e para o teste com as sementes de alface (Tabela 12 e 13). No teste com as sementes de alface o bagaço foi o tratamento mais tóxico sobre o crescimento das radículas, ao contrário do efluente, onde o bagaço havia apresentado menor toxicidade. A planta moída no laboratório foi o tratamento com menor efeito tóxico. No teste de germinação de sementes houve efeito sobre a porcentagem de germinação somente no tratamento controle, com inibição de 10,52 e 5,26% nas concentrações de 25 e 12,5%.

Novamente o aumento na toxicidade foi bastante elevado mesmo nas maiores diluições. As enzimas da planta foram capazes de promover a quebra do grupo cromóforo dos corantes ocorrendo remoção da cor, porém houve a formação de outros compostos, os quais apresentaram elevada toxicidade para os organismos testados.

O organismo que apresentou maior sensibilidade para o efluente e lodo, de todos os bioensaios, foi a alga *Selenastrum capricornutum*, enquanto as sementes de alface foram os menos sensíveis.

Tabela 12 - Porcentagem de inibição sobre a alga *Selenastrum capricornutum* para o lodo tratado e não tratado com raiz-forte

Tratamentos	Concentrações (%)					CI ₅₀
	25	12,50	6,25	3,13	1,56	
Controle	95,68	59,70	31,34	5,22	0	9,30
Planta moída (laboratório)	97,31	86,56	74,47	73,88	62,83	0,88
Planta moída (indústria)	94,53	92,53	78,50	75,07	67,76	0,61
Bagaço	95,35	94,62	92,62	83,73	75,07	0,26

Tabela 13 - Porcentagem de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o lodo tratado e não-tratado com raiz-forte

Tratamentos	Concentrações (%)					CI ₅₀
	25	12,50	6,25	3,13	1,56	
Controle	30,83	11,95	18,19	10,66	0	82,72
Planta moída (laboratório)	46,62	31,99	19,72	18,70	4,90	30,61
Planta moída (indústria)	64,21	36,60	23,30	15,43	14,10	17,49
Bagaço	84,15	41,48	26,27	15,63	0	12,80

2.2.3.2 Degradação do efluente e lodo por cianobactérias

2.2.3.2.1 Descoloração dos corantes técnicos

As cianobactérias foram capazes de descolorir completamente o corante índigo, enquanto que os corantes técnicos RBBR e preto-enxofre foram degradados em menor extensão. A cianobactéria *Phormidium* foi a linhagem que apresentou melhor capacidade de descoloração do corante índigo, removendo-o completamente do meio. O corante preto-enxofre foi ligeiramente descolorido na presença de *Anabaena* (Tabela 14). Na presença de luz houve fotodegradação, principalmente para os corantes índigo e preto-enxofre.

Tabela 14 - Porcentagem de descoloração dos corantes técnicos por cianobactérias

Tratamentos	Índigo		RBBR	Preto-enxofre	
	583 nm	680 nm	595 nm	380 nm	454 nm
Controle Luz	56,25	56,14	4,0	28,33	29,41
<i>Anabaena</i>	62,5	71,92	0	41,51	42,12
<i>Phormidium</i>	75	91,22	10,62	0	0
<i>Synechococcus</i>	0	0	11,53	3,35	0

2.2.3.2.2 Descoloração do efluente

As cianobactérias *Anabaena* e *Phormidium* foram capazes de descolorir o efluente (Tabela 15), porém com *Synechococcus* o efluente apresentou cor verde intensa devido ao crescimento das células dificultando a leitura da absorbância.

O controle escuro apresentou absorbância ligeiramente maior que o controle luz, mostrando que ocorreu fotodegradação, porém os valores foram menores que na presença dos organismos.

Tabela 15 - Porcentagem de descoloração do efluente tratado com cianobactérias

Tratamentos	Descoloração (%)	
	583 nm	680 nm
Controle Luz	12,90	12,62
<i>Anabaena</i>	23,87	15,55
<i>Phormidium</i>	28,38	20,0
<i>Synechococcus</i>	1,29	0

2.2.3.2.3 Testes de toxicidade com o efluente

O tratamento com as cianobactérias foi capaz de reduzir a toxicidade com relação ao efluente controle em todos os tratamentos no teste com *Hydra attenuata*, sendo que houve um aumento de 4 vezes no NOEC para efeito sub-letal para *Anabaena* e *Phormidium*, e 2 vezes para *Synechococcus* (Tabela 16). O controle escuro apresentou efeito tóxico sub-letal ligeiramente maior que o controle na luz, indicando que a fotodegradação, embora tenha sido pouco significativa, foi suficiente para reduzir a toxicidade.

No teste com a alga *Selenastrum capricornutum* houve efeito tóxico apenas para os tratamentos controle escuro e luz na diluição de 100% do efluente, com porcentagem de inibição de 3,05 e 33,17%, respectivamente. Não foi detectada toxicidade para os tratamentos inoculados com as cianobactérias. A CI_{50} não pode ser calculada em nenhum dos tratamentos, pois os valores estão acima da concentração 100%.

Tabela 16 - Valores de NOEC e LOEC para o efluente tratado com cianobactérias sobre *Hydra attenuata*

Tratamentos	Letal		Sub-letal	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
Controle Escuro	12,5	25	6,25	12,5
Controle Luz	12,5	25	12,5	25
<i>Anabaena</i>	50	-	25	50
<i>Phormidium</i>	50	-	50	-
<i>Synechococcus</i>	25	50	25	50

Para o teste com as sementes de alface, houve redução na toxicidade após o tratamento com as cianobactérias (Tabela 17). O CI_{50} foi calculada somente para o controle escuro (94,98%), enquanto nos outros tratamentos os valores foram acima de 100%.

Tabela 17 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o efluente tratado com cianobactérias

Tratamentos	Concentração (%)					
	100	50	25	12,5	6,25	CI_{50}
Controle Escuro	54,23	6,3	1,55	2,41	8,46	94,98
Controle Luz	13,21	1,98	4,57	3,28	5	-
<i>Anabaena</i>	17,09	8,72	4,57	0,26	10,19	-
<i>Phormidium</i>	10,18	0	0	0	11,91	-
<i>Synechococcus</i>	32,64	0	2,41	10,19	0,26	-

Pela Tabela 19 observa-se que na presença das cianobactérias na concentração de 100% a inibição foi sempre menor que no controle escuro, principalmente para *Phormidium* e *Anabaena*. O controle luz também apresentou menor efeito tóxico que o controle escuro, provavelmente devido à fotodegradação.

2.2.3.2.4 Descoloração do Lodo

Observou-se após o tratamento com as cianobactérias que não houve descoloração do lodo. Neste caso, não houve dessorção dos corantes do lodo para o meio, os quais permaneceram adsorvidos e indisponíveis a ação das cianobactérias.

2.2.3.2.5 Testes de toxicidade com o Lodo

No teste com *H. attenuata* houve pequena redução na toxicidade para os tratamentos com as cianobactérias *Phormidium* e *Synechococcus* (Tabela 18), enquanto no teste com a alga *Selenastrum capricornutum* não foi detectado efeito tóxico no controle e após tratamento com as cianobactérias.

Tabela 18 - Valores de NOEC e LOEC para o lodo tratado com cianobactérias sobre *Hydra attenuata*

Tratamentos	Letal		Sub-letal	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
Controle Escuro	3,125	6,25	3,125	6,25
Controle Luz	3,125	6,25	3,125	6,25
<i>Anabaena</i>	3,125	6,25	3,125	6,25
<i>Phormidium</i>	6,25	12,5	6,25	12,5
<i>Synechococcus</i>	12,5	25	6,25	12,5

No entanto, houve efeito tóxico sobre a germinação das sementes, sendo que na presença das três linhagens de cianobactérias houve inibição sobre a germinação, sendo o efeito mais pronunciado para *Synechococcus*, cujo CI_{50} foi de 45,73% (Tabela 19).

Aumento de toxicidade foi detectado também sobre o crescimento das radículas de alface, após o tratamento com a cianobactéria *Phormidium*. A cianobactéria *Synechococcus* apresentou toxicidade ligeiramente menor que o controle escuro e maior que o controle luz, enquanto a cianobactéria *Anabaena* apresentou toxicidade menor que ambos os controles. O controle luz apresentou toxicidade menor que o controle escuro indicando a possibilidade de fotodegradação (Tabela 20).

Tabela 19 - Inibição sobre a germinação das sementes de alface após tratamento do lodo com as cianobactérias

Tratamentos	Concentração (%)				
	50	25	12,5	6,25	3,125
Controle Escuro	1,72	0	0	0	0
Controle Luz	1,72	0	0	0	0
<i>Anabaena</i>	6,89	0	1,72	1,72	1,72
<i>Phormidium</i>	17,24	6,89	1,72	0	1,72
<i>Synechococcus</i>	63,79	12,06	12,06	1,72	1,72

Tabela 20 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o lodo tratado com cianobactérias

Tratamentos	Concentração (%)					CI ₅₀
	50	25	12,5	6,25	3,125	
Controle Escuro	62,02	60,56	40,70	42,45	39,24	17,28
Controle Luz	49,75	44,20	41,57	32,52	31,06	51,52
<i>Anabaena</i>	49,17	46,25	39,82	29,89	33,98	55,37
<i>Phormidium</i>	74,87	64,94	62,02	50,04	38,07	6,23
<i>Synechococcus</i>	55,01	57,93	36,90	36,37	36,90	23,89

2.2.3.3 Degradação do efluente por *Acinetobacter johnsonii*

2.2.3.3.1 Descoloração dos corantes técnicos e efluente

A bactéria *Acinetobacter johnsonii* não foi capaz de descolorir nenhum dos corantes técnicos testados. Os frascos contendo efluente apresentaram floculação causada pela aglomeração de colônias de bactérias, sendo que estes flocos apresentaram cor escura indicando adsorção do corante às bactérias. Houve remoção da cor (26%), porém esta pode ter resultado da adsorção do corante às colônias de bactérias.

2.2.3.3.2 Teste de toxicidade

Não houve alteração nos valores de NOEC e LOEC para efeito letal e sub-letal após o tratamento com *Acinetobacter* em relação ao controle para o teste com *Hydra attenuata* (Tabela 21).

Tabela 21 - Valores de NOEC e LOEC para o efluente tratado com *Acinetobacter johnsonii* sobre *Hydra attenuata*

Tratamentos	Letal		Sub-letal	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
Controle	12,5	25	12,5	25
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	12,5	25	12,5	25

No teste com a alga *Selenastrum capricornutum*, que foi o organismo mais sensível, houve aumento na toxicidade após o tratamento com *Acinetobacter*. A porcentagem de inibição para o efluente não diluído (100%) aumentou 3 vezes após o tratamento (Tabela 22), indicando que pode ter ocorrido formação de metabólitos mais tóxicos. Porém, esta degradação não resultou em remoção significativa da cor do efluente.

No teste de germinação de sementes não foi detectado efeito tóxico em nenhum dos tratamentos para o organismo testado.

Tabela 22 - Porcentagem de inibição sobre a alga *Selenastrum capricornutum* para o efluente tratado com *Acinetobacter johnsonii*

Diluição (%)	Inibição (%)	
	Controle	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
100	23,49	90,73
50	1,74	90,95
25	0	81,24
12,5	0	88,58
6,25	0	80,38
CI ₅₀	-	1,91

2.2.3.4 Degradação dos corantes técnicos, efluente e lodo pelos fungos basidiomicetos

2.2.3.4.1 Descoloração dos corantes técnicos pelos fungos basidiomicetos

As linhagens de *Pleurotus* foram capazes de descolorir completamente os corantes índigo e RBBR, com porcentagens de descoloração acima de 97% para o Índigo e 92% para o RBBR. O corante preto enxofre foi degradado em menor grau, com valores entre 27% e 60% de degradação (Tabela 23).

Tabela 23 - Porcentagem de descoloração dos corantes técnicos tratados com as linhagens de *Pleurotus*

Tratamentos	Índigo		RBBR	Preto-enxofre	
	583 nm	680 nm	595 nm	380 nm	454 nm
<i>P. sajor-caju</i> F2	98,49	99,11	99,90	27,50	42,46
<i>P.sajor-caju</i> F6	98,81	99,17	99,90	36,98	44,32
<i>P. ostreatus</i>	97,31	98,09	92,95	58,36	60,13

2.2.3.4.2 Testes de Toxicidade com o efluente têxtil

As linhagens de *Pleurotus* estudadas mostraram aumento nos valores de NOEC e LOEC para *Hydra attenuata*, indicando redução na toxicidade após o tratamento. As linhagens inativadas mostraram também redução no efeito tóxico, indicando que pode estar ocorrendo adsorção dos corantes ao micélio, porém a maior redução na toxicidade ocorreu com as linhagens ativas (Tabela 24). A letalidade também foi reduzida somente com as linhagens ativas, sendo que no caso de *P. ostreatus* houve aumento na toxicidade com o tratamento inativado.

No teste de germinação de sementes houve redução na toxicidade sobre o crescimento das radículas para as linhagens ativas de *Pleurotus* com relação ao controle (Tabela 26), enquanto as linhagens inativadas não apresentaram redução na toxicidade, indicando que a adsorção não foi o principal processo responsável pela redução na toxicidade do efluente. Foi encontrado efeito sobre a germinação das sementes apenas na presença do fungo *Pleurotus sajor-caju* F2 e F6 ativos e nas linhagens inativadas (Tabela 25). No teste com a alga *Selenastrum capricornutum* não houve inibição em nenhum dos tratamentos.

Tabela 24 - Valores de NOEC e LOEC para o efluente tratado com as linhagens de *Pleurotus* ativas e inativadas sobre *Hydra attenuata*

Tratamentos	Letal		Sub-letal	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
Controle	25	50	1,56	3,125
<i>Pleurotus sajor-caju</i> F2 ativo	50	-	12,5	25
<i>Pleurotus sajor-caju</i> F2 inativo	25	50	6,25	12,5
<i>Pleurotus sajor-caju</i> F6 ativo	50	-	12,5	25
<i>Pleurotus sajor-caju</i> F6 inativo	25	50	6,25	12,5
<i>Pleurotus ostreatus</i> ativo	50	-	12,5	25
<i>Pleurotus ostreatus</i> inativo	6,25	12,5	3,125	6,25

Tabela 25 - Inibição sobre a germinação de sementes após tratamento do efluente com as linhagens de *Pleurotus*

Tratamentos	Concentração (%)					CI ₅₀
	50	25	12,5	6,25	3,125	
Controle	0	0	0	0	0	-
<i>P. sajor-caju</i> F2 ativo	68,42	47,36	0	0	0	27,22
<i>P. sajor-caju</i> F2 inativo	10,52	0	0	0	0	-
<i>P. sajor-caju</i> F6 ativo	31,57	26,31	5,26	0	0	83,61
<i>P. sajor-caju</i> F6 inativo	57,89	21,05	5,26	15,78	0	43,39
<i>P. ostreatus</i> ativo	0	0	0	0	0	-
<i>P. ostreatus</i> inativo	5,26	0	0	0	0	-

Tabela 26 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o efluente inoculado com as linhagens de *Pleurotus* ativas e inativadas

Tratamentos	Concentração (%)					CI ₅₀
	50	25	12,5	6,25	3,125	
Controle	43,9	12,12	20,07	13,63	14,39	53,69
<i>P. sajor-caju</i> F2 ativo	0	0	0	0	0	NI
<i>P. sajor-caju</i> F2 inativo	46,21	8,71	0	9,09	18,18	52,13
<i>P. sajor-caju</i> F6 ativo	0	0	0	0	0	NI
<i>P. sajor-caju</i> F6 inativo	29,54	0	0,75	0	9,8	66,35
<i>P. ostreatus</i> ativo	0	0	0	0	0	NI
<i>P. ostreatus</i> inativo	34,09	6,06	13,63	7,57	15,90	62,73

2.2.3.4.3 Produção de enzimas

Foram detectadas a presença das enzimas manganês peroxidase e lacase na presença das linhagens de *Pleurotus* estudadas, enquanto a enzima lignina peroxidase não foi produzida, conforme também já verificado na literatura (RODRÍGUEZ; PICKARD; VAZQUEZ-DUHALT, 1999).

Na presença do efluente, as linhagens de *P. sajor-caju* F2 e F6 produziram mais enzima lacase que manganês peroxidase, principalmente *P. sajor-caju* F6, enquanto *Pleurotus ostreatus* produziu mais manganês peroxidase e pouca lacase. *P. sajor-caju* F6 apresentou a maior produção de lacase, cerca de 2,24 U.l⁻¹ (Tabela 27).

As enzimas foram avaliadas somente ao final do período de incubação, após 24 dias de crescimento fúngico, período onde a produção de enzimas já apresenta decaimento devido ao envelhecimento da cultura. Platt et al. (1985) encontrou produção de lacase somente até 12 dias de crescimento, embora extratos da cultura aos 21 dias continuaram degradando o corante.

Segundo Duran e Esposito (1997), a maior produção de enzimas ligninolíticas ocorre a pHs baixos e o pH do efluente estava próximo ao neutro. A composição do meio também influencia a produção de enzimas, segundo Levin; Papinutti e Forchiassin (2004). Outro fator que favorece a produção destas enzimas é a adição de fonte de lignina, como o bagaço de cana.

Tabela 27 - Atividade das enzimas manganês peroxidase, lacase e lignina peroxidase dos fungos basidiomicetos na presença do efluente após 30 dias de incubação

Tratamentos	Manganês	Lacase	Lignina	Total
	Peroxidase		Peroxidase	
	U l ⁻¹			
Controle	0,0008	0,0128	0	0,0136
<i>P. sajor-caju</i> F2	0,3119	0,5239	0	0,8358
<i>P. sajor-caju</i> F6	0,3957	2,2427	0	2,6384
<i>P. ostreatus</i>	0,7538	0,0264	0	0,7802

2.2.3.4.4 Degradação do lodo têxtil pelos fungos basidiomicetos

2.2.3.4.4.1 Avaliação da descoloração por refletância

As linhagens de *P. sajor-caju* F2 e F6 foram capazes de descolorir o lodo, enquanto *P.ostreatus* apresentou menor descoloração após 30 dias de incubação. As leituras da refletância mostraram maior refletividade na presença destes fungos em relação ao controle, indicando o clareamento deste resíduo (Tabela 28). Houve diferença significativa entre os fungos *P. sajor-caju* F2 e F6 e o controle para o parâmetro “a” e entre o fungo *P. sajor-caju* F2 e controle para o parâmetro “b”. Para o parâmetro “L” não houve diferença significativa.

O fungo *P. ostreatus* apresentou crescimento mais lento que as demais linhagens na presença do lodo.

Tabela 28 - Refletância do lodo tratado por 30 dias com as linhagens de *Pleurotus*

Tratamentos	Refletância		
	L	a	b
Controle	24,01 a	2,40 ab	5,73 ab
<i>P. sajor-caju</i> F2	27,03 a	3,99 a	11,53 a
<i>P. sajor-caju</i> F6	28,11 a	3,75 a	10,21 ab
<i>P. ostreatus</i>	23,16 a	1,85 b	4,31 b

a: Colunas seguidas pela mesma letra não diferiram pelo Teste de Tukey ao nível de 5 %.

2.2.3.4.4.2 Testes de toxicidade com o lodo têxtil

Foi detectado aumento de toxicidade (efeito sub-letal) após o tratamento do lodo com as linhagens de *Pleurotus* sobre o organismo *Hydra attenuata* (Tabela 29). A linhagem *P. sajor-caju* F6 foi o tratamento que apresentou maior aumento na toxicidade. A letalidade, no entanto, foi reduzida após tratamento com *P. sajor-caju* F2 e *P. ostreatus*, indicando a formação de metabólitos de menor toxicidade aguda. No caso de *P. sajor-caju* F6 houve aumento na letalidade.

Tabela 29 - Valores de NOEC e LOEC para o lodo tratado com as linhagens de *Pleurotus*

Tratamentos	Letal		Sub-letal	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
Controle	12,5	25	12,5	25
<i>Pleurotus sajor-caju</i> F2	25	50	6,25	12,5
<i>Pleurotus sajor-caju</i> F6	6,25	12,5	3,125	6,25
<i>Pleurotus ostreatus</i>	50	100	6,25	12,5

No teste com a alga *Selenastrum capricornutum* foi detectada inibição de 31,95% para o controle na concentração de 100% do efluente, enquanto nas outras diluições não houve inibição. Para *P.ostreatus* a inibição na concentração de 100% foi reduzida para 10,86%, enquanto para *P. sajor-caju* F2 não foi detectada inibição em nenhuma concentração para este organismo. Para *P. sajor-caju* F6 houve ligeiro aumento na toxicidade, sendo que na concentração de 100% a inibição foi de 40,21% (Tabela 30).

Avaliando o efeito sobre a germinação das sementes, houve maior inibição sobre a germinação após tratamento com os fungos *Pleurotus sajor-caju* F2 e F6 (Tabela 31), com CI_{50} de 50 e 73,70%, respectivamente.

Avaliando o crescimento das radículas, houve redução na CI_{50} para todos os tratamentos com relação ao controle, sendo que o aumento na toxicidade foi de acima de 50% para F2 e cerca de 27 % para *P. ostreatus*. Para F6, o aumento na toxicidade foi cerca de 8% (Tabela 32).

Tabela 30 - Porcentagem de inibição sobre a alga *Selenastrum capricornutum* para o lodo tratado com as linhagens de *Pleurotus*

Tratamentos	Concentração (%)				
	100	50	25	12,5	6,25
Controle	31,95	0	0	0	0
<i>P. sajor-caju</i> F2	0	0	0	0	0
<i>P. sajor-caju</i> F6	40,21	33,69	4,34	0	0
<i>P. ostreatus</i>	10,86	0	0	0	0

O lodo concentra maior quantidade de corantes insolúveis que são removidos durante o processo de decantação do efluente. Estes corantes provavelmente possuem estrutura mais complexa e maior resistência à degradação pelos fungos estudados.

Tabela 31 - Inibição sobre a germinação das sementes após tratamento do lodo com as linhagens de *Pleurotus*

Tratamentos	Concentração (%)					CI ₅₀
	100	50	25	12,5	6,25	
Controle	30	0	5	5	5	-
<i>P. sajor-caju</i> F2	75	50	0	0	0	50
<i>P. sajor-caju</i> F6	70	25	0	5	0	73,70
<i>P. ostreatus</i>	5	5	15	0	10	-

Tabela 32 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o lodo tratado com as linhagens de *Pleurotus*

Tratamentos	Concentração (%)					CI ₅₀
	100	50	25	12,5	6,25	
Controle	52,69	6,5	0	0	0	96,67
<i>P. sajor-caju</i> F2	66,95	61,70	35,41	20,40	5,75	40,83
<i>P. sajor-caju</i> F6	52,69	35,41	20,77	0	5,38	88,19
<i>P. ostreatus</i>	63,20	30,91	30,91	2,0	0	69,48

2.2.3.4.4.3 Produção de enzimas

Na presença do lodo têxtil, *P. ostreatus* produziu maior quantidade da enzima lacase (8,008 U.l⁻¹), produzindo também significativamente manganês peroxidase (3,7219 U l⁻¹). Apesar disto, o fungo mostrou pouca descoloração do lodo, indicando que a produção de enzimas pode não ser o único fator envolvido na degradação dos compostos estudados, havendo outros processos envolvidos.

P. sajor-caju F2, o qual foi o mais eficiente em remover a cor do lodo, produziu principalmente a enzima manganês peroxidase (2,361 U l⁻¹), e insignificante quantidade de lacase. *P.sajor-caju* F6 produziu ambas manganês peroxidase e lacase (Tabela 33).

Tabela 33 - Atividade das enzimas manganês peroxidase, lacase e lignina peroxidase pelos fungos Basidiomicetos na presença do lodo têxtil

Tratamentos	Manganês	Lacase	Lignina	Total
			U l ⁻¹	
Controle	0	0	0	0
<i>P. sajor-caju</i> F2	2,3617	0,2931	0	2,6548
<i>P. sajor-caju</i> F6	2,7653	2,5550	0	5,3153
<i>P. ostreatus</i>	3,7219	8,0085	0	11,7304

2.2.3.4.4.4 Carbono Orgânico Total

Foi detectada variação no teor de carbono apenas para *P. ostreatus*, o qual apresentou redução do teor de carbono presente na amostra (Tabela 34). Este carbono pode ser resultado da degradação do lodo, da palhada ou de ambos. Os fungos *P. sajor-caju* F2 e F6, apesar de descolorirem o lodo, não foram capazes de mineralizá-lo. A descoloração resultou provavelmente da quebra da molécula, provavelmente do grupo cromóforo, porém houve a formação de compostos secundários que não foram posteriormente degradados até CO₂.

Não houve alteração no teor de nitrogênio total, podendo este ter sido apenas incorporado na biomassa fúngica. A relação C/N permaneceu inalterada após o período de incubação, indicando pouca transformação do substrato para compostos voláteis (Tabela 34).

Tabela 34 - Teor de Carbono Orgânico Total, Nitrogênio total e relação C/N do resíduo sólido após incubação a 28°C, por trinta dias

Tratamentos	Carbono Total	Nitrogênio Total	Relação C/N
	%		
Controle	29,13 ab	2,36 a	12,40 a
<i>P. sajor-caju</i> F2	29,07 ab	2,42 a	12,00 a
<i>P. sajor-caju</i> F6	30,35 a	2,42 a	12,53 a
<i>P.ostreatus</i>	28,00 b	2,54 a	11,00 a

a: Colunas seguidas pela mesma letra não diferiram pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

2.2.3.4.4.5 Análise de metais pesados e outros cátions

Foram encontrados teores muito próximos de metais pesados e outros íons após o tratamento, embora os teores de Cu, Zn, Mn, Cr, Ni, V, Pb, Ba e Mo tenham aumentado após a incubação na presença dos fungos (Tabela 35 e 36). No caso de *P. ostreatus* este aumento pode ter resultado da concentração em relação ao total de massa seca, já que o teor de carbono foi reduzido.

Os fungos foram capazes de crescer rapidamente sobre o lodo. Agdag e Sponza (2005) observaram inibição na degradação de lodo industrial na presença de metais, porém misturando-se estes resíduos com a água residuária observou-se aumento na degradação.

Os teores de metais pesados não ultrapassaram os limites recomendados pela CETESB (1999), de acordo com a norma EPA CFR 40 part 503, para uso agrícola, o que significa que este resíduo pode ser usado na agricultura in natura ou após tratamentos como a compostagem, a qual melhora suas características físico-químicas.

Tabela 35 - Porcentagens de elementos presentes no lodo tratado com as linhagens de *Pleurotus*

Tratamentos	S	P	K	Ca	Mg	Al	Na	Fe
Controle	0,871	0,359	0,234	0,813	0,195	2,04	0,070	1,403
<i>P. sajor-caju</i> F2	0,978	0,406	0,263	0,97	0,260	1,80	0,081	1,42
<i>P. sajor-caju</i> F6	1,074	0,466	0,314	1,034	0,265	1,80	0,115	1,693
<i>P. ostreatus</i>	0,977	0,492	0,318	0,97	0,270	1,93	0,074	1,56

Tabela 36 - Teores ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de microelementos presentes no lodo tratado com as linhagens de *Pleurotus*

Tratamentos	Cu	Zn	Mn	B	Cd	Cr	Ni	Co	Sr	V	Pb	Ba	Mo
Controle	208,1	639,0	159,3	< 4	1,11	520,0	274,0	11,3	51,7	45,5	42,3	259,0	7,5
<i>P. sajor-caju</i> F2	226,9	653,0	126,1	< 4	1,02	611,0	315,0	11,6	36,7	47,1	40,0	275,0	8,7
<i>P. sajor-caju</i> F6	271,0	630,0	125,0	< 4	0,85	585,0	322,0	12,4	44,9	55,0	48,3	321,0	7,9
<i>P. ostreatus</i>	232,1	681,0	172,9	< 4	1,04	567,0	297,0	11,3	45,6	47,8	41,3	266,0	8,6

2.2.3.4.5 Análise em microscopia eletrônica

Foram observadas na análise ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) regiões com sintomas de toxicidade para o fungo *P. sajor-caju* F6 crescido sobre o efluente, as quais não apareceram no tratamento controle. Este fungo apresentou sinais de danos nas hifas, com regiões de necrose e foi o fungo mais sensível ao efluente (Figura 4). Também na análise por microscopia de transmissão foram observados sintomas de toxicidade para este fungo, com rompimento e desagregação das células.

Foram observados na análise por microscopia de transmissão (MET) efeitos diferentes para *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* F2 na presença do efluente. *P. sajor-caju* F2 apresentou aumento no número de vesículas, as quais podem ser responsáveis pelo armazenamento dos produtos dentro da célula (Figuras 3d). O simples armazenamento não significa que o fungo esteja degradando o produto, pode estar havendo apenas destoxificação do meio, ou seja, remoção e acúmulo dentro da célula. Também poderia estar ocorrendo armazenamento de sub-produtos da degradação enzimática, já que as enzimas ligninolíticas presentes nestes fungos são extracelulares. No fungo *P. ostreatus* foi observada a presença de mitocôndrias (Figura 5d) indicando um aumento do metabolismo celular na presença do efluente, que pode estar associado aos processos de degradação, transporte ativo do corante para dentro da célula ou ao stress causado pela presença de substâncias tóxicas para o fungo. Observou-se também que a membrana plasmática estava afastada da parede celular em algumas regiões, o que pode significar efeito tóxico do corante sobre as células (Figura 5d). Neste mesmo fungo, observou-se também a presença de organelas em forma de túbulos, os quais apareceram em maior número e tamanho no efluente que no tratamento controle (Figura 5). Estas organelas podem estar relacionadas com processos de transporte, digestão e armazenamento dentro da célula. Não foi observado a presença de vesículas em *P. ostreatus*.

a.

b.

c.

d.

Figura 3 - *Pleurotus sajor-caju* F2: a. controle MEV (1000x); b. controle MET; c. efluente MEV (1000x); e d. efluente MET

a.

b.

c.

d.

Figura 4 - *Pleurotus sajor-caju* F6: a. controle MEV (1000x); b. controle MET; c. efluente MEV (1000x); e d. efluente MET

Figura 5 - *Pleurotus ostreatus*: a. controle MEV (1000x); b. controle MET; c. efluente MEV (1000x); e d. efluente MET

2.2.3.5 Degradação do efluente em meio anaeróbio e anaeróbio + aeróbio

2.2.3.5.1 Descoloração do efluente

Houve descoloração do efluente após a incubação em meio anaeróbio (Tabela 39), indicando a presença de organismos no efluente capazes de reduzir as moléculas de corantes, promovendo a quebra do grupo cromóforo. A incubação posterior em meio aeróbio resultou em leituras de absorvância menores provavelmente pelo consumo das substâncias orgânicas residuais que resultou em uma maior clarificação do meio.

Tabela 37 - Porcentagem de descoloração do efluente em meio anaeróbio e anaeróbio + aeróbio

Tratamentos	Descoloração (%)	
	583 nm	680 nm
Anaeróbio	15,58	17,39
Anaeróbio + Aeróbio	32,46	32,60

2.2.3.5.2 Testes de Toxicidade

No teste com *Hydra attenuata* não foram detectadas diferenças na toxicidade antes e após o tratamento anaeróbio (Tabela 40), mostrando que embora não tenha havido redução na toxicidade, a degradação do efluente não resultou em formação de metabólitos mais tóxicos que as molécula originais, como é sugerido na literatura em condições anaeróbias (MEYER, 1978).

Quando após o tratamento anaeróbio os frascos foram reaerados, houve redução na toxicidade com relação ao controle, o que indica que houve uma metabolização aeróbia dos metabólitos formados durante o processo anaeróbio que resultou em redução na toxicidade.

Tabela 38 - Valores de NOEC e LOEC (letal e sub-letal) para o efluente tratado anaeróbiamente e tratado anaeróbia+aeróbiamente sobre *Hydra attenuata*

Tratamentos	Letal		Sub-letal	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
Controle	12,5	25	12,5	25
Anaeróbio	12,5	25	12,5	25
Aeróbio + anaeróbio	50	100	50	100

A mesma tendência foi verificada no teste com a alga *Selenastrum capricornutum*, onde foram obtidos valores parecidos para a CI_{50} no controle e tratamento anaeróbio, 73,35 e 70,39%, respectivamente, enquanto para o tratamento anaeróbio + aeróbio a toxicidade foi reduzida não se obtendo 50% de inibição sobre os organismos em nenhuma concentração (Tabela 41).

Porém, o teste de germinação de sementes indicou pequena inibição sobre o crescimento das radículas com o tratamento anaeróbio e anaeróbio + aeróbio (Tabela 42).

Tabela 39 - Porcentagem de inibição sobre a alga *Selenastrum capricornutum* para o efluente tratado anaerobicamente e anaeróbia + aerobicamente

Tratamentos	Concentração (%)					CI ₅₀
	100	50	25	12,5	6,25	
Controle	75,56	19,17	13,53	0	0	73,35
Anaeróbio	67,10	33,27	11,65	0	0	70,39
Anaeróbio + aeróbio	38,90	22,93	0	0	0	-

Tabela 40 - Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o efluente tratado anaerobicamente e anaeróbia+aerobicamente

Tratamentos	Concentração (%)				
	100	50	25	12,5	6,25
Controle	0	0	0	0	0
Anaeróbio	11,80	14,24	3,22	0	0
Anaeróbio + aeróbio	10,70	2,04	0	0	0

2.2.3.6 Degradação do corante índigo em Bioreator pela cianobactéria *Phormidium*

2.2.3.6.1 Descoloração do índigo

Houve descoloração completa do corante índigo pela cianobactéria *Phormidium* após 19 dias de incubação. Durante os primeiros 14 dias observou-se principalmente o crescimento e estabelecimento da cultura, formando um biofilme aderido à superfície do bioreator. Após este período, a degradação ocorreu rapidamente e o corante foi degradado em apenas 5 dias (Figura 6 e 7). Durante o processo houve adsorção dos corantes às células, a qual foi lentamente sendo removida após a completa descoloração do meio.

Figura 6 - Bioreator inoculado com a cianobactéria *Phormidium* após 16 dias de incubação

Figura 7 - Porcentagem de descoloração do corante índigo em Bioreator por *Phormidium*

2.2.3.6.2 Descoloração do índigo em diferentes soluções de nutrientes

A descoloração do corante índigo foi influenciada pela presença ou ausência de alguns nutrientes, principalmente nitrogênio. Nas soluções contendo todos os nutrientes, como as soluções B e C, ou de macronutrientes houve descoloração completa do meio. A solução A, que não continha nitrogênio, apresentou degradação significativamente menor, mostrando que o nitrogênio é um nutriente essencial para a degradação e exigido em grandes quantidades, considerando que o índigo já continha em sua molécula dois átomos de nitrogênio. Na solução C, a qual contém alta relação N:P, a degradação foi mais rápida que na solução B, com baixa relação N:P. A degradação na solução NPK foi menor que na solução contendo todos os macronutrientes, indicando que o magnésio, cálcio e enxofre também têm importante papel na degradação. As soluções contendo NP, somente P ou N apresentaram descoloração apenas parcial do corante, sendo que na presença de somente N a degradação foi maior que na presença só de P (Figura 8 e Tabela 41).

Tabela 41 - Porcentagens de degradação do índigo por *Phormidium* em meios de cultura contendo um ou mais nutrientes

Tratamento	Degradação (%)		
	7	14	21
	Dias		
Controle escuro	0	0	0
Controle luz	0	0	0
Índigo	5	50	86,14
Solução A	42,5	85,65	92,4
Solução B	63,5	99,47	99,19
Solução C	72,5	100	99,53
Macronutrientes	71,5	99,63	99,72
NPK	76,5	93,0	90,9
NP	76,5	97,15	95,55
N	31,5	97,5	96,73
P	61	83,5	91,75

Figura 8 - Descoloração do índigo nos diferentes meios de cultura (na ordem): Controle Escuro, Controle luz, Índigo, Solução A, Solução B, Solução C, macronutrientes, NPK, NP, N e P

Tabela 42 - Crescimento da *Phormidium* em meios de cultura contendo um ou mais nutrientes

Tratamentos	Crescimento
Controle escuro	-
Controle luz	-
Índigo	++++
Solução A	++
Solução B	+++++
Solução C	+++++
Macronutrientes	+++++
NPK	+++
NP	+++
N	++
P	++++

O crescimento das cianobactérias nos diferentes meios testados foi avaliado visualmente, e observou-se que o crescimento foi maior nos meios mais ricos em nutrientes onde houve maior degradação, como a solução B e C e meio de macronutrientes. Porém, observou-se crescimento significativo nos meios contendo somente índigo e somente P, onde a descoloração foi menor, indicando que embora a cianobactéria tenha estado presente nestes meios, ela não produziu as enzimas necessárias para degradar o corante (Tabela 42). A maioria das enzimas contém em sua molécula elementos como Cobre, Ferro, Manganês e outros e a ausência destes elementos no meio pode limitar sua produção.

2.2.3.6.3 Teste de toxicidade com *Hydra*

Nas análises de toxicidade feitas com *Hydra attenuata* não foram detectados efeitos tóxicos antes e após o tratamento. O corante índigo na concentração testada (0,02%) mostrou não ser tóxico. Os testes realizados com amostras coletadas aos 2, 4, 7, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 dias de incubação não apresentaram toxicidade, mostrando que não houve formação de metabólitos tóxicos em nenhuma fase do tratamento.

2.2.3.6.4 Teste de Mutagenicidade com *Allium cepa*

Foram encontradas algumas anormalidades na presença do corante índigo e da cianobactéria *Phormidium*, porém em taxas inferiores às encontradas no branco (água mineral). No branco, a anormalidade mais comum encontrada foram os micronúcleos, enquanto na presença do índigo e após o tratamento com *Phormidium* apareceram maior número de aderências, pontes, atrasos cromossômicos e células poliplóides (Figuras 9, 10 e 11).

O índice de mutagenicidade e o número de micronúcleos foram menores para o corante que para o branco e, na presença da cianobactéria, ambos foram iguais a zero (Tabela 43). Anormalidades como aderências, poliploidia e atrasos cromossômicos são considerados indícios de mutagenicidade, porém não são considerados no cálculo de mutagenicidade.

O índice mitótico foi maior no índigo e com a cianobactéria que no branco, indicando maior crescimento de raízes nestes tratamentos (Tabela 43). Provavelmente o maior crescimento nestes tratamentos ocorreu porque tanto o controle (índigo) quanto o tratamento com as cianobactérias foram preparados com o meio de cultura BG-11, muito rico em nitrogênio e fósforo.

As raízes da cebola, devido à presença do corante índigo, adquiriram coloração azulada, que também pôde ser visualizada em algumas lâminas analisadas (Figura 10).

Tabela 43 - Índices Mitótico, de Micronúcleos e de Mutagênicidade e anormalidades mais comuns em amostras expostas ao corante índigo 0,02% e o mesmo tratado com *Phormidium*

Tratamentos	Índice (%)			
	Mitótico	Micronúcleos	Mutagênicidade	Anormalidades
Branco	37,18	0,48	0,48	-
Índigo	51,29	0,17	0,22	Aderência, pontes, atraso cromossômico
<i>Phormidium</i>	53,08	0	0	Poliploidia, aderência, atraso cromossômico

Figura 9 - Branco: Micronúcleos

Figura 10 - Índigo: a. Micronúcleos; b. ponte cromossômica; c. atraso cromossômico e d. aderência

Figura 11 - *Phormidium*: a. aderência; b. atraso cromossômico e c. poliplóide

2.2.3.6.5 Análise dos metabólitos

O corante índigo esteve presente no meio de cultura até o décimo oitavo dia de cultivo, diminuindo sua concentração a partir do décimo quarto dia. No décimo nono dia não foi mais detectado, portanto foi totalmente transformado pela cianobactéria *Phormidium* sp. Concomitantemente ao desaparecimento do índigo, dois outros metabólitos foram formados, sendo visíveis a partir do décimo sétimo dia de incubação e identificados como ácido antranílico (m/z 399) e isatin ou índole-2,3-dione (m/z 421). Os mesmos metabólitos foram documentados anteriormente por Campos et al. (2001) na presença da enzima lacase produzida por *Trametes hirsuta*.

A principal via da degradação do corante índigo é a clivagem da ligação dupla central produzindo como metabólito o isatin, o qual pode sofrer descarboxilação e formar o ácido

antranílico. O ácido antranílico foi detectado a partir do dia 17 e o isatin a partir do dia 18, indicando que o sub-produto intermediário isatin é rapidamente convertido a ácido antranílico pela cultura. Ao final do período de incubação, estes dois metabólitos ainda foram detectados, indicando que eles não foram totalmente degradados durante o período estudado. Na figura 12 é sugerido um esquema da degradação do índigo por *Phormidium* sp., conforme sugerido por Campos et al. (2001).

Figura 12 - Passos da degradação do Índigo

2.3 Considerações Finais

- A planta raiz-forte foi capaz de descolorir os corantes técnicos, efluente e resíduo sólido. Porém, após tratamento com a planta houve um significativo aumento na toxicidade pela produção de compostos oriundos da degradação dos corantes ou causada por substâncias inibitórias presentes na própria planta, como os alcalóides.

- O tratamento aeróbio aplicado posteriormente à planta raiz-forte não foi capaz de remover a toxicidade residual causada pela planta.

- A bactéria *Acinetobacter johnsonii* não foi capaz de descolorir os corantes técnicos e resíduos estudados.

- *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus ostreatus* foram capazes de descolorir completamente os corantes técnicos índigo, RBBR e preto-enzofre. O resíduo sólido foi descolorido na presença dos fungos *Pleurotus sajor-caju* F2 e F6, e não de *Pleurotus ostreatus*.

- *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* foram capazes de reduzir a toxicidade do efluente. Houve aumento na toxicidade quando as linhagens de *Pleurotus* foram aplicadas ao lodo. O efluente deve conter menor quantidade de corantes hidrofóbicos e insolúveis de difícil degradação do que o resíduo sólido, os quais seriam principalmente removidos no decantador.

- No caso do fungo *P. ostreatus* a produção da enzima lacase e manganês peroxidase não resultou em descoloração do resíduo sólido, indicando a presença de outros fatores controladores da descoloração. Este fungo apresentou redução no teor de carbono, no entanto não é possível distinguir se este carbono foi proveniente do resíduo sólido ou da palhada da cana.

- *Pleurotus sajor-caju* F2 apresentou a formação de vesículas dentro da célula, o que pode significar que a descoloração pode estar associada com o armazenamento de produtos e destoxificação do meio. A possibilidade de processos intracelulares estarem envolvidos na degradação, além da ação de enzimas extracelulares, deve ser considerada. A presença de vesículas também pode indicar a absorção de metabólitos produzidos pelas enzimas extracelulares.

- *Pleurotus sajor-caju* F6 mostrou ser sensível às substâncias presentes no efluente, apresentando sintomas de toxicidade com rompimento de membranas e células, quando observado sob microscopia eletrônica.

- *P. ostreatus* apresentou um aumento no número de mitocôndrias, o que pode significar um aumento no metabolismo celular e também foi observada a presença de microtúbulos, que são estruturas relacionadas com transporte de substâncias, digestão e armazenamento. Não foram observadas vesículas indicando um metabolismo diferencial em relação a *P. sajor-caju* F2.

- A combinação de sistema anaeróbio e aeróbio mostrou ser eficiente em remover a cor e toxicidade, indicando que estes compostos, por serem muito complexos, necessitam da presença de mais de um grupo de microrganismos para que ocorra a degradação.

- As cianobactérias foram capazes de descolorir e reduzir a toxicidade do efluente, mas foram pouco eficientes na descoloração do resíduo sólido, não sendo capazes de degradar os corantes adsorvidos.

- A cianobactéria *Phormidium* foi capaz de descolorir completamente o corante índigo em Bioreator. Porém, foram detectados dois metabólitos formados durante a degradação, o ácido antranílico e o isatin, os quais não haviam sido degradados ao final do período de incubação. Não foram detectados efeitos tóxicos ou mutagênicos durante o tratamento, mostrando que o tratamento é capaz de remover a cor sem a formação de compostos tóxicos.

- Os resultados mostraram que os organismos estudados apresentam potencial para degradação dos corantes técnicos. O tratamento do efluente utilizando os organismos foi eficiente para descoloração e toxicidade. A descoloração do resíduo sólido mostrou ser possível utilizando os fungos Basidiomicetos e a planta raiz-forte, porém a toxicidade aumentou mostrando que a degradação deve ser estimulada por mais tempo ou é necessário o uso conjunto de outros organismos ou outras metodologias, como por exemplo, a compostagem.

- Efluentes têxteis, devido à sua elevada complexidade, não são facilmente degradados por um único tratamento ou organismo. Para a completa degradação dos diversos componentes presentes no efluente, recomenda-se a combinação de mais de um tratamento, sendo que no primeiro a degradação seria iniciada através de modificações na molécula que as tornassem mais facilmente biodegradáveis pelas reações catabólicas mais comuns realizadas por microrganismos menos especializados.

Referências

- ABRAHÃO, A.J.; SILVA, G.A. Influência de alguns contaminantes na toxicidade aguda de efluentes da indústria têxtil. **Química Têxtil**, Barueri, v. 67, p. 8-34, 2002.
- ACUNER, E.; DILEK, F.B. Treatment of Tectilon Yellow 2G by *Chlorella vulgaris*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 623-631, 2004.
- AGDAG, O.N.; SPONZA, D.T. Co-digestion of industrial sludge with municipal solid wastes in anaerobic simulated land filling reactors. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1871-1879, 2005.
- ALLEN, M.B. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 4, p. 1-4, 1968.
- ALLEN, M.M.; ARNON, D.I. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I – Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 30, p. 366-372, 1955.
- ARSLAN-ALATON, I. The effect of pre-ozonation on the biocompatibility of reactive dye hydrolysates. **Chemosphere**, Oxford, v. 51, p. 825-833, 2003.
- ASTHANA, R.K.; CHATTERJEE, S.; SINGH, S. P. Investigations on nickel biosorption and its remobilization. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 729-734, 1995.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. Porto Alegre: Ed. Bookman, 2002. 622 p.
- BALAN, D.S.L. A indústria têxtil e o meio ambiente – Tecnologia limpa e controle ambiental. **Química Têxtil**, Barueri, v. 66, p. 26-31, 2002.
- BALAN, D.S.L.; MONTEIRO, R.T.R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 89, p. 141-145, 2001.
- BANAT, I.M.; NIGAM, P.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R. The isolation of thermophilic bacterial cultures capable of textile dyes decolorization. **Environmental International**, New York, v. 23, p. 547-551, 1997.
- BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 58, p. 217-227, 1996.

- BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANIKAR, P.P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 72, p. 562-567, 2001.
- BLAISE, C.; FORGET, G.; TROTTIER, S. Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-H exposure *Selenastrum capricornutum* assay. **Technical Methods**, Ontario, v. 15, n. 4, p. 352-359, 2000.
- BLÜMEL, S.; CONTZEN, M.; LUTZ, M.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.J. Isolation of a bacterial strain with the ability to utilize the sulfonated azo compound 4-carboxy-4'-sulfoazobenzene as the sole source of carbon and energy. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 2315-2317, 1998.
- BOLLAG, J.M. Decontaminating soil with enzymes. **Environmental Science & Technology**, New York, v. 26, p. 1876-1881, 1992.
- BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 1993. 764 p.
- BRÁS, R.; DIAS, J.; REGO, G.; BAPTISTA, N.; GONÇALVES, I.C.; USSMAN, M.H. Degradação de corantes azo por processos biológicos. **Química Têxtil**, Barueri, n. 68, p. 5-10, 2002.
- BROWN, D.; HAMBURGER, B. The degradation of dyestuffs: Part III – Investigations of their ultimate degradability. **Chemosphere**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 1539-1553, 1987.
- BROWN, J.P. Reduction of polymeric azo and nitro dyes by intestinal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 41, p. 1283-1286, 1981.
- BUITRÓN, G.; QUEZADA, M.; MORENO, G. Aerobic degradation of the azo dye Acid Red 151 in a sequencing batch biofilter. **Bioresource Technology**, Essex, v. 92, p. 143-149, 2004.
- BUMPUS, J.A. Microbial degradation of azo dyes. In: SINGH, V. P. **Biotransformations: microbial degradation of health risk compounds**. New York: Elsevier Science, 1995. p. 157-177.
- BUMPUS, J.A.; BROCK, B.J. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 54, p. 1143-1150, 1988.

- CAMPOS, R.; KANDELBAUER, A.; ROBRA, K.H.; CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G.M. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 89, p. 131-139, 2001.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas**. Critérios para projetos e operação. São Paulo: CETESB, 1999. 32 p.
- CHANG, J.; CHOU, C.; CHEN, S. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 757-763, 2001.
- CHEN, B.Y. Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 437-446, 2002.
- CHEN, K.C.; WU, J.Y.; LIOU, D.J.; HWANG, S.C.J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 101, p. 57-68, 2003.
- CHIVUKULA, M.; RENGANATHAN, V. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, n. 12, p. 4374-4377, 1995.
- CLARK, E. Corantes e o meio ambiente – Guia para usuários. **Química Têxtil**, Barueri, n. 28, p. 2231, 1995.
- CONNELLY, A.; SMYTH, W.F.; McMULLAN, G. Study of the white-rot fungal degradation of selected phthalocyanine dyes by capillary electrophoresis and liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 451, p. 259-270, 2002.
- COUGHLIN, M.F.; KINKLE, B.K.; BISHOP, P.L. Degradation of azo dyes containing aminonaphthol by *Sphingomonas* sp strain 1 CX. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, London, v. 23, p. 341-346, 1999.
- COUGHLIN, M.F.; KINKLE, B.K.; BISHOP, P.L. Degradation of acid orange 7 in an aerobic biofilm. **Chemosphere**, Oxford, v. 46, p. 11-19, 2002.
- CRIPPS, C.; BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, n. 4, p. 1114-1118, 1990.

DANGMANN, E.; STOLZ, A.; KUHM, A.E.; HAMMER, A.; FEIGEL, B.; NOISOMMIT-RIZZI, N. Degradation of 4-aminobenzenesulfonate by a two-species bacterial coculture.

Biodegradation, Dordrecht, v. 7, p.223-229, 1996.

DEC, J.; BOLLAG, J.M. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 44, p.1132-1139, 1994.

DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, p. 999-1003, 2004.

DEY, S.; MAITI, T.K.; BHATTACHARYYA, B.C. Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Plyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 60, n.11, p. 4216-4218, 1994.

DIELS, L. Heavy metal bioremediation of soil. In: SHEEHAN, D. **Bioremediation protocols**. Totowa: Ed. Humana Press, 1997. v. 2, 339 p.

DOMINGUEZ, A.; RIVELA, I.; COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on na inert support. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 549-554, 2001.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I. S. DE; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1997. 440 p.

DUTKA, B. **Short-term root elongation toxicity bioassay**. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. Ottawa: National Water Research Institute, Environment Canada, 1989. (NWRI. Publicação, VIII/120-VIII/122).

EKICI, P.; LEUPOLD, G. PARLAR, H. Degradability of selected azo dye metabolites in activated sludge systems. **Chemosphere**, Oxford, v. 44, p. 721-728, 2001.

FERREIRA-LEITÃO, V.S.; SILVA, J.G.; BON, E.P.S. Methylene Blue and Azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II and class III peroxidases.

Applied Catalysis B: Environmental, New York, v. 42, p. 213-221, 2003.

- FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewater: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 79, p. 251-262, 2001.
- GHOREISHI, S.M.; HAGHIGHI, R. Chemical catalytic reaction and biological oxidation for treatment of non-biodegradable textile effluent. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 95, p. 163-169, 2003.
- GIANFREDA, L.; BOLLAG, J.M. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 58, p. 1672-1681, 1994.
- GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 45, p. 1741-1747, 1983.
- GOTTLIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A.; FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 101, p. 49-56, 2003.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 71-78, 2000.
- HARAZONO, K.; NAKAMURA, K. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. **Chemosphere**, Oxford, v.59, p.63-68, 2005.
- HAUG, W.; SCHMIDT, A.; NORTEMANN, B.; HEMPEL, D.C.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.J. Mineralization of the sulfonated azo dye mordant yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, n. 11, p. 3144-3149, 1991.
- HE, F.; HU, W.; LI, Y. Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4BS by a microbial consortium. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, p. 293-301, 2004.
- HEINFLING, A.; MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, A.T.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, n. 8, p. 2788-2793, 1998.

- HEINFLING-WEIDTMANN, A.; REEMTSMA, T.; STORM, T.; SZEWZYK, U. Sulfophthalimide as major metabolite formed from sulfonated phthalocyanine dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 203, p. 179-183, 2001.
- ISIK, M.; SPONZA, D.T. Monitoring of toxicity and intermediates of C.I. Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. **Journal of Hazardous Materials**, New York, v. 114, p.29-39, 2004.
- JINQI, L.; HOUTIAN, L. Degradation of azo dyes by algae. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 75, p. 273-278, 1992.
- JONES, J.G.; EDINGTON, M.A. An ecologic survey of hydrocarbon oxidizing microorganisms. **Journal of Genetic Microbiology**, Bangor, v. 52, p. 381-390, 1968.
- KALAVATHI, D.F.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Degradation and metabolization of the pigment melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 29, p. 246-251, 2001.
- KAMIDA, H.M.; MONTEIRO, R.T.R.; ARMAS, E.D.; DURRANT, L.R. Avaliação da descoloração do corante índigo por *Pleurotus* spp. através do método de reflectância. **Biodegradação**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p. 295-297.
- KANDELBAUER, A.; GUBITZ, G.M. Current strategies for enzymatic and microbial treatments of textile effluents. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA TÊXTIL, 2001, Blumenau. **Anais...** Blumenau: Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química, 2001. p. 83-99.
- KAPDAN I. K.; KARGI, F.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 26, p. 381-387, 2000.
- KECK, A.; RAU, J.; REEMTSMA, T.; MATTES, R.; STOLZ, A.; KLEIN, J. Identification of quinoide redox mediators that are formed during the degradation of naphthalene-2-sulfonate by *Sphingomonas xenophaga* BN6. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 4341-4349, 2002.

- KHATTAR, J.I.S.; SARMA, T.A.; SINGH, D.P. Removal of chromium ions by agar immobilized cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* in a continuous flow bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 25 p. 564-568, 1999.
- KHEHRA, M.S.; SAINI, H.S.; SHARMA, D.K.; CHADHA, B.S.; CHIMNI, S.S. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. **Dyes and Pigments**, Daegu, v. 67, p. 55-61, 2005.
- KIRBY, N.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R. Decolourisation of na artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 17, p. 761-764, 1995.
- KNAPP, J.S.; NEWBY, P.S.; REECE, L.P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 17, p. 664-668, 1995.
- KUDLICH, M.; BISHOP, P.L.; KNACKMUSS, H.J.; STOLZ, A. Simultaneous anaerobic and aerobic degradation of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by immobilized cells from a naphthalenesulfonate-degrading mixed culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 46, p. 597-603, 1996.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 78-82, 2002.
- KURITZ, T.; WOLK, C.P. Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, n. 1, p. 234-238, 1995.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letter**, Amsterdam, 169, p. 247-250, 1984.
- LEVIN, L.; PAPINUTTI, L.; FORCHIASSIN, F. Evaluation of Argentinean white-rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 94, p. 169-176, 2004.
- LIBRA, J.A.; BORCHERT, M.; VIGELAHN, L.; STORM, T. Two stage biological treatment of a diazo reactive textile dye and the fate of the dye metabolites. **Chemosphere**, Oxford, v.56, p. 167-180, 2004.
- MANU, B.; CHAUDHARI, S. Decolorization of indigo and azo dye in semi continuous reactors with long hydraulic retention time. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1213-1221, 2003.

- MARTINS, M.A.M.; LIMA, N.; SILVESTRE, A.J.D.; QUEIROZ, M.J. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 967-973, 2003.
- MATSUNAGA, T.; TAKEYAMA, H.; NAKAO, T.; YAMAZAWA, A. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 70, p. 33-38, 1999.
- MÉNDEZ-PAZ, D.; OMIL, F.; LEMA, J.M. Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 36, p. 264-272, 2005.
- MESULAM, M.M. **Tracing neural connections with horseradish peroxidase**. New York: John Wiley, 1982. 251 p.
- MEYER, U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: BROWN, A.W.A. **Ecology of pesticides**. New York: John Wiley, 1978. 525 p.
- MOHAMED, Z.A. Removal of cadmium and manganese by a non-toxic strain of the freshwater cyanobacterium *Gloeotheca magna*. **Water Research**, Oxford, v. 35, n. 18, p. 4405-4409, 2001.
- MOHAN, S.V.; PRASAD, K.K.; RAO, N.C.; SARMA, P.N. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. **Chemosphere**, Oxford, v. 58, p. 1097-1105, 2005.
- MOLDES, D.; RODRÍGUEZ COUTO, S.; CAMESELLE, C.; SANROMÁN, M.A. Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. **Chemosphere**, Oxford, v. 51, p. 295-303, 2003.
- MONTEIRO, R.T.R.; RANZANI, M.R.T.C.; KAMIDA, H.M.; DURRANT, L.R. Mutagenicity and decolorization of textile industry sludge treated with *Pleurotus* spp. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON TOXICITY ASSESSMENT, 10., Quebec: Environment Canada, 2001. p. 36.
- NARRO, M.L.; CERNIGLIA, C.E.; BAALLEN, C.V.; GIBSON, D.T. Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, n. 4, p. 1351-1359, 1992a.

- NARRO, M.L.; CERNIGLIA, C.E.; BAALEN, C.V.; GIBSON, D.T. Evidence for an NIH shift in oxidation of naphthalene by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain JCM. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, n. 4, p. 1360-1363, 1992b.
- NIGAM, P.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 435-442, 1996.
- NORTEMANN, B.; BAUMGARTEN, J.; RAST, H.G.; KNACKMUSS, H.J. Bacterial communities degrading amino and hydroxynaphthalene-2-sulfonates. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 52, n. 5, p. 1195-1202, 1986.
- NYANHONGO, G.S.; GOMES, J.; GÜBITZ, G.M.; ZVAUYA, R.; READ, J.; STEINER, W. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Water Research**, Oxford, v. 36, p. 1449-1456, 2002.
- NYMAN, M.C.; NYMAN, A.K.; LEE, L.S.; NIES, L.F.; BLATCHLEY, E.R. 3,3-dichlorobenzidine transformation processes in natural sediments. **Environmental Science & Technology**, New York, v. 31, n. 4, p. 1068-1073, 1997.
- OLLIKKA, P.; ALHONMAKI, K.; LEPPANEN, V.; GLUMOFF, T.; RAIJOLA, T.; SUOMINEN, I. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, n. 12, p. 4010-4016, 1993.
- O'NEILL, C.; LOPEZ, A.; ESTEVES, S.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; WILCOX, S. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 53, p. 249-254, 2000.
- OROS, G.; CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E. Separation of the strength and selectivity of the microbiological effect of synthetic dyes by spectral mapping technique. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 185-193, 2003.
- PAGGA, U.; BROWN, D. The degradation of dyestuffs: Part II - Behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. **Chemosphere**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 479-491, 1986.

PAPINUTTI, V.L.; FORCHIASSIN, F. Modification of Malachite Green by Fomes sclerodermeus and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 231, p. 205-209, 2004.

PASTI-GRIGSBY, M.B.; PASZCZYNSKI, A.; GOSZZYNSKI, S.; CRAWFORD, D.L. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, n. 11, p. 3605-3613, 1992.

PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M.B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, R.L.; CRAWFORD, D.L. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, n. 11, p. 3598-3604, 1992.

PAZARLIOGLU, N.K.; UREK, R.O.; ERGUN, F. Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1923-1929, 2005.

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

PERALTA-ZAMORA, P.; KUNZ, A.; MORAES, S.G.; PELLEGRINI, R.; MOLEIRO, P.C.; REYES, J.; DURAN, N. Degradation of reactive dyes I. A comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical process. **Chemosphere**, Oxford, v. 38, p. 835-852, 1999.

PERALTA-ZAMORA, P.; PEREIRA, C.M.; TIBURTIUS, E.R.L.; MORAES, S.G.; ROSA, M.A.; MIUSSI, R.C.; DURÁN, N. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Applied Catalysis B: Environmental**, New York, v. 42, p. 131-144, 2003.

PLATT, M.W.; HADAR, Y.; CHET, H. The decolorization of the polymeric dye Poly-Blue (polyvinylamine sulfonate-anthraquinone) by lignin degrading fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, p. 394-396, 1985.

PORTER, J.J.; GOMES, A.C. The rejection of anionic dyes and salt from water solutions using a polypropylene microfilter. **Desalination**, Amsterdam, v. 128, p. 81-90, 2000.

RAGHUKUMAR, C.; D'SOUZA, T.M.; THORN, R.G.; REDDY, C.A. Lignin-modifying enzymes of *Flavodon flavus*, a basidiomycete isolated from a coastal marine environmental.

Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, v. 65, n. 5, p. 2103-2111, 1999.

RAJAGURU, P.; FAIRBAIRN, L.J.; ASHBY, J.; WILLINGTON, M.A.; TURNER, S.; WOOLFORD, L.A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J.A. genotoxicity studies on the azo dye direct red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleous test. **Mutation Research**, New York, v. 444, p. 175-180, 2000.

RAJAGURU, P.; KALAISELVI, K.; PALANIVEL, M.; SUBBURAM, V. Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 54, p. 268-273, 2000.

RAZO-FLORES, F.; LUIJTEN, M.; DONLON, B.A.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Complete biodegradation of the azo dye azodisalicylate under anaerobic conditions. **Environmental Science & Technology**, New York, v. 31, n. 7, p. 2098-2103, 1997.

RESS, N.B.; WITT, K.L.; XU, J.; HASEMAN, J.K.; BUCHER, J.R. Micronucleus induction in mice exposed to diazoaminobenzene or its metabolites, benzene and aniline: implications for diazoaminobenzene carcinogenicity. **Mutation Research**, New York, v. 521, p. 201-208, 2002.

ROBINSON, T.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAN, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative.

Bioresource Technology, Essex, v. 77, p. 247-255, 2001.

RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, New York, v. 38, p. 27-32, 1999.

RODRÍGUEZ-COUTO, S.; RIVELA, I.; MUÑOZ, M.R.; SANROMÁN, A. Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolourise Poly R-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, p. 159-164, 2000.

SALEM, V. Corantes na indústria têxtil. Uma Abordagem ecológica. **Química Têxtil**, Barueri, v. 28, p. 16-21, 1995.

SARNAIK, S.; KANEKAR, P. Biodegradation of methyl violet by *Pseudomonas mendocina* MCM B-402. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 52, p. 251-254, 1999.

SHAH, V. GARG, N.; MADAMWAR, D. An integrated process of textile dye removal and hydrogen evolution using cyanobacterium, *Phormidium valderianum*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 17, p. 499-504, 2001.

SHAUL, G.M.; HOLDSWORTH, T.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**, Oxford, v. 22, n. 1-2, p. 107-119, 1991.

SHU, H.Y.; HUANG, C.R. Degradation of commercial azo dyes in water using ozonation and UV enhanced ozonation process. **Chemosphere**, Oxford, v. 31, p. 3813-3825, 1995.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. **Microrganismos e processos biológicos do solo: Perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. 142 p.

SOJKA-LEDAKOWICZ, J.; KOPROWSKI, T.; MACHNOWSKI, W.; KNUDSEN, H.H. Membrane filtration of textile dyehouse wastewater for technological water reuse. **Desalination**, Amsterdam, v. 119, p. 1-10, 1998.

SPADARO, J.T.; RENGANATHAN, V. Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of disperse yellow 3 degradation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 312, p. 301-307, 1994.

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

SPONZA, D.T.; ISIK, M. Reactor performances and fate of aromatic amines through decolorization of Direct Black 38 dye under anaerobic/aerobic sequential. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 35-44, 2005a.

SPONZA, D.T.; ISIK, M. Toxicity and intermediates of C.I. Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2735-2744, 2005b.

STIBOROVÁ, M.; ASFAW, B.; ANZENBACHER, P. Activation of carcinogens by peroxidase: Horseradish peroxidase-mediated formation of benzenediazonium ion from a non-aminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I) and its binding to DNA. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 232, p. 387-390, 1988.

- SUPAKA, N.; JUNTONGJIN, K.; DAMRONGLERD, S.; DELIA, M L.; STREHAIANO, P. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 99, p. 169-176, 2004.
- SWAMINATHAN, K.; SANDHYA, S.; SOPHIA, A.C.; PACHHADE, K.; SUBRAHMANYAM, Y.V. Decolorization and degradation of H-acid and other dyes using ferrous-hydrogen peroxide system. **Chemosphere**, Oxford, v. 50, p. 619-625, 2003.
- SWAMY, J.; RAMSAY, J.A. Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 51, p. 391-396, 1999.
- SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, Albuquerque, v. 81, p. 234-240, 1989.
- TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H_2O_2 requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 81, p. 2280-2284, 1984.
- TONEGAWA, M.; DEC, J.; BOLLAG, J.M. Use of additives to enhance the removal of phenols from water treated with horseradish and hydrogen peroxide. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, p. 1222-1227, 2003.
- TONG, Z.; QINGXIANG, Z.; HUI, H.; QIN, L.; YI, Z. Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase. **Chemosphere**, Oxford, v. 34, p. 893-903, 1997.
- TROTTIER, S.; BLAISE, C.; KUSIN, T.; JOHNSON, E.M. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Technical Methods**, Ontario, v. 12, p. 265-271, 1997.
- UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; RECH, C.M.; SATO, M.I.Z.; CLAXTON, L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, Oxford, v. 54, p. 1589-1597, 2004.

U.S.EPA. **Standards for the use or disposal of sewage sludge**. Washington: EPA, 1996. 25 p. (Code of Federal Regulations 40 CFR Part 503).

VAN DER ZEE, F.P.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. **Chemosphere**, Oxford, v. 44, p. 1169-1176, 2001.

VAZOLLER, R.F. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável – Microbiologia e saneamento ambiental. In: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Microbiologia ambiental**. São Paulo: CETESB, 2001. 168 p.

VILLEGAS-NAVARRO, A.; RAMIREZ, Y.M.; SALVADOR, M.S.S.B.; GALLARDO, J.M. Determination of wastewater LC₅₀ of the different process stages of the textile industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 48, p. 56-61, 2001.

VYAS, B.R.M.; MOLITORIS, H.P. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue R. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 3919-3927, 1995.

WANG, Y. Solar photocatalytic degradation of light commercial dyes in TiO₂ suspension. **Water Research**, Oxford, v. 34, p. 990-994, 2000.

WANG, C.; YEDILER, A.; LIENERT, D.; WANG, Z.; KETTRUP, A. Ozonation of an azo dye C.I. Remazol Black 5 and toxicological assessment of its oxidation products. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 1225-1232, 2003.

WONG, Y.; YU, J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, Oxford, v. 33, p. 3512-3520, 1999.

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

3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SEDIMENTOS UTILIZANDO O TESTE LUMINOTOX

Resumo

O teste Luminotox foi desenvolvido recentemente e utiliza enzimas extraídas de plantas do sistema fotossintético para avaliar a toxicidade de amostras aquosas, a qual é estimada pelo decréscimo na emissão de fluorescência ligada aos fotossistemas I e II. Foram realizados testes utilizando 14 sedimentos de referência (National Water Research Institute, National Laboratory for Environmental Testing, Burlington, Ontário, Canadá) buscando estabelecer um protocolo para análise de sedimentos, comparando-se os resultados com o teste Microtox fase sólida. Foram testadas duas metodologias de exposição das enzimas às amostras, uma direta, onde as enzimas foram aplicadas diretamente nas amostras de sedimento diluídas a 10% (p/v) ou menos, e outra onde as enzimas foram aplicadas no elutriato (25% p/v ou menos) com tempo de exposição de 15 min. Foram encontradas correlações positivas ($P < 0.05$) para 13 sedimentos de referência entre os testes Luminotox com exposição direta e Microtox, mostrando que os dois testes possuem o mesmo modelo de resposta para sedimentos contendo diferentes contaminantes. A técnica de elutriato foi menos sensível que a de exposição direta, indicando que esta técnica é capaz de avaliar somente os contaminantes solúveis em solução aquosa. Em ensaios utilizando a técnica de exposição direta com 12 sedimentos naturais novamente foi obtida correlação positiva entre Luminotox e Microtox. Os testes indicam que Luminotox pode ser utilizado para avaliar também a toxicidade potencial de sedimentos.

Palavras-chave: Luminotox; Sedimentos; Enzimas; Fotossíntese; Toxicidade

Toxicity Assessment of reference and natural freshwater sediments with the Luminotox assay

Abstract

The LuminoTox test uses photosynthetic enzyme complexes (PECs) to measure toxic effect to photosynthetic system efficiency. When PECs are challenged with chemicals or complex samples that can interfere with transmission of chlorophyll fluorescence linked to Photosystems I and II reaction sites, a corresponding decrease in fluorescence emission results. LuminoTox testing of 14 Reference sediments (National Water Research Institute, National Laboratory for Environmental testing, Burlington, Ontario, Canada) was first undertaken for developing a protocol for sediment samples analysis. Two different procedures were used: a “solid phase assay” where PECs are in intimate contact with 10% wt/v or less of sediment slurries for a 15 min exposure period and a “liquid phase assay” where PECs are exposed for 15 min to water elutriate prepared from 25% wt/v or less of sediment. Reference sediment toxicity data were then compared with those generated with the Microtox Solid Phase Assay. Significant correlations ($P < 0.05$) were shown to exist between Luminotox solid phase assay and Microtox, indicating that both tests display a similar toxicity response pattern for a group of CRM sediments ($n = 13$) having differing contaminant profiles. The Luminotox liquid assay procedure proved to be less sensitive than its solid phase, suggesting that it is capable of determining only the presence of sediment contaminants that are readily soluble in an aqueous elutriate. Luminotox solid phase and Microtox bioassays were further conducted on 12 freshwater sediment samples and again the toxicity responses of both assays were significantly correlated. These preliminary results suggest that Luminotox assay could be useful screening tools to assess the toxic potential of solid media.

Key-words: Luminotox; Sediments; enzyme; Photosynthesis; Toxicity

3.1 Introdução

Bioensaios de inibição em organismos vivos são comumente utilizados para avaliar toxicidade de substâncias potencialmente poluidoras. Pode ser aplicado em algas, bactérias, microcrustáceos, plantas superiores, animais ou outros organismos avaliando geralmente a inibição sobre o crescimento, morte, alterações na morfologia etc.

A inibição da fotossíntese por substâncias tóxicas é um processo bastante estudado em plantas e muitos herbicidas têm seu modo de ação baseado neste princípio. O mecanismo de ação para várias substâncias tem já sido elucidado através do estudo em cloroplastos isolados (CEDENO-MALDONADO; SWADER; HEATH, 1972; YRUELA et al., 1993; RASHID; CAMM; EKRAMODDOULLAH, 1994; HUANG et al., 1997; KIMIMURA; KATOH, 1972). Estudos com cobre, cádmio e chumbo mostraram que estes elementos inibem ambos fotossistemas I e II, sendo o fotossistema II o mais fortemente afetado (CEDENO-MALDONADO; SWADER; HEATH, 1972). O mercúrio tem efeito mais pronunciado sobre o fotossistema I, embora a altas concentrações cause inibição sobre ambos fotossistemas (KIMIMURA; KATOH, 1972). Huang et al. (1997) estudaram o efeito de PAHs sobre o sistema fotossintético e encontraram que o fotossistema I foi o primeiro sítio afetado por estas substâncias, enquanto Dayan et al. (2000) observaram que uréias e aminas substituídas causam maior efeito sobre o fotossistema II.

Estas enzimas relacionadas com os fotossistemas I e II foram isoladas dos tilacóides e a partir delas foi desenvolvido um novo teste chamado Luminotox, no qual a toxicidade é avaliada com base na inibição na emissão de fluorescência na presença de substâncias tóxicas. O princípio do teste é baseado no fato que a maior parte da energia luminosa absorvida é utilizada para reações fotoquímicas no fotossistema II resultando em emissão de fluorescência. No entanto, parte desta energia é dissipada e a presença de substâncias tóxicas pode aumentar esta dissipação, modificando o balanço de energia. Assim, a toxicidade pode ser estimada através de medidas nos parâmetros de fluorescência.

A variação na fluorescência da clorofila a é um indicador da eficiência da cadeia fotossintética e é relacionada com o estado redox do aceptor de elétrons plastoquinona A (QA), a qual é reduzida durante o processo. Luminotox mede a fluorescência da QA reduzida e oxidada que corresponde ao estado fotossintético não ativo e ativo, respectivamente. Para isto, o aparelho

emite dois níveis de fluorescência, um de baixa intensidade, a qual não produz fotossíntese e é utilizada para medir a fluorescência causada por outros fatores, e outro de alta intensidade, a qual ativa os processos enzimáticos (BOUCHER et al., 2005). A inibição na emissão de fluorescência é proporcional ao teor de toxicidade da amostra permitindo a construção de curvas dose-resposta.

Este teste tem as vantagens de ser rápido, sensível, de simples manuseio, baixo custo e necessitar de quantidades pequenas de amostra. As enzimas reagem diretamente com o sítio de ação enzimático e por isso a toxicidade é avaliada mais rapidamente que em organismos vivos. Além disso, este teste pode também ser utilizado no campo permitindo tomadas de decisões rápidas.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Local

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Águas Fluviais do Center Saint Laurent, Environmental Canadá, Montreal, Canadá.

3.2.1.2 Sedimentos

Foram testados 14 sedimentos de referência certificados, adquiridos no National Water Research Institute, Canadá, os quais possuem teores de contaminantes químicos conhecidos e toxicidade variada, estando na forma liofilizada. Destes 14 sedimentos, seis são contaminados com metais e oito são contaminados com PCBs.

Posteriormente foram testadas amostras naturais coletadas em três diferentes locais, com quatro pontos de amostragens cada: Rio Saint Lawrence, Montreal, QC, Canadá (Iles Robinet, Iles Vert, Amont Cum e Ile Bouchart); Lago de Burlington, Ontário, Canadá (7002, 7008, 7014 e 70M4), e Lagos de Berlin, Germany (Breites Horn, Marina Lanka, Kalber e Grosse Tiefhorn).

3.2.1.3 Testes de toxicidade

3.2.1.3.1 Microtox fase sólida

Este teste utiliza a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* como indicadora de toxicidade, a qual é avaliada com base na inibição da luminescência produzida pela bactéria em resposta a presença de substâncias tóxicas.

Os sedimentos foram cuidadosamente homogeneizadas por 5 minutos utilizando espátula e amostras de 7 g de cada sedimento foram diluídas em 35 ml de solução NaCl 3,5% para se obter concentração de 20% (p/v), agitando-se durante 10 minutos. Solução salina (NaCl 3,5%) foi utilizada como controle. Foram feitas 12 diluições seriadas 1:1 em tubos de ensaio, as quais foram mantidas a 15°C em banho-maria.

A bactéria *V.fischeri* liofilizada foi reativada com 1 ml de solução reconstituente a 15°C durante 15 min. Alíquotas de 20 µl desta solução foram aplicadas a cada diluição dos sedimentos e os tubos de ensaio foram incubados novamente a 15°C por 15 min, sendo então filtrados. Foram retirados 500 µl do sobrenadante, deixados estabilizar por 10 min e então a luminescência foi lida em aparelho Microtox.

3.2.1.3.2 Luminotox fase líquida

As enzimas PECs liofilizadas foram reativadas com 5ml de solução tampão, incubando-se por 15 minutos no escuro com agitação periódica. Para a realização dos testes com amostras líquidas, 100 µl do reagente foram aplicados em 2 ml das diluições previamente preparadas, em 3 repetições, com tempo de incubação de 15 minutos no escuro. As leituras da absorbância foram feitas em aparelho Luminotox (Lab Bell).

3.2.1.4 Testes com sedimentos de referência para Luminotox fase sólida

Foram testadas diferentes técnicas de exposição das amostras de sedimento às enzimas. Estas se dividem basicamente em dois grupos: as técnicas de exposição direta dos sedimentos e técnicas de extração dos sedimentos para obtenção do elutriato. Foram testados primeiramente dois sedimentos de referência, um altamente tóxico (Sud-1) e outro com baixa toxicidade (Ec-6), buscando avaliar se as técnicas utilizadas são capazes de distinguir a toxicidade de amostras com diferentes graus de toxicidade.

3.2.1.4.1 Técnicas diretas

Foram feitas diluições dos sedimentos para 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,156 e 0,078% em água (p/v). Alíquotas de 2 ml foram retiradas para tubos de ensaios onde foram adicionados 100 µl do reagente, em 3 repetições, incubando-se por 15 minutos no escuro. Em seguida, dois procedimentos foram utilizados, no primeiro as amostras foram lidas diretamente (TD) em aparelho Luminotox, e no segundo as amostras foram filtradas antes da leitura (TDF) em procedimento semelhante ao utilizado para o teste Microtox fase sólida.

3.2.1.4.2 Técnicas do Elutriato

Diluições similares dos sedimentos foram feitas e novamente foram utilizados dois procedimentos, sendo que no primeiro as diluições foram filtradas antes da adição do reagente sobre o elutriato (TEF). No segundo método, as diluições foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos para aplicação das enzimas (TEC). As amostras foram então incubadas por 15 minutos no escuro.

3.2.1.5 Otimização das condições do teste

Os sedimentos Sud-1 e Ec-6 foram testados utilizando a técnica TDF variando-se alguns parâmetros, como o tempo de incubação na presença das enzimas (15 e 30 minutos) e a quantidade de enzima aplicada (100 e 200 µl). O tempo de agitação dos sedimentos em solução aquosa para obtenção do elutriato também foi estudado em dois tempos, 4 e 24 h. Os resultados foram comparados com o teste Microtox.

3.2.1.6 Teste Luminotox com outros sedimentos de referência

As técnicas de exposição direta com filtração (TDF) e elutriato com centrifugação (TEC) foram selecionadas para os testes com os outros sedimentos de referência. Nestes testes, foram escolhidos o tempo de agitação de 4 h, a quantidade de enzimas de 100 µl e tempo de incubação de 15 minutos, já previamente testados.

As diluições de sedimento utilizadas na técnica TDF foram 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 e 0,156% (p/v). Na técnica TEC foram utilizadas diluições maiores, de 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 e 0,39% do sedimento (p/v) em água e em solução DMSO 10%. Esta concentração de

DMSO (10%) foi previamente testada e mostrou não ser tóxica para o reagente. Os resultados foram comparados com o teste Microtox.

3.2.1.7 Teste Luminotox (TDF) com amostras naturais coletadas em três diferentes localidades

Amostras de sedimento coletadas em 3 diferentes locais (4 pontos de amostragens cada), Rio Saint Lawrence, Montreal, Canadá; Lago Burlington em Ontário, Canadá; e Lagoas de Berlim, Germany, foram analisadas utilizando a técnica DTF, e os resultados foram comparados ao teste Microtox.

3.2.2 Resultados e Discussão

3.2.2.1 Teste Luminotox com os sedimentos Sud-1 e Ec-6

As exposições diretas (TD) com e sem filtração (TDF) resultaram em valores bastante próximos ao Microtox, mostrando que podem ser utilizadas com segurança em testes de toxicidade de sedimentos (Fig. 13 e 14), porém amostras com diluições maiores mostraram menor interferência do substrato com a técnica TDF.

Foi encontrada correlação positiva entre TDF e Microtox, e o coeficiente de correlação foi de 0,828 ($P=0,003$) para Sud-1 e 0,964 ($P=0,000007$) para Ec-6. Estes valores foram significativos, desde que $P<0,05$.

Na técnica do elutriato com filtração (TEF), a toxicidade para Sud-1 foi bem menor que na determinada pela técnica TDF e Microtox. Provavelmente isto se deve ao fato das enzimas não entrarem em contato direto com os tóxicos adsorvidos às partículas do sedimento, apenas com os contaminantes solúveis em solução aquosa. A técnica de elutriato com centrifugação (TEC) para Sud-1, assim como TEF, apresentou valores de toxicidade menores que TDF e Microtox (Figura 13). Para o sedimento Ec-6, que possui baixa toxicidade, os valores da TEF foram maiores que TEC (Figura 14).

Figura 13 - Porcentagem de inibição das enzimas PECs nas diferentes concentrações do sedimento Sud- 1, pela Técnica Direta (TD), Direta Filtrada (TDF), Elutriato Filtrado (TEF), Elutriato Centrifugado (TEC) e Microtox

Figura 14 - Porcentagem de inibição das enzimas PECs nas diferentes concentrações do sedimento Ec-6, pela Técnica Direta (TD), Direta Filtrada (TDF), Elutriato Filtrado (TEF), Elutriato Centrifugado (TEC) e Microtox

A técnica TDF apresentou a melhor correlação com o teste Microtox, enquanto a técnica TEC foi a que melhor se ajustou para amostras sem toxicidade (elutriato centrifugado) e, assim, ambas foram escolhidas para os testes com os outros sedimentos de referência.

3.2.2.2 Otimização das condições do teste

Foram testados o tempo de 15 e 30 min de exposição das enzimas PECs ao sedimento, alíquotas de 100 e 200 μl do reagente e agitação por 4 e 24 h, não se encontrando diferenças entre eles (Figuras 15 e 16), sendo portanto utilizados o tempo de 15 min de exposição, 100 μl do reagente e 4 h de agitação, com redução no tempo e consumo de reagentes.

Figura 15 - Porcentagem de inibição das enzimas PECs para o sedimento Sud-1 variando-se o tempo de incubação (15 e 30 min), a quantidade de enzima (100 e 200 μl) e o tempo de agitação (4 e 24 h) com as diferentes técnicas de exposição

Figura 16 - Porcentagem de inibição das enzimas PECs para o sedimento Ec-6 variando-se o tempo de incubação (15 e 30 min), a quantidade de enzima (100 e 200 µl) e o tempo de agitação (4 e 24 h), com as diferentes técnicas de exposição

3.2.2.3 Teste Luminotox com outros sedimentos de referência

Houve correlação positiva entre TDF e Microtox para 11 dos 14 sedimentos de referência testados ($P < 0,05$). Os coeficientes de correlação variaram de 0,720 ($p = 0,04$) para Ec-1 a 0,975 ($p = 0,004$) para Ec-2 (Figura 17). Quando os valores de IC_{50} são comparados, os sedimentos mais tóxicos para Luminotox foram também os mais tóxicos para Microtox, exceto Ec-8 que foi mais tóxico para Luminotox que para Microtox. Oito sedimentos orgânicos apresentaram correlação positiva entre valores de IC_{50} obtidos nos testes TDF e Microtox ($CC = 0,91$; $p = 0,02$), enquanto Ec-7 não foi tóxico pelo teste Microtox (Figura 19). Quando os valores de IC_{50} dos dois grupos de sedimentos, orgânicos e inorgânicos, foram analisados conjuntamente, foi encontrada novamente correlação positiva ($CC = 0,78$; $p = 0,002$), o que significa que ambos os testes são capazes de identificar igualmente toxicidade associada com diferentes tipos de contaminantes (Figura 20).

Apesar da toxicidade detectada pelo teste Luminotox parecer estar associada com o teor de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), não houve correlação positiva ($CC = 0,452$; $p = 0,223$), enquanto que para Microtox a correlação encontrada foi positiva ($CC = -0,86$; $p = 0,002$).

Para os sedimentos inorgânicos, as análises indicaram correlação positiva entre TDF e o teor de Cu ($CC=0,864$; $p=0,0264$) e Ni ($CC=0,827$; $p=0,0422$), e entre Microtox e Hg ($CC=0,924$; $p=0,00850$), indicando que os dois testes respondem diferentemente a diferentes tipos de contaminantes.

Estes testes utilizam organismos de diferentes níveis tróficos, uma bactéria e uma enzima de planta, e a resposta de cada um pode variar considerando que o local de ação de uma substância tóxica é diferente em cada organismo. Assim, ambos os testes podem ser utilizados conjuntamente para avaliar a toxicidade sobre diferentes compartimentos do ecossistema.

Na técnica TEC utilizando água destilada como solvente, a toxicidade encontrada foi sempre menor que para TDF e Microtox, indicando que as partículas concentram grande parte da toxicidade presente nas amostras, as quais não são estimadas na técnica de elutriato. Porém, houve resposta positiva para 5 dos 6 sedimentos inorgânicos testados, indicando que TEC pode detectar a toxicidade de metais que são fracamente adsorvidos nestes sedimentos. Entre os sedimentos orgânicos, houve resposta apenas em três dos oito sedimentos testados, porém considerando que estes contaminantes são hidrofóbicos e não solubilizam em água, a técnica TEC provavelmente deve não refletir a toxicidade global presente nestas amostras (Figuras 17 e 18).

Quando solução de DMSO (10% v/v) foi utilizada como solvente, foi detectada toxicidade somente em um dos sedimentos, Sud-1, indicando que este solvente não foi capaz de extrair os contaminantes presentes tanto em sedimentos orgânicos quanto inorgânicos.

Figura 17 - Porcentagens de inibição para TDF, TEC e Microtox para os oito sedimentos de referência orgânicos

Figura 18 - Porcentagens de inibição para TDF, TEC e Microtox para os seis sedimentos de referência inorgânicos

Figura 19 - Correlação entre o IC₅₀ obtido através das técnicas TDF e Microtox para os oito sedimentos de referência orgânicos

Figura 20 - Correlação entre o IC₅₀ obtido através das técnicas TDF e Microtox para 13 sedimentos de referência

A técnica TDF, que apresentou melhor padrão de curvas dose-resposta sendo positivamente correlacionada com o teste Microtox tanto nas amostras orgânicas quanto inorgânicas, mostrou ser a técnica que melhor refletiu a toxicidade real presente nestas amostras. Sendo assim, esta técnica foi selecionada para as análises com amostras de sedimentos naturais coletadas em três diferentes locais.

3.2.2.4 Teste Luminotox (TDF) com amostras naturais coletadas em três localidades

Testes realizados com amostras naturais coletadas em Montreal e Ontário (Canadá) e Berlim (Alemanha) mostraram correlação positiva para apenas uma amostra do Rio Saint Lawrence, Ile Bouchard (CC=0,857 e $p=0,0293$). Dois sedimentos, Burlington 7008 e 7014 (Ontário, Canadá), não apresentaram toxicidade para Luminotox. As curvas de inibição estão nas Figuras 21, 22 e 23.

Figura 21 - Porcentagens de inibição para TDF e Microtox para os sedimentos coletados no Rio Saint Lawrence (Canadá)

Figura 22 - Porcentagens de inibição para TDF e Microtox para os sedimentos coletados no Lago de Burlington (Canadá)

Figura 23 - Porcentagens de inibição para TDF e Microtox para os sedimentos coletados no Lagos de Berlim (Alemanha)

No entanto, quando os valores de IC_{50} de ambos os testes Luminotox e Microtox foram comparados, foi encontrada correlação positiva entre eles ($CC=0,62$; $p=0,03$), mostrando que ambos os testes apresentaram o mesmo padrão de resposta para estes sedimentos (Figura 24).

Estes sedimentos podem conter uma vasta combinação de contaminantes acumulados que podem variar em termos de graus de resposta de sensibilidade para cada um dos dois testes. Além disso, em amostras naturais existem vários outros fatores presentes que podem interferir nos resultados, tais como matéria orgânica, H_2S , amônia, tamanho das partículas etc.

Figura 24 - Correlação entre o IC_{50} obtido através das técnicas TDF e Microtox para os 12 sedimentos naturais

3.3 Conclusões

- O teste Luminotox mostrou ser sensível, simples, rápido e eficiente para avaliar toxicidade de amostras de sedimentos, mostrando alta correlação com o teste Microtox. Tanto sedimentos contaminados com metais como os contaminados com PCBs responderam linearmente ao teste Luminotox.

- A técnica de aplicação das enzimas diretamente nas diluições dos sedimentos e posterior filtração para leitura, além de mais simples, foi a técnica que apresentou melhor estimativa da toxicidade global presente nas amostras, estimando também a toxicidade associada às partículas.

- A toxicidade de outros materiais sólidos, como lodo resultante de tratamento de águas residuárias e solos contaminados pode ser determinada através do Luminotox.

Referências

- BOUCHER, N.; LORRAIN, L.; ROUETTE, M.E.; PERRON, E.; DÉZIEL, N.; TESSIER, L.; BELLEMARE, F. Rapid testing of toxic chemicals. **American Laboratory**, Shelton, p. 34-37, Mar. 2005. Disponível em: < <http://www.iscpubs.com/articles/al/a0305bou.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2005.
- CEDENO-MALDONADO, A.; SWADER, J.A.; HEATH, R.L. The cupric ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 50, p. 698-701, 1972.
- DAYAN, F.E.; VINCENT, A.C.; ROMAGNI, J.G.; ALLEN, S.N.; DUKE, S.O.; DUKE, M.V.; BOWLING, J.J.; ZJAWIONY, J.K. Amino- and Urea-Substituted thiazoles inhibit photosynthetic electron transfer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 48, p. 3689-3693, 2000.
- HUANG, X.D.; McCONKEY, B.J.; BABU, T.S.; GREENBERG, B.M. Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (Duckweed). **Environmental and Toxicology and Chemistry**, Lawrence, v. 16, p. 1707-1715, 1997.
- KIMIMURA, M.; KATOH, S. Studies on electron transport associated with Photosystem I. I. Functional site of plastocyanin: Inhibitory effects of HgCl₂ on electron transport and plastocyanin in chloroplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 283, p. 279-292, 1972.
- RASHID, A.; CAMM, E.L.; EKRAMODDOULLAH, A.K.M. Molecular mechanism of action of Pb²⁺ and Zn²⁺ on water oxidizing complex of photosystem II. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 350, p. 296-298, 1994.
- YRUELA, I.; ALFONSO, M.; ZARATE, I.O.; MONTOYA, G.; PICOREL, R. Precise location of the Cu(II)-inhibitory binding site in higher plant and bacterial photosynthetic reaction centers as probed by light-induced absorption changes. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, n. 3, p. 1684-1689, 1993.

ANEXOS

**Cromatogramas da análise dos metabólitos do Índigo por cromatografia de camada
delgada associada a espectrômetro de massas Maldi-Tof**

Tempo zero

Tempo 4 dias

Tempo 7 dias

Tempo 14 dias

Tempo 15 dias

Tempo 16 dias

Tempo 17 dias

Tempo 18 dias

Tempo 19 dias