



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**BIODEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DE EFLUENTE CONTENDO CORANTES,  
TRATADO COM *Pleurotus sajor-caju***

Hélio Mitoshi Kamida  
Biólogo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Regina Durrant  
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

K128b Kamida, Hélio Mitoshi  
Biodegradação e toxicidade de efluente contendo corantes, tratado com *Pleurotus sajor-caju* / Hélio Mitoshi Kamida. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Lucia Regina Durrant  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Enzimas. 2.Biodegradação. 3.Corantes. 4.Fungos.  
I.Durrant, Lucia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III.Título.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Regina Durrant  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Roberta Clemente  
Membro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Doralice de Souza Luro Balan  
Membro

---

Prof. Dr. Fumio Yokoya  
Membro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Teresa Rosim Monteiro  
Membro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Cristina Teixeira Duarte  
Suplente

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Farto Botelho Trufem  
Suplente



Aos meus pais Tetuo e Yossie  
que me apoiam em todos os momentos da minha vida  
e que incondicionalmente sempre me deram incentivo, carinho e compreensão  
dedico

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

(Fernando Pessoa)

## AGRADECIMENTOS

- À Profa. Lucia pela oportunidade de ter realizado o curso, pela orientação e amizade;
- À Profa. Regina Monteiro por ter permitido a utilização das dependências do seu laboratório, pelo auxílio, amizade e paciência;
- À CAPES pela bolsa de estudo concedida;
- Aos membros da banca examinadora pelas sugestões;
- Aos professores, funcionários e colegas de curso do Departamento de Ciência de Alimento, FEA, UNICAMP pelo agradável convívio e em especial aos colegas: Ana Paula, Antônio, Rodrigo, Sara, Ani, Takeshi, Cleber, Márcia, Ísis, Luciana, Karla e Gabriela;
- Aos colegas de laboratório de ecotoxicologia do CENA-USP pelo convívio e amizade: Ana, Ademir, Fernanda, Gláucia, Luciana, Márcia, Petri, Priscila e Wagner;
- Ao Eduardo pelo auxílio nas análises estatísticas, pela sua paciência e por sua incondicional amizade;
- À Profa. Raquel Domarco por ter permitido utilizar o espectrofotômetro para avaliar reflectância e à Clarice pelo auxílio no manuseio com o equipamento;
- À Seção de entomologia do CENA pelo fornecimento do bagaço de cana;
- À Profa. Tsai por ter permitido utilizar o espectrofotômetro;
- À Profa. Neusa Nogueira por ter permitido utilizar as dependências de seu laboratório para conduzir os experimentos de microscopia eletrônica de varredura e à Mônica pelo auxílio nos procedimentos;
- Ao Prof. Emanuel Carrilho da USP de São Carlos, por ter permitido utilizar o aparelho de eletroforese capilar;

- Ao Prof. José Eduardo Corrente da ESALQ-USP pelo auxílio nas análises estatísticas;
- Aos meus irmãos Celso e Ayrton, minhas cunhadas Nilce e Erika e minha sobrinhas Dryelle e Danyelle pelo carinho;
- Aos amigos Nilton, Nirley, Fábio, Fabiana, Denise, Paulo Celso, Lilian, Rosária, Ivan, Iran, Renato, Sérgio, Wellington e Maurício que apesar de estarem distantes ou próximos, sempre poderei contar com o apoio;
- Aos amigos de Lins que apesar do rápido convívio, tanto me cativaram: Sandra, Marie, Kátia, Luiz Carlos, Rodrigo, Rubens e Sílvia.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                  |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                                                                                           | xii   |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                                                                                           | xvii  |
| RESUMO.....                                                                                                                                                      | xviii |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                                   | xix   |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                               | 1     |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                                                    | 5     |
| 2.1 Corantes têxteis .....                                                                                                                                       | 5     |
| 2.2 O problema ecológico da aplicação de corantes.....                                                                                                           | 6     |
| 2.3 Processos de tratamento em efluentes têxteis.....                                                                                                            | 8     |
| 2.3.1 Tratamentos biológicos .....                                                                                                                               | 9     |
| 2.3.2 Tratamentos físicos e químicos.....                                                                                                                        | 11    |
| 2.4 Biodegradação de lignina na madeira .....                                                                                                                    | 13    |
| 2.4.1 Fungos degradadores de lignina .....                                                                                                                       | 13    |
| 2.4.2 Fungos de degradação branca.....                                                                                                                           | 13    |
| 2.4.3 Fungos de degradação marrom .....                                                                                                                          | 14    |
| 2.4.4 Fungos de degradação macia .....                                                                                                                           | 16    |
| 2.4.5 Enzimas ligninolíticas .....                                                                                                                               | 16    |
| 2.5 Biodegradação de corantes por microrganismos ligninolíticos.....                                                                                             | 21    |
| 2.6 Toxicidade de corantes presentes em efluentes têxteis.....                                                                                                   | 29    |
| 2.7 Produção de metabólitos secundários através do processo de degradação de<br>corantes e o uso de eletroforese capilar na caracterização destes produtos ..... | 33    |
| 2.8 Utilização de resíduos para produção de cogumelo.....                                                                                                        | 35    |
| 2.9 Cogumelos comestíveis .....                                                                                                                                  | 38    |
| 3 OBJETIVOS .....                                                                                                                                                | 41    |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                        | 43    |
| 4.1 Local.....                                                                                                                                                   | 43    |
| 4.2 Materiais.....                                                                                                                                               | 43    |
| 4.2.1 Espécie/ linhagens de fungos.....                                                                                                                          | 43    |
| 4.2.2 Corante.....                                                                                                                                               | 43    |

|                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.3 Fonte de lignina.....                                                                                                                                                       | 44 |
| 4.2.4 Meios de cultura .....                                                                                                                                                      | 45 |
| 4.3 Métodos.....                                                                                                                                                                  | 47 |
| 4.3.1 Descoloração de efluente por <i>Pleurotus sajor-caju</i> em meio sólido .....                                                                                               | 47 |
| 4.3.2 Descoloração de corante em bagaço de cana contendo efluente / corante<br>técnico .....                                                                                      | 48 |
| 4.3.3 Influência do tempo de incubação dos fungos na descoloração do efluente.....                                                                                                | 49 |
| 4.3.3.1 Preparo do material de incubação.....                                                                                                                                     | 49 |
| 4.3.3.2 Obtenção de extratos para determinação da atividade de enzimas<br>ligninolíticas .....                                                                                    | 50 |
| 4.3.3.3 Descoloração em meio sólido .....                                                                                                                                         | 50 |
| 4.3.3.4 Descoloração em meio líquido .....                                                                                                                                        | 50 |
| 4.3.4 Obtenção de líquido intersticial para determinação do potencial Hidrogeniônico<br>(pH), da atividade de enzimas ligninolíticas e execução dos testes de<br>toxicidade. .... | 51 |
| 4.3.5 Determinação do potencial Hidrogeniônico .....                                                                                                                              | 52 |
| 4.3.6 Determinação da atividade de enzimas ligninolíticas .....                                                                                                                   | 52 |
| 4.3.6.1 Lacase.....                                                                                                                                                               | 52 |
| 4.3.6.2 Manganês peroxidase .....                                                                                                                                                 | 52 |
| 4.3.6.3 Peroxidase .....                                                                                                                                                          | 53 |
| 4.3.7. Avaliação da toxicidade empregando-se bioindicadores.....                                                                                                                  | 54 |
| 4.3.7.1 Teste com semente de alface ( <i>Lactuca sativa</i> L.) .....                                                                                                             | 54 |
| 4.3.7.2 Teste com <i>Hydra attenuata</i> .....                                                                                                                                    | 55 |
| 4.3.7.3 Teste com alga.....                                                                                                                                                       | 56 |
| 4.3.8 Caracterização de metabólitos secundários (3,4-dicloroanilina) através do<br>uso de eletroforese capilar .....                                                              | 57 |
| 4.3.8.1 Preparação da amostra .....                                                                                                                                               | 57 |
| 4.3.8.2 Análise por fluorescência induzida por laser (LIF).....                                                                                                                   | 58 |
| 4.3.9 Análise de material através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....                                                                                              | 59 |
| 4.3.10 Obtenção de corpos de frutificação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em bagaço de<br>cana contendo efluente têxtil.....                                                       | 60 |

|                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.11 Análise estatística .....                                                                                                                                                           | 60  |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                              | 63  |
| 5.1 Descoloração de efluente por <i>P. sajor-caju</i> em meio sólido.....                                                                                                                  | 63  |
| 5.2 Descoloração de corante em bagaço de cana contendo efluente / corante<br>técnico .....                                                                                                 | 68  |
| 5.3 Influência do tempo de incubação dos fungos na descoloração do efluente e<br>na produção de enzimas ligninolíticas.....                                                                | 74  |
| 5.3.1 Produção de enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase e MnP).....                                                                                                                   | 75  |
| 5.3.2 Descoloração em meio sólido .....                                                                                                                                                    | 77  |
| 5.3.3 Descoloração em meio líquido .....                                                                                                                                                   | 78  |
| 5.4 Estudo dos metabólitos obtidos através do processo de biodegradação, em<br>relação a atividade enzimática, potencial de toxicidade e caracterização dos<br>produtos de degradação..... | 82  |
| 5.4.1 Monitoramento de pH.....                                                                                                                                                             | 83  |
| 5.4.2 Atividade enzimática.....                                                                                                                                                            | 85  |
| 5.4.3 Testes de toxicidade .....                                                                                                                                                           | 89  |
| 5.4.3.1 Sementes de alface.....                                                                                                                                                            | 90  |
| 5.4.3.2 <i>Hydra attenuata</i> .....                                                                                                                                                       | 96  |
| 5.4.3.3 <i>Selenastrum capricornutum</i> .....                                                                                                                                             | 99  |
| 5.4.4 Caracterização de metabólitos secundários (3,4-DCA).....                                                                                                                             | 104 |
| 5.5 Análise do material por microscopia eletrônica de varredura.....                                                                                                                       | 111 |
| 5.6 Obtenção de corpos de frutificação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> em bagaço de cana<br>contendo efluente têxtil.....                                                                   | 113 |
| 6 CONCLUSÕES .....                                                                                                                                                                         | 119 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                                                           | 123 |
| ANEXO A .....                                                                                                                                                                              | 139 |
| ANEXO B .....                                                                                                                                                                              | 141 |
| ANEXO C .....                                                                                                                                                                              | 142 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 01 - Estrutura química do corante índigo.....                                                                                                                                                                                 | 06 |
| Figura 02 - Estrutura química da 3,4-dicloroanilina.....                                                                                                                                                                             | 34 |
| Figura 03 - Esquema simplificado da estação de tratamento de efluente de uma indústria têxtil, situado no Município de Americana-SP.....                                                                                             | 44 |
| Figura 04 - Descoloração de efluente têxtil diluído 50%, acrescidos ou não de bagaço de cana por <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6).....                                                                                          | 65 |
| Figura 05 - Escala tridimensional de dados referentes aos parâmetros L, a, b obtidos através de reflectância, do efluente diluído 50 %, acrescidos ou não de bagaço de cana, tratados com <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6)..... | 67 |
| Figura 06 - Bagaço de cana misturado com efluente têxtil, inoculados com <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6) com 15 dias de incubação.....                                                                                         | 71 |
| Figura 07 - Material homogeneizado a partir de bagaço de cana misturado com efluente têxtil, inoculados com <i>Pleurotus sajor-caju</i> com 15 dias de incubação.....                                                                | 71 |
| Figura 08 - Escala tridimensional de dados referentes aos parâmetros L, a, b obtidos através de reflectância, de bagaço de cana misturado com corante índigo tratado com <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6)...                    | 73 |
| Figura 09 - Escala tridimensional de dados referentes aos parâmetros L, a, b obtidos através de reflectância, de bagaço de cana misturado com efluente tratado com <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6).....                        | 74 |
| Figura 10 - Atividade enzimática de lacase em extratos obtidos através do crescimento de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6) em bagaço de cana suplementado com farelo de trigo.....                                               | 76 |
| Figura 11 - Atividade enzimática de peroxidase em extratos obtidos através do crescimento de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6) em bagaço de cana suplementado com farelo de trigo.....                                           | 76 |
| Figura 12 - Atividade enzimática de MnP em extratos obtidos através do crescimento de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6) em bagaço de                                                                                             |    |

|                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| cana suplementado com farelo de trigo.....                                                                                                                                                                                  | 77 |
| Figura 13 - Extratos obtidos através da incubação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6) em bagaço de cana contendo efluente têxtil após descoloração total.....                                                          | 83 |
| Figura 14 - Potencial hidrogeniônico de extratos obtidos através da incubação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6) em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose.....                                  | 85 |
| Figura 15 - Atividade enzimática de lacase em extratos obtidos através da incubação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6) em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose.....                            | 88 |
| Figura 16 - Atividade enzimática de peroxidase em extratos obtidos através da incubação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6) em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose.....                        | 88 |
| Figura 17 - Atividade enzimática de MnP em extratos obtidos através da incubação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6) em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose.....                               | 89 |
| Figura 18 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 14 dias, de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na germinação de sementes de alface..... | 92 |
| Figura 19 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 14 dias, de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na elongação de raízes de alface.....    | 92 |
| Figura 20 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 20 dias, de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na germinação de sementes de alface..... | 93 |
| Figura 21 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 20 dias, de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na elongação de raízes                   |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| de alface.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 93  |
| Figura 22 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 40 dias, de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na germinação de sementes de alface.....                                                                                                                                                                                              | 94  |
| Figura 23 - Efeito de extratos obtidos através da incubação por 40 dias, de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na elongação de raízes de alface.....                                                                                                                                                                                                 | 94  |
| Figura 24 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 14 dias, de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, no crescimento populacional da alga unicelular <i>Selenastrum capricornutum</i> .....                                                                                                                                                 | 101 |
| Figura 25– Efeito de extratos obtidos através da incubação por 20 dias, de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, no crescimento populacional da alga unicelular <i>Selenastrum capricornutum</i> .....                                                                                                                                                  | 101 |
| Figura 26 - Efeito de extratos obtidos através da incubação por 40 dias, de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, no crescimento populacional da alga unicelular <i>Selenastrum capricornutum</i> .....                                                                                                                                                 | 102 |
| Figura 27 - Cromatograma eletrocinético de uma solução branco (tampão carbonatos 1M pH 9,6) derivatizada com FITC 8mM e diluída 41 vezes. Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75 µm d.i.; tampão tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de 28 kV; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão..... | 108 |
| Figura 28 - Cromatograma eletrocinético de uma solução de 3,4-Dicloroanilina 266 µg mL <sup>-1</sup> derivatizada com FITC 8mM e diluída 41 vezes (6,48 µg mL <sup>-1</sup> ). Condições: capilar de 57,0 cm c.t.,                                                                                                                                                                                                       |     |

50,0 cm c.e. e 75  $\mu\text{m}$  d.i.; tampão tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de 28 kV; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão..... 108

Figura 29 - Cromatograma eletrocinético de um extrato de amostra de efluente controle derivatizado com FITC 8mM e diluído 41 vezes (6,48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75  $\mu\text{m}$  d.i.; tampão tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de 28 kV; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão..... 109

Figura 30 - Cromatograma eletrocinético de um extrato de amostra de efluente tratado com fungo F2 derivatizado com FITC 8mM e diluído 41 vezes (6,48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75  $\mu\text{m}$  d.i.; tampão tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de 28 kV; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão.. 109

Figura 31 - Cromatograma eletrocinético de um extrato de amostra de efluente tratado com fungo F6 derivatizado com FITC 8mM e diluído 41 vezes (6,48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75  $\mu\text{m}$  d.i.; tampão tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de 28 kV; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão..... 110

Figura 32 - Cromatograma eletrocinético de um extrato de amostra de efluente tratado com fungo F6 derivatizado com FITC 8mM e diluído 41 vezes (6,48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) incrementado com padrão de 3,4-Dicloroanilina derivatizada com FITC. Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75  $\mu\text{m}$  d.i.; tampão tetraborato de

|                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM pH 9,5;<br>temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de<br>28 kV; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão....        | 110 |
| Figura 33 - Foto obtida através de microscopia eletrônica de varredura, de<br>fragmento de bagaço de cana contendo efluente têxtil.....                                                               | 112 |
| Figura 34 - Foto obtida através de microscopia eletrônica de varredura, de<br>fragmento de bagaço de cana contendo efluente têxtil, após<br>descoloração com <i>Pleurotus sajor-caju</i> .....        | 112 |
| Figura 35 – Foto obtida através de microscopia eletrônica de varredura, de<br>fragmento de bagaço de cana contendo efluente têxtil, com a<br>presença de micélio de <i>Pleurotus sajor-caju</i> ..... | 113 |
| Figura 36 – Corpo de frutificação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2), formado em<br>bagaço de cana contendo meio mínimo com glicose.....                                                             | 115 |
| Figura 37 – Corpo de frutificação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2), formado em<br>bagaço de cana contendo efluente têxtil.....                                                                     | 117 |
| Figura 38 - Corpo de frutificação de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F6), formado em<br>bagaço de cana contendo efluente têxtil.....                                                                     | 117 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 01 - Efeito de extratos obtidos através da incubação de <i>Pleurotus sajor-saju</i> (F2 e F6) em bagaço de cana suplementado com farelo de trigo na descoloração de efluente líquido..... | 81  |
| Tabela 02 - Resultados do cálculo de CE <sub>50</sub> para bioensaios com sementes de alface ( <i>Lactuca sativa</i> ).....                                                                      | 95  |
| Tabela 03 - Efeito de extratos obtidos de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (F2 e F6), incubados em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose sobre <i>Hydra attenuata</i> .....     | 98  |
| Tabela 04 - Resultados do cálculo de CE <sub>50</sub> para bioensaios com alga ( <i>Selenastrum capricornutum</i> ).....                                                                         | 103 |

## RESUMO

O objetivo deste trabalho consistiu em obter informações pertinentes ao processo de descoloração de efluente têxtil por duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju*, sendo avaliado o potencial e as condições que o influenciam, assim como estudar os produtos obtidos através da biodegradação, avaliando-se a toxicidade e a caracterização dos possíveis metabólitos secundários formados. As duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* foram testadas quanto a capacidade de descoloração do efluente líquido contendo corante índigo, e constatou-se que estas necessitam de fonte de lignina para promoverem a descoloração, sendo o processo observado com material incubado por 14 dias. Foram determinadas as atividades enzimáticas de lacase, peroxidase e manganês peroxidase, sendo verificada a produção destas três enzimas ligninolíticas, supondo-se que existe um sinergismo entre elas no processo de descoloração. Testes de toxicidade foram realizados empregando-se semente de alface, celenterado *Hydra attenuata* e alga unicelular *Selenastrum capricornutum* para avaliar o material resultante da descoloração, e verificou-se que o efluente tratado pelos fungos apresentaram maior toxicidade em relação ao material não tratado, provavelmente pela presença de metabólitos secundários gerados no processo de biodegradação. Utilizou-se metodologia de separação por eletroforese capilar para caracterizar possíveis metabólitos secundários, verificando-se que não se trata de 3,4-dicloroanilina.

## ABSTRACT

The objective of this work was to get information on the process of decolorization of textile effluent by two strains of *Pleurotus sajor-caju*, evaluating their decolorizing capacity and the conditions affecting this process, as well as the toxicity and identity of possible breakdown products. The two strains of *Pleurotus sajor-caju* were tested for their decolorizing capacity of the effluent containing indigo dye, and it was observed that they need a lignin source to promote decolorization, following 14 days of incubation. Laccase, peroxidase and the manganese peroxidase activities were determined in the culture supernatants and it is possible that there is a synergism between them during the decolorization. Toxicity tests were carried out using lettuce (*Lactuca sativa*) seeds, *Hydra attenuata* coelenterate and *Selenastrum capricornutum* unicellular alga, and the results indicate that the effluent treated with the fungi presented greater toxicity than the non-treated one, probably due to the presence of breakdown products generated during biodegradation. Separation by capillary electrophoresis was used to characterize any possible secondaries methabolites, and observed that 3,4-dichloroaniline, was not formed.

## 1 INTRODUÇÃO

O problema da poluição ambiental vem se agravando cada vez mais com o passar do tempo, devido ao consumo desenfreado dos recursos naturais e emissão de resíduos sem tratamento no ambiente. Este problema originou-se com o advento da revolução industrial e tem se intensificado através da explosão populacional humana. Em regiões onde abrigam pólos industriais e densa população, principalmente o ecossistema aquático vem sofrendo uma degradação efetiva causada pelos esgotos domésticos e industriais; medidas preventivas e corretivas necessitam ser implantadas concomitantemente aos crescimentos regionais, conduzindo a níveis aceitáveis para a manutenção da qualidade de vida. A poluição química do ar, solo e água constitui grande alvo de preocupações e os processos biotecnológicos, tem se mostrado com grande potencial em aplicações ambientais.

Nas últimas décadas com a expansão das indústrias têxteis brasileiras surgiram leis rígidas regulamentando a qualidade dos efluentes, pois os corpos hídricos que recebem despejos líquidos industriais e domésticos vêm sofrendo uma degradação inegável. Como resposta, as indústrias estão sendo forçadas a tornar-se mais inovadoras, de maneira a desenvolver produtos e práticas que sejam mais ambientalmente corretas.

Os processos têxteis são grandes consumidores de água e de corantes sintéticos, geradores de efluentes volumosos e complexos com elevada carga orgânica, aliada ao elevado teor de sais inorgânicos. Os corantes sintéticos são extensivamente empregados na indústria têxtil, onde estima-se que 10 a 15% são perdidos no efluente durante o processo de coloração. A grande diversidade e complexidade desses

efluentes aliados a imposições da legislação que exigem tratamentos eficientes, tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias que buscam o melhor e mais adequado tratamento, considerando custos, tempo e eficiência dos processos existentes na reciclagem e eliminação de toxicidade. A preocupação com a estética e qualidade do ambiente atingido por efluentes coloridos leva à busca de alternativas de descoloração, especialmente dos corantes têxteis.

Há diversas formas de tratamento para os efluentes têxteis: físicos, químicos e biológicos. O sistema biológico de lodo ativado é reconhecidamente, o mais representativo dentre os utilizados por indústrias têxteis e indústrias em geral. Em lagoas aeradas, o efluente é submetido à oxidação por microrganismos, reduzindo-se eficientemente a carga poluidora que será lançada no ambiente.

Devido a esta importância, os microrganismos têm sido intensivamente estudado com a finalidade de remover compostos tóxicos do ambiente. As pesquisas de degradação de compostos químicos, têm mostrado vários microrganismos extremamente versáteis em degradar substâncias recalcitrantes. Os caminhos atuais da biotecnologia indicam fungos basidiomicetos degradadores de lignina, como eficientes na degradação de grande variedade de compostos e de corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados. O problema da remoção da cor em efluentes coloridos, tem encorajado a busca de tratamentos biológicos para esta finalidade. Os fungos basidiomicetos denominados “da podridão branca da madeira” tem sido apontados como bons degradadores e eficientes na descoloração.

A presença de agentes químicos nos ecossistemas pode representar um risco aos seres vivos. Os aspectos da produção de efeitos danosos aos organismos expostos às substâncias veiculadas pelos efluentes industriais e domésticos, tem sido

contemplados atualmente. Vários bioensaios de toxicidade propõem-se avaliar estes riscos.

Na indústria têxtil nacional, as fibras de algodão são intensamente usadas e o corante índigo muito empregado nos processos de tingimento de fibras celulósicas.

As investigações científicas na área têxtil ainda são escassas, esforços em encontrar técnicas de bioestimulação e biorremediação para incrementar os conhecimentos de forma a modificar a realidade que se apresenta o ambiente atingido pelos poluentes, são necessárias.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Corantes têxteis

Os corantes são substâncias intensamente empregadas para a coloração de vários substratos, tais como: alimentos, cosméticos, plásticos, materiais têxteis, etc. São retidos por adsorção física, formação de soluções, sais ou complexos com metais, retenção mecânica ou por constituição de pontes químicas covalentes (Contato, 1995).

Em sentido amplo, o termo corante designa toda e qualquer substância que dá cor, colore, tingem, pinta. Em química, corante denomina apenas as substâncias de caráter aromático, capazes de colorir irreversivelmente um suporte têxtil.

Há duas formas de classificação dos corantes: a primeira é pela constituição química de acordo com os grupos cromóforos ou unidades de cor da molécula, a segunda é baseada na aplicação ou uso final do corante (Kirk-Othmer, 1979).

No tingimento o(s) corante(s) mais comumente empregado(s) pertencem à classe dos corantes azo e “vat”. Os primeiros são pigmentos insolúveis empregados na coloração de materiais celulósicos a um custo menor que os corantes “vat”. Os corantes têm em comum um grupamento químico que são os anéis aromáticos; entre os grupos químicos constituintes das classes de corantes anteriormente citados estão os grupos azo que constitui-se de anéis aromáticos ligados por  $\text{— N = N —}$ ; e os corantes “vat” constituídos dos cromóforos indigóides que podem ser derivados da indigotina ou tioindigo ou cromóforos derivados basicamente da antraquinona (Trotman, 1964).

Os corantes que têm por estrutura básica a antraquinona são os mais resistentes à degradação devido a suas estruturas aromáticas fundidas, que permanecem coloridas

por longos períodos de tempo. Corantes básicos têm alto brilho e portanto alta intensidade de cor, tornando-se mais difíceis de descolorir (Banat et al., 1996).

O índigo foi e é ainda hoje o mais importante dos corantes vat. O processo “vatting” permite a solubilidade em água reduzindo à forma leuco os corantes naturais, que requeriam um longo processo de fermentação antes de iniciar a coloração ou tingimento (Aspland, 1991).

O índigo pode ser considerado como um corante “histórico” e sua importância é notável até o presente. Trata-se de um corante que se destaca por sua gama de aplicações, seja em roupa de trabalho, seja pela moda denim. Há um volume produzido de 12.000 toneladas anuais. A utilização do índigo natural remonta a 5.000 anos desde a idade do ferro, passando pela Índia e Europa. O índigo é um glicosídeo extraídos de plantas (por exemplo: *Indigofera tinctoria*) e foi substituído pela forma sintética a partir de N-fenilglicina e N-ácido fenilglicino-carboxílico (Haas, 1990).

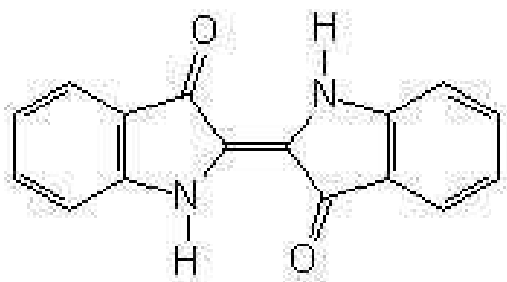


Figura 01 - Estrutura química do corante índigo

## 2.2 O problema ecológico da aplicação de corantes

Um problema crescente para a indústria têxtil é a exigência da legislação governamental com relação a remoção da cor nos efluentes industriais. As agências de

proteção ambiental de todo o mundo, vêm promovendo a prevenção da transferência de problemas de poluição de um ambiente para outro. Isso implica que a indústria deve desenvolver tratamento de seus efluentes “*in loco*” antes de despejá-los. Para o atendimento de tal exigência, tanto as indústrias como os cientistas têm direcionado suas pesquisas na busca de tratamentos e tecnologias visando a descoloração de corantes nos efluentes (Banat et al., 1996).

As operações de limpeza, tingimento e acabamento na indústria têxtil dão origem a despejos volumosos e variados. O tratamento e a recirculação destes despejos e a recuperação de produtos e sub-produtos, constituem os maiores desafios enfrentados pela indústria têxtil hoje (Hart, 1994). O processamento de tecidos a partir de fibras naturais (como algodão e lã) e fibras sintéticas (poliamidas, poliacrílicos e poliésteres), possuem operações que são geradoras de despejos líquidos. O tingimento origina despejos coloridos, contendo soda cáustica, detergentes, sabões e corantes. A engomagem contribui com amidos e féculas, altamente concentradas e com elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (Braile & Cavalcanti, 1993).

É sugerido por Clark (1995), conforme o Bulletin Ecological Toxicological Association of Dyestuff – Etad (1995) que os níveis ou concentrações abaixo de 0,1 mg/L para substâncias coloridas nos ecossistemas aquáticos normalmente não dão motivo para problemas, enquanto acima de 1 mg/L seriam valores críticos, que levam à poluição visual afetando o mérito estético. O despejo de indústrias têxteis são tóxicos à vida aquática, diminuem o conteúdo de oxigênio dissolvido, modificam as propriedades e características físicas dos cursos d’água e interferem na fotossíntese.

Os pré-requisitos para entender e julgar o comportamento dos corantes no meio ambiente é conhecer suas propriedades físico-químicas, ecológicas e técnicas. Assim,

é exigido das indústrias de corantes, estabilidade química (à luz, água, detergentes, solventes, gases) e alta afinidade ao material a ser colorido.

Os efeitos adversos dos corantes ao ser humano, inclui 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).

### **2.3 Processos de tratamento em efluentes têxteis**

O resíduo líquido industrial ou efluente industrial é a água residuária resultante dos processos industriais e dependendo do tipo de indústria, ele possui características muito específicas (Cetesb, 1989). O termo água residuária é utilizado para caracterizar os despejos provenientes dos diversos usos das águas, tais como doméstico, comercial, industrial, agrícola, estabelecimento público e outros.

O tratamento dos despejos industriais das fábricas de tecidos de algodão e sintético, deve considerar como alternativas: a) redução de despejos no processamento (reduzindo volume de água e produtos); b) realização de modificações no processo e boa manutenção; c) lançamento de despejos na rede pública de esgotos, para serem tratados nas estações municipais; d) tratamento dos despejos na área industrial, que deverá ser cuidadosamente planejado, devido as variações súbitas de vazão e de produtos químicos empregados no processo (Braile & Cavalcanti, 1993).

Na redução de volume de despejos, as soluções pouco concentradas são reutilizadas nas unidades de lavagem de tecidos com grande quantidade de sujeiras, ou recirculadas antes do descarte. Estima-se que 90% das cargas poluidoras das fábricas

são de produtos químicos, assim evitando desperdício reduz-se as quantidades de 1/5 a 1/2 da quantidade original e 30% da carga poluidora. A água recuperada pode ser utilizada em processos de alvejamento total, tingimento, lavagem com amaciantes, em quadros e cilindros de estamparia e também lavagem de pisos e instalações (Braile & Cavalcanti, 1993; Hart, 1994).

Na avaliação de desempenho da estação de tratamento biológico, deve-se conhecer especificamente, as características que indicam a variação da qualidade da água residuária e do lodo (Cetesb, 1991). Geralmente, são determinadas as características: a) físicas: temperatura, turbidez, teor de sólidos, odor, cor, vazão, material retido, removido ou produzido; b) químicas: demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), formas de nitrogênio (orgânico, amoniacal, nitritos e nitratos), fósforo, óleos e graxas, sais, metais, pH; c) biológicas: tipo e número de microrganismos.

As indústrias têm se preocupado com a otimização de seus processos, com a minimização dos descartes de corante no efluente, têm automatizado o tingimento e reutilizado água e produtos, com maior lucro financeiro e menor dispêndio de energia.

### **2.3.1 Tratamentos biológicos**

De acordo com Longo (1987), o sistema de tratamento das águas residuais de indústria têxtil pode ser dividido em duas etapas: tratamento primário ou preliminar e tratamento secundário.

No tratamento primário, faz-se a remoção dos sólidos grosseiros, flutuantes ou pesados e, a equalização com ajuste de pH e queda da temperatura. No tratamento

secundário, ocorre a redução da carga poluidora de origem orgânica, que é determinada pela DBO e a retirada de sólidos sedimentáveis. O processo de tratamento secundário, classicamente utilizado é o tratamento biológico por lodos ativados onde não ocorre a remoção da cor (Longo, 1987). Nesse processo, dois resíduos são gerados: o efluente líquido e o lodo. O líquido é descartado nos rios e o semi-sólido (lodo) é disposto em aterros.

De acordo com Stanigher (1987), existem várias formas de processar o lodo a ser eliminado, porém os métodos são sempre custosos e quase sempre necessitam de grandes áreas. Entre as formas de tratamento, estão os leitos de secagem (tanques onde se espalha o lodo para o mesmo secar naturalmente), filtro prensa ou centrifugação para remoção da água que é descartada nos rios. O resíduo semi-sólido (lodo) é geralmente disposto, após secagem, em aterros sanitários. No entanto, a disposição em aterros traz inconvenientes como: não é um processo de tratamento e sim de imobilização; sacrifica a área e, exige monitoramento, pois há possibilidade de contaminação do lençol freático (Conchon et al., 1997).

Entre os principais problemas associados com o tratamento de resíduos aquosos das indústrias têxteis, citam-se a temperatura, o pH, o teor de fósforo, a DQO, halogênios orgânicos adsorvíveis (AOX) e a cor (Groff, 1993).

Uma estação de tratamento biológico de efluentes por lodo ativado típica consiste das seguintes unidades: a) tanque de equalização onde o efluente após ser gradeado é passado por um vertedor, seu pH é corrigido para a condição de tratamento (pH entre 8,0 e 9,0); b) tanque de oxidação onde o efluente equalizado une-se ao efluente sanitário sendo aerado e recebendo nutrientes quando necessário; c) decantador onde o lodo é recirculado parcialmente para o tanque de oxidação e o

sobrenadante tratado irá para o corpo d'água receptor; d) unidade de adensamento de lodo, onde o lodo em excesso é processado (Braile & Cavalcanti, 1993).

Nos processos biológicos há uma dependência da ação de microrganismos presentes no esgoto; os fenômenos inerentes à respiração e à síntese são predominantes na transformação dos componentes complexos em compostos mais simples. Na verdade, os processos biológicos procuram reproduzir em dispositivos racionalmente projetados, os fenômenos biológicos observados na natureza, condicionando-os em área e volume economicamente ajustáveis (Cetesb, 1991). Como processos biológicos de tratamento incluem-se a oxidação biológica (filtros biológicos ou lodo ativado) e a digestão anaeróbia do lodo, no digestor.

### **2.3.2 Tratamentos físicos e químicos**

O emprego do carvão ativado, juntamente com o processo de lodo ativado, são os mais difundidos na área têxtil. As propriedades adsorptivas do carvão, dependem do tamanho de seus poros e do tempo de contato para a obtenção de equilíbrio. Este é eficiente na remoção de anilinas, nitrobenzenos, fenóis voláteis; e corantes azóicos (Shen & Zhao, 1991).

Os tratamentos terciários para remoção de cor mais utilizados são: oxidação química com cloro, ozonização, raios gama e troca iônica. Entre os métodos químicos, os mais empregados são a coagulação e a floculação. É comum a associação de tratamentos como a coagulação com  $Al_2(SO_4)_3$  e ozonização, com remoção de partículas coloidais e insolúveis, oxidando corantes e reduzindo a DQO em 50% (Hohn, 1996).

A descoloração do descarte de indústrias têxteis pode ser conseguida através de quatro modos: ozonização (50-60% de redução de cor); floculação-filtração (até 90% de remoção); floculação-filtração, seguida de ozonização e por alcalinização com hidrossulfito de cálcio (até 96%). Estes métodos podem ser um pré-tratamento, ou seguir-se à depuração biológica (Ginocchio et al., 1985; Shu & Huang, 1995).

Outras técnicas envolvem oxidação química usando hipoclorito de sódio para remoção da cor, entretanto, liberam grandes quantidades de aminas aromáticas que são carcinogênicas, ou outros compostos tóxicos o que, conseqüentemente agravam o problema. Outras pesquisas têm sugerido que os corantes recalcitrantes, devido a sua afinidade em aderir a superfícies, possam ser removidos por adsorção sem o envolvimento da biodegradação e a liberação de produtos intermediários. No entanto, segundo Banat et al. (1996), nenhum processo parece ser capaz de efetivamente descolorir os resíduos aquosos das indústrias têxteis e geralmente preconiza-se a aplicação de métodos combinados.

A separação dos corantes por processos físico-químicos (precipitação, filtração, floculação, adsorção) visa reduzir o volume de lodos residuais pigmentados, possibilitando tratamentos posteriores ou disposição direta em aterros sanitários. Na prática, a combinação ou sequência de métodos de tratamentos pode ser necessária para se alcançar uma qualidade aceitável do efluente e uma situação viável de disposição de resíduos (Porter, 1990; Clark, 1995).

## **2.4 Biodegradação de lignina na madeira**

### **2.4.1 Fungos degradadores de lignina**

Os fungos degradadores da madeira podem ser divididos em três grupos, de acordo com a morfologia da degradação: fungos de degradação branca, marrom e macia. Os fungos degradadores da madeira são taxonomicamente diversos e a maioria deles pertence à subdivisão Basidiomycotina. Os basidiomicetos de degradação branca são os mais eficientes organismos degradadores de lignina. São capazes de mineralizar lignina, eventualmente até  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (Kirk & Farrell, 1987; Rodriguez & Durán, 1988; Orth et al., 1993; Hatakka, 1994; Tuor et al., 1995).

Os fungos de degradação marrom e macia são capazes de degradar lignina em alguma extensão, embora preferencialmente ataquem a celulose na madeira.

### **2.4.2 Fungos de degradação branca**

Os basidiomicetos causadores de degradação branca na madeira produzem degradação seletiva da lignina na parede celular, deixando a celulose praticamente intacta (Blanchette, 1991; Blanchette et al., 1994). Entretanto, esses fungos variam consideravelmente, de acordo com o tipo de ataque à lignina e aos polissacarídeos da madeira. Além disso, demonstram velocidades diferentes na remoção da lignina (Kirk & Farrell, 1987). Com base nessas propriedades, os fungos de degradação branca podem ser divididos em dois subgrupos: a) fungos que degradam simultaneamente todos os componentes, aproximadamente à mesma velocidade; b) fungos que preferentemente degradam lignina. Os últimos, que degradam seletivamente a lignina, criam tipicamente

áreas localizadas de degradação, e assim são designados fungos de bolsos brancos ou manchados (Eriksson, 1990).

A identificação dos fungos de degradação branca é baseada nas características morfológicas e fisiológicas das hifas. A maioria dos basidiomicetos tem hifas dicarióticas com conexões específicas entre os septos do micélio (Blanchette, 1991). Sua habilidade comum é oxidar compostos fenólicos, relacionados à lignina, que na maioria das vezes está associada a enzimas extracelulares ligninolíticas, em particular lacases.

Estudos de microscopia eletrônica nos últimos anos têm revelado, que esses fungos colonizam a madeira, invadindo o lúmen de traqueídeos e fibras, segregando enzimas que degradam a lignina e polissacarídeos (Ruel & Joseleau, 1991; Barrasa et al., 1992; Daniel et al., 1992).

#### **2.4.3 Fungos de degradação marrom**

Produzem tipicamente uma quebra extensiva dos polissacarídeos da madeira (ex: celulose e hemicelulose) e deixam a maioria da lignina intacta. Logo, a madeira degradada por esses fungos tem um aspecto amarronzado e de aparência frágil (Blanchette, 1991). Os fungos de degradação marrom predominantemente atacam madeiras moles, enquanto os de degradação branca são eficientes no ataque a madeiras duras. Os fungos responsáveis pela degradação marrom também pertencem à subdivisão Basidiomycotina e a maioria das espécies à família Polyporaceae; entretanto correspondem a apenas 6% de todos os basidiomicetos que degradam a madeira (Rayner & Boddy, 1988).

Embora esses fungos não sejam capazes de efetivamente despolimerizar a lignina, podem fazer modificações, resultando em decréscimo dos grupos metoxilas da lignina da madeira. Logo, os grupos fenólicos aumentam significativamente (Jin et al., 1990), alterando a lignina para subseqüentes biodegradações. Além disso, um aumento dos grupos hidroxilas alifáticos, como os carboxílicos, também produzem quebras parciais de interunidades de ligações com cadeias laterais (Jin et al., 1990). Portanto, não se pode generalizar: as propriedades da degradação mostram grande variedade entre as espécies (Eriksson et al., 1990).

O mecanismo pelo qual os fungos de degradação marrom modificam a lignina é ainda desconhecido, já que não produzem enzimas ligninolíticas. Acredita-se que moléculas pequenas (glicoproteínas), que quelam ferro, poderiam estar participando das transformações da lignina via produção de radicais de hidroxila (Enoki et al., 1990; Backa et al., 1992; Durán, 1996).

Os fungos de degradação marrom produzem porosidade e erosão nas células da parede da madeira, devido a uma quebra rápida do suporte celulósico das microfibrilas (Eriksson et al., 1990). Perda da lignina, em particular das células dos cantos, e remoção dos grupos metoxilas são visualizadas por técnicas de microscopia eletrônica (Blanchette, 1991). Com base, nessas observações, as hifas de fungos de degradação marrom podem ser divididas em dois grupos fisiológicos: a) hifas que degradam todos os componentes da parede celular da madeira, incluindo a lignina; b) hifas que podem somente modificar a lignina, quando estão degradando os polissacarídeos da madeira (Highley et al., 1985). Microfibrilas específicas, por exemplo extensões lineares e emaranhado de células da parede da hifa, foram detectadas nesses fungos (Larsen et

al., 1992), que podem transportar enzimas hidrolíticas a um contato direto com seu substrato (Green et al., 1992).

#### **2.4.4 Fungos de degradação macia**

Os fungos pertencentes à subdivisão Ascomicotina e Deuteromicotina podem causar um tipo específico de degradação na madeira, caracterizada por ser suave, de aparência úmida, que sob condições de secagem pode lembrar a degradação do tipo marrom (Blanchette, 1991).

Os fungos de degradação macia preferencialmente colonizam e degradam madeiras duras, especialmente as de alta umidade (Eslyn et al., 1975). Em madeiras moles, a velocidade de degradação por fungos de degradação macia é geralmente mais lenta que a dos fungos de degradação branca e marrom. Embora estes normalmente metabolizem os polissacarídeos da madeira, são capazes de algumas transformações da lignina. No caso dos fungos de degradação marrom, a lignina é usualmente modificada por desmetilação (Eslyn et al., 1975). Entretanto, os fungos de degradação macia são deficientes na despolimerização de ligninas sintéticas, embora convertam rapidamente compostos fenólicos relacionados com lignina (Ander et al., 1988).

#### **2.4.5 Enzimas ligninolíticas**

A atividade de fenoloxidasas extracelulares, indicando a presença de enzimas ligninolíticas, foi descoberta na década de 30 em fungos de degradação branca

(Eriksson et al., 1990); logo depois foi demonstrado que as reações eram catalisadas por oxidoredutases do tipo lacases e peroxidases (Kirk, 1971; Ander & Eriksson, 1976). A habilidade para oxidar compostos fenólicos, especificamente, tem sido utilizada como critério de identificação para fungos de degradação branca verdadeiros (Käärik, 1965). Em seguida ao isolamento de lacases, duas peroxidases, chamada lignina peroxidase e manganês peroxidase, foram evidenciadas na participação da quebra da lignina e outras enzimas.

O *Phanerochaete chrysosporium* é um dos mais potentes organismos ligninolíticos disponíveis, sendo o mais estudado. Possui características tais como crescimento rápido, degrada extensivamente a lignina a alta temperatura, apresenta formação de conídios na fase assexual em abundância, e seu ciclo de vida à fase sexual é rápido. Para o metabolismo da lignina, esse fungo produz um sistema lignolítico constitutivo, que se expressa somente durante a fase secundária e é induzido pela limitação de carbono, sulfato e nitrogênio, sendo altamente oxidativo (Leisola & Fletcher, 1985; Ghosh & Singh, 1993). As enzimas extracelulares associadas com a degradação de lignina por *Phanerochaete chrysosporium* incluem as lignina peroxidases (LiPs), as manganês peroxidases (MnPs) e a glioxal oxidase geradora de  $H_2O_2$  (Rajarathanam et al., 1992).

A LiP descoberta em 1982 por Glenn et al. (1983), citado por Haapala & Linko (1993) em filtrados de cultura de *P. chrysosporium*, foi inicialmente chamada por diferentes nomes tais como oxigenase dependente de  $H_2O_2$ , ligninase e diarilpropano oxigenase, até que descobriu-se serem estas peroxidases (Leisola & Waldner, 1988).

As LiPs e as MnPS são glicoproteínas. Cerca de quinze peroxidases diferentes e MnP foram isoladas e purificadas considerando seu ponto isoelétrico. Todas as

peroxidases contem um grupo heme porfirina-ferro por molécula. O ferro é oxidado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  a um estado de oxidação maior o que torna a enzima capaz de oxidar a lignina e outros compostos relacionados (Leisola & Waldner, 1988).

A LiP tem uma atividade ótima a pH de aproximadamente 2,0 à temperatura ambiente e é facilmente superoxidada pelo excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à forma inativa. A inativação também pode ocorrer pela perda do grupo heme sob agitação forte (Leisola & Waldner, 1988).

A MnP, ou peroxidase corante, tem máxima atividade a pH 4,5 e, demonstrou dependência absoluta de  $\text{Mn}^{2+}$  e lactato. A enzima é estimulada pelo aumento da concentração proteica nas reações e inibida completamente por  $\text{NaNO}_3$ , KCN e EDTA 1 mM. Demonstrou-se que  $\text{Mn}^{2+}$  tem função na mineralização da lignina sintética por fungos da degradação branca, tanto como mediador ativo para MnP como regulador da sua produção, bem como da produção da LiP e lacase (Kerem & Hadar, 1993). A MnP relaciona-se à LiP pois, esta, oxida  $\text{Mn}^{2+}$  e a  $\text{Mn}^{3+}$ , este último pode oxidar unidades fenólicas da lignina e, pode estar envolvido na sua fragmentação (Rajarithanam et al., 1992).

Em meio líquido, a produção de enzimas ligninolíticas pode ser dividida em duas fases. A primeira, de crescimento do fungo quando a velocidade de agitação não é crítica. Durante a segunda fase, de produção da enzima, a velocidade de agitação tem um papel chave. Nesta fase, as culturas limitantes em nitrogênio podem ser agitadas acima de 150 rpm e as limitantes em carbono até 30-40 rpm, para manter a atividade ligninolítica (Leisola & Waldner, 1988; Moyson & Verachtert, 1993).

Um outro fator crítico é a tensão de oxigênio - o crescimento procede rapidamente quando as culturas, em meio líquido são aeradas e, a atividade ligninolítica

ocorre entretanto mais rápido, alcançando maiores teores quando a atmosfera é de 100% de oxigênio (Leisola & Waldner, 1988). No entanto, em meio sólido, o oxigênio não é fator limitante para a taxa de degradação da lignina, nem a taxa de respiração do fungo é afetada pelo enriquecimento com oxigênio (Kerem et al., 1992).

A temperatura de crescimento para o *P. chrysosporium* têm um papel importante na produção e na máxima atividade da MnP e LiP. Nas temperaturas de 39, 33 e 28°C houve produção da MnP e LiP, mas a 23°C houve maiores quantidades de MnP e, a 18°C somente a atividade de MnP foi detectada (Vyas et al., 1994). Esse fungo é termotolerante com uma temperatura ótima para crescimento entre 39-40°C. Sua taxa de crescimento diminui com a queda da temperatura, determinando um atraso na produção de MnP e LiP e diminuindo a atividade proteolítica.

O álcool veratril aparece como metabólito secundário nas culturas ligninolíticas de *P. chrysosporium* e *Pleurotus florida* (Dhaliwal et al., 1992) e é conhecido como indutor da produção de enzimas ligninolíticas ou fenoloxidasas. O álcool veratril também pode funcionar como um mediador na transferência de um elétron. Desta forma compostos que não são diretamente acessíveis à enzima podem ser oxidados pela via do álcool veratril. Outra função é estabilizar a LiP pela remoção de excesso de peróxido de hidrogênio (Leisola & Waldner, 1988).

O álcool veratril é oxidado pelas LiPs sob condições aeróbias a veratrildeído e é o único produto da oxidação. Entretanto, sob condições anaeróbias, outros produtos são formados, incluindo duas quinonas e um produto da clivagem do anel aromático. Portanto, na presença de oxigênio, as LiPs podem mediar a abertura do anel aromático (Leisola & Waldner, 1988).

Uma outra enzima, a lacase tem recebido considerável atenção nesses últimos 10 anos devido ao seu papel na degradação da lignina e aplicações potenciais na destoxificação de poluentes fenólicos (Kumaran et al., 1997). A lacase é uma polifenoloxidase de natureza glicoproteica e é produzida por alguns fungos da podridão branca tais como *Lycoperdon* sp., *Coriolus versicolor*, *Phellinus ignarius* (Guzmán et al., 1993) com exceção do *P. chrysosporium* que exibe pouca atividade (Tuor et al., 1995).

A lacase tem ampla especificidade para com o substrato. Essa enzima emprega o oxigênio molecular como redutor e também oxida anéis fenólicos para radicais fenóxi. A lacase oxida compostos fenólicos por abstração de um elétron, com formação de radicais que podem repolimerizar ou serem levados a despolimerização. A especificidade da enzima ao substrato depende da origem da lacase. Sua função fisiológica ainda não é clara e seu papel na biodegradação da lignina é incerto (Gold & Alic, 1993), contudo a lacase e a MnP devem agir complementarmente ou sinergisticamente.

A lacase de *Pleurotus ostreatus* é uma oxidase o-difenil que utiliza guaiacol e o pirocatecol, sendo inativada por hidroquinona, resorcinol e tirosina; seu ponto isoelétrico é de 2,9 (Sannia et al., 1986). O pH ótimo para sua atividade depende do substrato; na presença de guaiacol e siringadiazina varia de 5,0-6,0 e 6,0-7,0, respectivamente; é uma enzima estável a várias temperaturas mas, a partir de 55°C sua atividade diminui (Palmieri et al., 1993).

Dentre os fungos da degradação branca produtores de lacases e outras ligninases, encontram-se as espécies de *Pleurotus*. Alguns estudos conduzidos com *P. ostreatus*, compilados por Rajarathanam & Bano (1989), mostram que os principais

parâmetros culturais afetando a degradação da lignina por esses basidiomicetos, são o substrato de crescimento, a fonte de nitrogênio, bem como sua concentração e condições de cultivo. De um modo geral, a carência de uma fonte externa de nitrogênio, temperatura de 25-30°C, disponibilidade de oxigênio, cultivo estático de *Pleurotus* spp, favorecem a degradação de lignina.

Kerem et al. (1992) assim como Akhmedova (1994), observaram uma alta atividade de lacase no início do período de degradação da lignina. De acordo com estes pesquisadores, a lacase pode atuar na destoxificação de compostos do substrato como oxidar grupos fenólicos, agindo como uma enzima inicial na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina. Outras enzimas de natureza oxidativa tal como as álcool veratril oxidase podem ter um papel importante na degradação da lignina.

## **2.5 Biodegradação de corantes por microrganismos ligninolíticos**

Vários são os processos biológicos que vêm sendo estudados para o tratamento dos resíduos da indústria têxtil visando a descoloração desses. Segundo Mackay (1979) citado por Banat et al. (1996), ao longo desses anos inúmeras culturas microbianas têm sido testadas e muitas vêm sendo implicadas com a descoloração de corantes têxteis.

Entre os microrganismos implicados com a descoloração dos corantes têxteis estão as bactérias, fungos, algas e mais recentemente consórcios de cultura de bactérias (Banat et al., 1996). Muitas bactérias foram capazes de descolorir os corantes têxteis. Os problemas encontrados relacionam-se ao isolamento desses

microrganismos, ao período de adaptação desses ao meio contendo o poluente e à capacidade de descolorir vários corantes.

Os biodegradadores desses compostos considerados mais efetivos são os fungos denominados da degradação branca, que degradam os materiais lignocelulósicos naturais de duas maneiras distintas: a) degradação simultânea da celulose, hemicelulose e lignina; e b) degradação seletiva da lignina e hemicelulose (Ghosh & Singh, 1993).

Aparentemente os fungos da degradação branca biodegradam a lignina através de diferentes combinações de peroxidases e oxidases chamadas genericamente de ligninases (Leisola & Fletcher, 1985). Compreende-se por ligninases várias isoenzimas: lignina peroxidases (LiPs), peroxidases dependente de manganês (MnP) bem como fenoloxidases e oxidases capazes de produzir peróxido de hidrogênio (Tuor et al., 1995).

De acordo com Shin et al. (1997) embora ainda hoje não se conheça com precisão quais são as enzimas capazes de degradar a lignina *in vivo*, dois grupos de peroxidases, a lignina peroxidase e a manganês peroxidase, parecem estar associadas com atividade ligninolítica.

Desde que a biodescoloração de resíduos líquidos e da polpa de papel foi relatada no início dos anos 80, empregando-se basidiomicetos da podridão branca *P. chrysosporium* e *Tinctoria* sp., vários estudos têm sido conduzidos na remoção de corantes (Banat et al., 1996).

De acordo com Banat et al. (1996) o mecanismo de descoloração de corantes poliméricos por fungos da podridão branca até então parece envolver as enzimas lignina peroxidases (LiPs), as MnPs e lacases.

A descoloração de três corantes poliméricos por *P. chrysosporium* foi confirmada por Glenn & Gold (1983). Seus resultados sugerem que a descoloração foi resultado de atividade do metabolismo secundário ligado à atividade de degradação ligninolítica do fungo.

Platt et al. (1985) estudaram a descoloração do corante "poly-blue" (polivinilalanina antaquinona sulfonada) por vários fungos degradadores da lignina. Entre eles o *Pleurotus* sp. "florida" demonstrou capacidade de descolorir o corante, na concentração de 0,02%, tanto em meio líquido quanto em meio sólido. A habilidade de descoloração desenvolveu-se na ausência do corante, mas somente quando o fungo foi previamente cultivado em substrato contendo fonte de lignina (palha de algodão). Os resultados obtidos sugerem que a capacidade de descolorir não está relacionada diretamente à produção de lacase embora possa estar ligado outros processos conectados com a produção dessa enzima. Nas condições desse estudo, mudanças na concentração de glicose e nitrogênio no meio não exerceram efeito sobre a capacidade de descoloração. Em meio sólido e líquido, a descoloração pela linhagem de *Pleurotus*, ocorreu de imediato, enquanto que o *P. chrysosporium* ocorreu somente após o crescimento até as bordas da placa de Petri onde este foi cultivado; fato relacionado pelo pesquisadores ao efeito repressivo dos teores de nitrogênio (20 mM).

*P. chrysosporium* também mostrou biodegradar os corantes azo e os corantes heterocíclicos "Orange II", "Tropaeolin O", "Congo Red" e "Azure B" (Cripps et al., 1990). A extensão de remoção da cor variou dependendo da complexidade do corante, disponibilidade de nitrogênio no meio e atividade ligninolítica da cultura e, esteve relacionada ao metabolismo secundário. Sob baixas concentrações de nitrogênio (1,2 mM) 90% da cor foi removida nas primeiras seis horas, enquanto que com o excesso de

nitrogênio (12 mM) foram necessários mais de cinco dias para alcançar 63-93% de descoloração dos corante acima citados. A capacidade de descoloração também dependeu da concentração de oxigênio no meio líquido e foi inibida por inibidores da atividade ligninolítica, tais como cianeto de potássio (KCN), tiouréia e azida, e não ocorreu na ausência de atividade de LiP. Nas culturas não ligninolíticas, onde a álcool veratril oxidase estava ausente, a descoloração não pode ser observada e houve adsorção dos corantes ao micélio do fungo. A depleção de carbono (glicose), conhecida como indutora do metabolismo secundário e da produção de LiP, mostrou-se responsável pelo processo de descoloração. No entanto, os corantes na presença de ligninas peroxidases purificadas sofreram um processo de descoloração, em alguns casos, em menor extensão quando comparadas na presença do fungo e apresentaram outros metabólitos secundários. Os autores concluíram que embora as ligninas peroxidases estejam envolvidas na degradação desses corantes azo e heterocíclicos, inúmeras outras enzimas ou sistemas enzimáticos também fazem parte do processo de quebra desses corantes (Cripps et al., 1990).

Outros estudos realizados com *P. chrysosporium* sugerem que a mineralização do corante parece estar ligada à classe dos mesmo. Os corantes reativos, dispersos, sulfonados e os “vat” (que inclui o índigo), foram descoloridos enquanto que os corantes da classe naftol e ácidos não. Também a habilidade biodegradativa desses fungos está relacionada, pelo menos em parte, ao sistema de degradação de lignina não-específico desse fungo (Bumpus, 1995).

Uma série de outros corantes também foi testada à várias concentrações sendo descoloridos pelo *P. chrysosporium*, particularmente quando o álcool veratril estava presente no meio. Acredita-se que o álcool veratril estimule a atividade das ligninases,

que aparentemente estão ligadas a descoloração (Paszczyński & Crawford, 1991). Alash & Sharma (1992) citados por Banat et al. (1996), testaram a degradação de dezoito corantes azo usando *P. chrysosporium* e somente oito foram degradados, com 40-70% de remoção da cor. Essa degradação foi principalmente devido ao sistema enzimático degradador da lignina ou por adsorção desses ao micélio.

A descoloração do corante polimérico indicador da atividade de fenoloxidasas Poly R-478, foi estudada como método potencial para separar os fungos degradadores da lignina dos não aptos. Em meio sólido, a descoloração ocorreu mais lentamente que o crescimento radial dos fungos, indicando que as enzimas de descoloração estão associadas às hifas em crescimento e às desenvolvidas. As linhagens de uma mesma espécie diferiram na sua habilidade de descolorir mas, se alcançada não houve diferenças entre os monocariotos e os dicariotos de uma mesma espécie. Uma elevação da temperatura de 20 para 40°C aumentou a taxa de descoloração, porém em menor proporção que a taxa de crescimento. Os estudos em meio líquido sugerem, que os sistemas enzimáticos, presentes nos diferentes fungos estudados, envolvidos com a descoloração desse corante, não estão relacionados somente a uma interação simples entre a MnP ou LiP, outras fenoloxidasas não específicas como a lacase parecem estar envolvidas (Freitag & Morrell, 1992).

Kirby et al. (1995) estudaram a descoloração de um efluente têxtil artificial por *P. chrysosporium*. O papel da LiP também não ficou claro, pois a atividade da enzima foi detectada somente no processo de descoloração dos vários corantes sintéticos estudados separadamente e misturados (efluente artificial). Nesse estudo, a concentração dos corantes foi de 0,5 g/L; na presença de glicose (10 g/L), seis dos corantes testados foram descoloridos enquanto que na ausência apenas três. Os

resultados sugerem que uma fonte primária de carbono (glicose), é essencial para uma descoloração extensiva do corante, no entanto, alguns corantes puderam ser metabolizados como única fonte de carbono e energia por *P. chrysosporium*.

Pasti-Grigsby et al. (1992) mostraram que a natureza e a posição de substituintes em um dos anéis aromáticos de corantes azo podem influenciar a descoloração. Eles também demonstraram que as enzimas lignina peroxidase (LiP) e MnP diferem em termos de sua habilidade em degradar diferentes corantes. No estudo realizado por Knapp et al. (1995), o *Pleurotus ostreatus* foi capaz de descolorir em 100% os corantes indigo carmine, reactive red 4, orange II e o brilliant green, enquanto que somente 21% o corante crisofenina. A correlação entre a descoloração com a atividade de LiP não foi possível de ser estabelecida, no entanto, os autores concluem que o sistema ligninolítico está envolvido.

Culturas ligninolíticas de inúmeros fungos da podridão branca têm sido documentados pela sua capacidade de degradar e descolorir vários corantes. O envolvimento de MnP e LiP foi demonstrado na via de degradação de alguns dos corantes. Entretanto, espera-se que os fungos de degradação branca difiram na sua habilidade e capacidade de degradar corantes com base nas suas diferenças qualitativas e quantitativas na produção dessas enzimas. Tais corantes também podem oferecer formas para diferenciação entre atividades enzimáticas de peroxidases específicas ligninolíticas (Vyas & Molitoris, 1995).

Ambrósio & Campos-Takaki (2003), avaliaram a descoloração de corantes com estruturas moleculares diferentes (orange II; reactive black 5; reactive red 198) em diversas condições de cultura pelo fungo *Cunninghamella elegans*. A presença de sacarose ou sacarose e peptona aumentaram significativamente a descoloração das

soluções, entretanto, na presença da fonte de nitrogênio apenas, a descoloração foi suprimida. Através dos resultados obtidos, sugere-se que houve biodegradação e bioadsorção dos corantes e que pela diminuição da taxa respiratória de *E. coli*, supõe-se que metabólitos tóxicos foram produzidos.

Harazono et al. (2003) estudaram a descoloração de um corante reativo azo (Reactive Red 120) por um basidiomiceto de degradação branca, o *Phanerochaete sordida* linhagem YK-624. Em meio de cultura líquido contendo 3% de extrato de malte e 200 mg/L deste corante, este fungo descoloriu 90,6% após 7 dias de incubação. E a atividade da enzima manganês peroxidase foi detectada neste processo de descoloração. Este processo não ocorre em condições anaeróbias, sugerindo que a descoloração do corante por esta enzima é influenciada pelo oxigênio dissolvido.

Kuo-Cheng et al. (2003) isolaram 6 linhagens de bactérias de amostras de lodo capazes de degradar corantes têxteis, sendo identificada e selecionada *Aeromonas hydrophila* que exibiu a capacidade de remoção de cor de vários corantes. A remoção de cor por esta bactéria ocorreu melhor em condições anóxicas ou anaeróbias. Mais de 90% do corante RED RBN foi reduzida na cor com 8 dias de incubação na concentração de 3000 mg/L. Fontes de nitrogênio como extrato de levedura ou peptona aumentam a eficiência de descoloração, em contraste, a presença de glicose parece inibir a atividade de descoloração, porque ácidos orgânicos são produzidos através da sua conversão provocando a diminuição do pH do meio de cultura, inibindo assim, o crescimento celular e conseqüentemente a atividade de descoloração.

Nyanhongo et al. (2002) compararam quatro fungos ligninolíticos quanto a habilidade de produzir lacase. A lacase fúngica foi selecionada pela sua capacidade de descolorir corantes sintéticos (antraquinona, azo, índigo, triarilmetano). Baseado na

produção de lacase e habilidade de descoloração dos corantes, *Trametes modesta* foi selecionado para estudos futuros. Todos os corantes testados foram descoloridos pela lacase de *T. modesta* mais eficientemente em condições ácidas (pH 3-6) e temperaturas entre 50-60°C. A eficiência de descoloração pela lacase de *T. modesta* aumentou significativamente na presença de mediadores como 1-hidroxibenzotriazole e 2-metoxifenotiazine.

Martins et al. (2003) realizaram uma triagem de diversos fungos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* e *Aureobasidium pullulans*) quanto a capacidade de degradação de derivados de seringol e corantes azo contendo respectivamente, grupos carboxílico e sulfônico. *T. versicolor* apresentou melhor capacidade e este potencial foi confirmado pela degradação de diferentes corantes bioacessíveis. Ensaio enzimáticos (LiP, MnP, lacase, protease e glioxal oxidase) e análises por cromatografia a gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG-MS) foram realizados com o corante que foi melhor degradado. A identificação de metabólitos hidroxilados sugere uma possível via metabólica de degradação.

Balan & Monteiro (2001a) empregaram os basidiomicetos *Phellinus gilvus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Picnoporus sanguineus* e *Pleurotus ostreatus* e constataram a degradação do corante índigo em meio de cultura líquido por estes fungos. Através do teste de biodegradabilidade imediata, verificou-se que este corante é facilmente biodegradável por *Picnoporus sanguineus* e *Pleurotus ostreatus* (Balan & Monteiro, 2001b). Ranzani (2002), selecionou linhagens de *Pleurotus* capazes de degradar o corante índigo, utilizando meios de cultura líquido e sólido e constatou, que o emprego de bagaço de cana misturado com folha de bananeira como substrato,

oferece condições favoráveis, para a degradação do corante presente em lodo residual procedente de estação de tratamento de efluente de uma indústria têxtil.

## **2.6 Toxicidade de corantes presentes em efluentes têxteis**

A toxicidade é uma propriedade inerente ao agente químico que produz efeitos danosos a um organismo quando este é exposto, por um período de tempo, a determinadas concentrações daquele agente. Os testes de toxicidade avaliam o efeito do efluente como um todo ou através de substâncias específicas que o compõe; estas abordagens permitem avaliar os efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos.

Os testes de toxicidade, para avaliar os efeitos causados à espécie-teste, consistem em expor os organismos aquáticos representativos do ambiente a várias concentrações de uma ou mais substâncias, ou a fatores ambientais, durante um determinado período de tempo. Estes testes, quando orientados a um objetivo prático bem definido, como o de subsidiar ações de controle da poluição, utilizam, preferencialmente, de reações biológicas consideradas adequadas para estimar os efeitos potenciais de agentes tóxicos sobre uma determinada comunidade de seres vivos (Cetesb, 1990 a).

Os primeiros testes a serem aplicados são os de toxicidade aguda, não obstante os seus resultados, testes crônicos também devem ser realizados, já que não há necessariamente entre eles uma inter-relação. A toxicidade pode ser percebida como a ocorrência de efeitos deletérios, que advêm do contato entre os seres vivos e uma substância química ou do efluente total.

O efeito da toxicidade aguda, trata-se de uma resposta severa e rápida dos organismos a um estímulo, que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 horas. Normalmente, o efeito é a letalidade, ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede, como por exemplo, o estado de imobilidade em alguns microcrustáceos. Para avaliar os efeitos agudos de agentes tóxicos em testes de toxicidade, utiliza-se geralmente, a concentração letal ( $CL_{50}$ ) ou a concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) a 50% dos organismos em teste. Essa é a resposta considerada mais significativa para ser extrapolada a uma população (Cetesb, 1990 a).

O efeito crônico se traduz pela resposta a um estímulo que continua por longo tempo, geralmente por períodos que podem abranger parte ou todo o ciclo de vida dos organismos. De modo geral, porém não exclusivo, esses efeitos são subletais e são observados em situações em que as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência do organismo, embora afetem uma ou várias de suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras. Para avaliar esses efeitos utilizam-se testes de toxicidade crônica, nos quais é determinada a concentração do agente tóxico que não causa o efeito observado (CENO - Concentração de Efeito Não Observado). Quando efluentes líquidos, mesmo os tratados, são lançados de forma contínua no ambiente aquático, podem ocorrer efeitos crônicos, uma vez que os organismos são expostos a baixas concentrações de determinados poluentes durante longos períodos de tempo. Se estes poluentes forem degradáveis, dada a sua efêmera persistência no ambiente, ocorrerá equilíbrio a uma certa distância do ponto de lançamento, mas, no trecho ou área em que esse fenômeno de degradação se processa, os organismos poderão enfrentar impedimentos ou dificuldades para se manter no ambiente, levando a alterações na estrutura e

funcionamento do ecossistema aquático. Se entre, os poluentes lançados, existirem substâncias persistentes ou bioacumuláveis, efeitos mais drásticos poderão, então, ocorrer nas populações expostas (Cetesb, 1990 a).

Muitas substâncias são produzidas e introduzidas nos ecossistemas aquáticos, podendo atuar na disponibilidade de oxigênio dissolvido, desequilibrar a comunidade aeróbia ou agir diretamente pela toxicidade destes compostos (Ortolano, 1994).

O controle do desempenho dos sistemas de tratamentos de efluentes é monitorado, convencionalmente, por medidas indiretas não específicas de carbono orgânico, como DBO (demanda bioquímica de oxigênio), DQO (demanda química de oxigênio), OD (Oxigênio Dissolvido) e COT (Carbono Orgânico Total). Atualmente, novas exigências ambientais passaram a incluir também, a remoção de constituintes orgânicos voláteis e substâncias tóxicas presentes em baixas quantidades (Eckenfelder, 1991).

Hunger & Jung (1991) investigaram a toxicologia e ecologia de corantes orgânicos. Descreveram que a biodegradação em condições anaeróbias é pequena, e nos corantes azóicos forma derivados de amina que são mutagênicos e carcinogênicos; os corantes reativos dispersos são agentes sensibilizadores, causando reações alérgicas de pele e respiratórias.

Não somente os corantes, mas muitos produtos auxiliares, podem ser responsáveis por efeitos tóxicos. O conteúdo de metais pesados em corantes tem merecido muitos estudos, contudo a prática de evitar o seu uso já começou a tornar-se eminente, com a substituição de tais produtos.

Vários contaminantes orgânicos são continuamente adicionados acidentalmente ou deliberadamente à água, alimentos e ar. A exposição a contaminantes industriais

ocorre frequentemente e em altas concentrações. Há estimativas de que 80-90% do câncer humano pode ter causa ambiental. Testes rápidos, fáceis e cuidadosos predizem sobre a segurança ou risco à exposição humana e de outros organismos vivos, à compostos puros ou complexas misturas químicas. Cada vez mais os bioensaios, passam a ser importantes na análise de riscos ambientais (Glatz, 1979).

Para a determinação da toxicidade de um efluente deve-se utilizar organismos de diferentes níveis tróficos do ambiente aquático como algas, microcrustáceos e bactérias (Cetesb, 1990 b). O trabalho de Rojíeková et al. (1998) recomenda-se o emprego de um produtor, um consumidor e um decompositor nos testes de toxicidade dos compostos xenobióticos.

As plantas superiores tem sido empregadas para detectar compostos mutagênicos; são empregados ensaios com milho, tomate, soja, tabaco, cevada e ervilha. Alguns bioensaios usam raiz de cebola e feijão. Os efeitos mutagênicos sobre as proteínas podem ser detectados por alterações visíveis como: mudança de cor de pétalas, perda de clorofila, alterações de germinação e crescimento (Glatz, 1979).

Um bioensaio empregando sementes tem sido recomendado pelo National Water Research Institute do Canadá (Dutka, 1989) para a avaliação de toxicidade de efluentes, solo ou sedimentos. São utilizadas sementes de alface ou outras de crescimento rápido que tenham pouca reserva de energia. Comumente avalia-se a inibição da germinação e também a elongação da raiz, cujo crescimento é inibido por pequenas concentrações do composto tóxico, tornando-se um indicador mais sensível dos efeitos biológicos.

## **2.7 Produção de metabólitos secundários através do processo de degradação de corantes e o uso de eletroforese capilar na caracterização destes produtos**

O termo biodegradação tipicamente refere-se a transformação biológica de um composto químico orgânico para outra forma, sem se referir a extensão. Esta transformação pode ser primária, envolvendo somente uma mudança estrutural da molécula, tais como uma oxidação, redução ou perda de um grupo funcional, embora estas modificações são pequenas, alteram as características físico-químicas da molécula parental. A transformação entretanto, pode ser mais complexa, envolvendo várias reações sequenciais, implicando na perda da toxicidade da molécula. O processo de biodegradação ideal, resulta na mineralização do composto, com formação de dióxido de carbono, água, produtos inorgânicos e compostos orgânicos de ocorrência comum e pouco agressiva no ambiente, como ácidos orgânicos e outros (Alexander, 1981).

Quanto às técnicas de tratamento de efluentes têxteis, destaca-se que a quebra de corantes em estruturas descoloridas, são por vezes muito nocivas ao homem e à biota aquática, podendo ser exemplificado pelas aminas aromáticas, derivados fenólicos, hidrocarbonetos aromáticos polinucleados e aminas heterocíclicas (Prithchard, 1985).

Alguns trabalhos, empregando tratamento eletroquímico para degradação de corantes têxteis, verificaram que produtos secundários podem ser obtidos através deste processo, através da redução ou oxidação de ligações na molécula. Dávila-Jiménez et. al. (2000), expuseram alguns corantes empregados na indústria têxtil ao tratamento eletroquímico, analisaram os produtos de degradação através de cromatografia líquida

de alta eficiência com detecção de arranjo de diodo, e verificaram que prováveis produtos obtidos através do tratamento do corante índigo, são 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) e ácido 3,4-dicloroaminobenzóico.

O 3,4-DCA (Figura 02) é um precursor para síntese e metabólito de degradação de herbicidas amplamente utilizados na agricultura do tipo fenil-uréia como diuron, linuron e propanil (Bartha & Pramer, 1970; Kimbrough, 1980; Di Muccio et al., 1984). Este tem sido detectado em ambientes aquático naturais em concentrações consideráveis e é acumulado em algas, cladóceros, moluscos e peixes (Isensee, 1982; Cowgill et al., 1985). Valentovic et al. (1997) avaliaram o potencial de 3,4-DCA na toxicidade sobre o aparelho excretor de ratos, e verificaram que este foi tóxico após 24 h de exposição, onde os rins e bexiga foram tecidos alvo desta reação. 3,4-DCA tem sido utilizado como composto tóxico padrão, para avaliar a eficiência e confiabilidade de organismos e metodologias para serem empregados em bioensaios de toxicidade, como por exemplo em alga *Selenastrum capricornutum* e os cladóceros *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia quadrangula* (Sosak-Swidarska et al., 1998; Klüttgern et al., 1996).

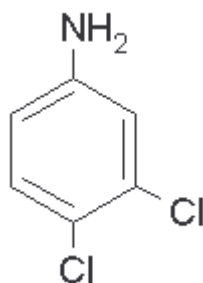


Figura 02 - Estrutura química da 3,4-dicloroanilina

A eletroforese capilar (CE) consiste na migração diferencial de partículas ou moléculas ionizadas em tubos capilares de 50-75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 30-100 cm de comprimento, preenchido com um meio condutor, geralmente aquoso, sob a influência de um campo elétrico, procedendo-se então a separação das espécies e a migração das mesmas em direção ao eletrodo oposto, passando por um detector capaz de identificar a sua presença, enviando uma resposta à um integrador ou computador (Baker, 1995; Altria, 1996).

A eletroforese capilar tem conquistado a atenção da comunidade científica internacional, como uma poderosa técnica alternativa para a separação e análise de compostos nas mais diversas áreas, inclusive a ambiental. A alta eficiência de separação, a baixa quantidade de reagentes e amostras necessárias, aliada à possibilidade de analisar diversos tipos de moléculas devido as suas diversas modalidades, faz da eletroforese capilar uma técnica de separação altamente desejável.

## **2.8 Utilização de resíduos para produção de cogumelo**

Sendo o cultivo de cogumelos comestíveis um dos processos de bioconversão de resíduos lignocelulósicos mais economicamente viáveis, Buswell et al. (1996) estudaram os três tipos de cogumelos mais cultivados comercialmente *Lentinula edodes*, *Pleurotus sajor-caju* e *Volvariella volvacea*, os quais exibem habilidades variadas na utilização de resíduos lignocelulósicos como substrato de crescimento. Uma avaliação das principais enzimas lignocelulolíticas envolvidas mostrou uma diversidade qualitativa entre esses cogumelos. *P. sajor-caju* mostrou-se das três

espécies a mais adaptada, podendo crescer numa grande variedade de resíduos agrícolas de diferentes composições em termos da razão entre polissacarídeo/lignina.

A possibilidade de emprego de resíduos industriais para o cultivo de *Pleurotus* sp. foi exemplificada por Tautorus (1985) e Rajarathan et al. (1992). A polpa e os resíduos da fabricação do papel são exemplos de resíduos celulósicos que são dispostos no ambiente causando problemas ambientais. A produção do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* foi obtida empregando-se como substrato de cultivo uma mistura do lodo da polpa de celulose com os resíduos da indústria de maçã.

Kannan & Oblisami (1990) estudaram o mecanismo de degradação do lodo residual sólido da fabricação do papel por *Pleurotus sajor-caju*. Esse resíduo é rico em celulose e ligninas residuais e compostos relacionados. Nessa fermentação sólida, observou-se que as atividades de endo e exoglucanases estiveram diretamente relacionadas à degradação da celulose, gerando glicose para a indução de glicose oxidase, o período de incubação correspondeu à corrida do micélio ou desenvolvimento inicial do fungo.

Sanjust et al. (1991) estudaram três espécies de *Pleurotus* na degradação de resíduos aquosos da indústria de azeitonas. Esse resíduo é particularmente rico em compostos fenólicos relacionados à lignina, os quais são também substratos para atuação da lacase. As três espécies estudadas cresceram satisfatoriamente nesse resíduo e produziram grandes quantidades de lacase extracelular com concomitante destruição dos compostos fenólicos presentes no resíduo.

Outros resíduos industriais potenciais são citados por Rajarathanam et al. (1992), tais como bagaço de citronela (utilizada para extração de óleos essenciais), restos da extração do linho, casca de laranja e resíduos das destilarias de uvas.

Um outro aspecto que vêm sendo pesquisado, é o emprego dos substratos residuais do cultivo desses cogumelos. Em geral, os resíduos lignocelulósicos tornam-se mais solúveis, contendo altas quantidades de açúcares livres, menor quantidade de lignina, uma estrutura celulósica com menor polimerização, aumento no teor de cinzas e presença de várias enzimas.

Além dos resíduos agroindustriais normalmente pesquisados (palha de trigo e resíduos de algodão) e que tem potencial ou vêm sendo utilizados comercialmente na produção de cogumelos citam-se: as palhas de cereais, resíduos de leguminosas e de semente de oleaginosas, polpa de café, bagaço de cana, sabugo de milho e resíduos da folha de bananeira (Ortega et al., 1992; Rajarathanam et al., 1992; Guzmàn et al., 1993; Patra & Pani, 1995; Ragunathan et al., 1996).

A possibilidade de empregar-se vários resíduos, evidenciando o caráter ecológico na melhora ambiental com um ciclo de vida na produção de cogumelos menor, e com maior potencial de bioconversão, têm ocasionado a maior difusão do cultivo de *Pleurotus* sp., bem como o aumento de seu consumo em todo o mundo. No Brasil, esse cogumelo vem sendo cultivado em bagaço de cana oriundo de usinas, não necessitando de fermentação prévia, devido a baixa concentração de açúcares (Bononi et al., 1999). Outro material lignocelulósico empregado para o cultivo de *Pleurotus* sp. com sucesso foi a folha de bananeira senescente (Sturion & Oetterer, 1995).

Das considerações acima descritas pode-se, com a descoloração do resíduo líquido de efluentes das indústrias têxteis por ação de enzimas de basidiomicetos, melhorar a descarga poluente em águas, referente à presença dos corantes. Ainda a utilização do lodo residual misturado aos resíduos lignocelulósicos pode conduzir à

mineralização dos corantes e pelo processo biodegradativo obter-se um material com potencial de produzir cogumelos comestíveis.

## 2.9 Cogumelos comestíveis

Com relação aos cogumelos, comenta-se em literatura que aproximadamente 2000 espécies podem ser potencialmente comestíveis, porém, apenas 25 deles são normalmente utilizados na alimentação humana e menos ainda são comercialmente cultivadas. No Brasil, a primeira espécie a ser cultivada foi o champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Outras espécies atualmente cultivadas são a caetetuba ou cogumelo gigante (*Pleurotus ostreatus*) e o shiitake (*Lentinula edodes*) (Bononi et al., 1999).

O *Pleurotus* é um cogumelo que pode ser encontrado praticamente no mundo todo, sendo frequente também nas matas brasileiras. Seu modo de vida é como decompositor de matéria vegetal, principalmente de madeiras e, portanto, é facilmente encontrado nas florestas. Até a década de 70 o seu consumo era basicamente pela coleta destes cogumelos diretamente na natureza, e a partir de então iniciou-se o cultivo em escala comercial. Por ser um cogumelo de sabor bem acentuado e por haver disponibilidade deste no mercado, o consumo aumentou significativamente nestes últimos anos e, hoje em dia, ele ocupa o quarto lugar de produção mundial de cogumelos comestíveis. É conhecido pelos orientais como hiratake, e no caso de cogumelos colhidos menores e crescidos sob condições de menor iluminação e ventilação, tem sido denominados de shimeji (Bononi et al., 1999).

Nutricionalmente, os cogumelos constituem boa fonte alimentar, a composição de gorduras, carboidratos, vitaminas, etc. varia de acordo com cada espécie e também com o substrato utilizado no seu cultivo. Os cogumelos também são fontes de aminoácidos, contendo todos os essenciais e alguns não-essenciais; contêm minerais, como cálcio, potássio, iodo e fósforo; e vitaminas, entre elas tiamina, riboflavina, niacina e ácido ascórbico, além de outras relacionadas ao complexo B. Se comparado com outros alimentos, os cogumelos só possuem teor de proteínas menor que a soja, dentre os vegetais, e se compara com produtos de origem animal (Bononi et al., 1999).

Pesquisas indicam, que estes possuem várias substâncias de importância medicinal, conferindo maior resistência natural a doenças viróticas (gripe), reduzindo o colesterol, reforçando o sistema imunológico e combatendo tumores. Como praticamente não contém gorduras, considerado um alimento dietético, é de uso liberado em dietas de emagrecimento (Ferreira, 1998).



### 3 OBJETIVOS

- verificar se as linhagens de *Pleurotus sajor-caju* utilizadas, necessitam de fonte de lignina para descoloração do corante presente no efluente líquido;
- avaliar o potencial enzimático dos fungos e verificar a capacidade de descoloração de efluente têxtil em meio sólido e líquido;
- estudar os metabólitos obtidos através do processo de biodegradação, em relação a atividade enzimática, potencial de toxicidade e caracterização dos produtos de degradação;
- avaliar alteração estrutural do bagaço de cana contendo efluente sob ação dos fungos com auxílio de microscopia eletrônica de varredura;
- verificar se o efluente influencia na formação de corpos de frutificação dos fungos.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (Depto. de Ciência de Alimentos/ FEA/ UNICAMP) e no Laboratório de Ecotoxicologia (CENA/ USP – Piracicaba).

### **4.2 Materiais**

#### **4.2.1 Espécie/ linhagens de fungos**

Foram empregados os fungos basidiomicetos comestíveis *Pleurotus sajor-caju* (CCB 020) – (F2), doado pela Coleção de Culturas de Basidiomicetos da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo e *Pleurotus sajor-caju* (PSC 94/03) – (F6), doado pela Área de Biotecnologia e Microbiologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu, SP.

#### **4.2.2 Corante**

Foi empregado o corante índigo carmina (Indigo BAN 30) em solução aquosa 30% cedido pela Indústria Têxtil na forma em que esta o adquire, sendo a concentração utilizada de 0,02% (p/v), bem como o efluente líquido equalizado, contendo o corante e coletado na caixa de entrada anterior à lagoa de lodo ativado, da estação de tratamento de efluente de uma empresa têxtil da cidade de Americana-SP (Figura 03).

## E.T.E. Indústria têxtil

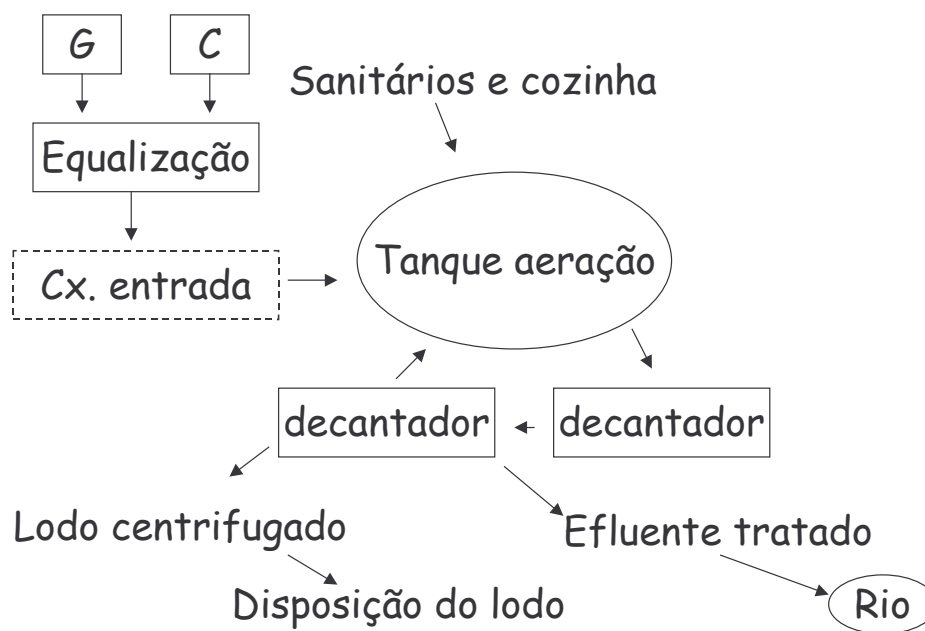


Figura 03 – Esquema simplificado da estação de tratamento de efluente de uma indústria têxtil, situado no Município de Americana-SP (G - goma; C - corante).

### 4.2.3 Fonte de lignina

Bagaço de cana desidratado, esterilizado através de radiação gama e fragmentado em moinho (50-100 mm).

#### 4.2.4 Meios de cultura

##### MEA (malte; extrato de levedura; ágar)

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Extrato de malte.....    | 20 g    |
| Extrato de levedura..... | 2 g     |
| Ágar.....                | 20 g    |
| Água destilada.....      | 1000 mL |

##### Meio Mínimo para Fungos (Pontecorvo et al., 1953, modificado)

|                                     |          |
|-------------------------------------|----------|
| Tartarato de amônia.....            | 0,22 g   |
| Fosfato de potássio monobásico..... | 1,5 g    |
| Cloreto de potássio.....            | 0,5 g    |
| Sulfato de magnésio.....            | 0,5 g    |
| Sulfato de ferro.....               | 0,0001 g |
| Sulfato de zinco.....               | 0,0001 g |
| Tampão acetato de sódio.....        | 2,72 g   |
| Glicose.....                        | 10 g     |
| Água destilada.....                 | 1000 mL  |

##### Meio para *Hydra attenuata*

|                                                                             |        |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------|
| Cloreto de cálcio.....                                                      | 2,94 g |
| N-tris (hidroximetil) ácido metil 1-2-aminoetanesulfônico (tampão TES)..... | 2,2 g  |
| Água ultra pura.....                                                        | 20,0 L |

Meio para alga *Selenastrum capricornutum* (1000x)

Solução estoque de micronutrientes

Solução 1

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Cloreto de magnésio..... | 6,08 g   |
| Cloreto de cálcio.....   | 2,20 g   |
| Ácido bórico.....        | 92,80 mg |
| Cloreto de manganês..... | 208,0 mg |
| Cloreto de zinco.....    | 1,64 mg  |
| Cloreto de ferro.....    | 79,9 mg  |
| Cloreto de cobalto.....  | 0,714 mg |
| Molibdato de sódio.....  | 3,63 mg  |
| Cloreto de cobre.....    | 0,006 mg |
| Ácido tetra-acético..... | 150,0 mg |

Soluções de macronutrientes:

Solução 2

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Nitrato de sódio..... | 25,5 g |
|-----------------------|--------|

Solução 3

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Sulfato de magnésio..... | 14,7 g |
|--------------------------|--------|

Solução 4

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Fosfato de potássio..... | 1,044 g |
|--------------------------|---------|

## Solução 5

Bicarbonato de sódio..... 15,0 g

OBS: Todos os meios esterilizados à 121°C / 1 atm por 15-20 min.

### 4.3 Métodos

Inicialmente foram realizados procedimentos para verificar se as duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* selecionadas, necessitavam de fonte de lignina para descolorir o corante presente no efluente têxtil; posteriormente foram conduzidos experimentos para avaliar o potencial enzimático dos fungos; estudo com os metabólitos obtidos através do processo de biodegradação, em relação a atividade enzimática, potencial de toxicidade e caracterização dos produtos de degradação.

#### 4.3.1 Descoloração de efluente por *Pleurotus sajor-caju* em meio sólido

Para verificar a necessidade de um indutor (lignina) na degradação do corante presente no efluente, foi realizado um experimento utilizando efluente equalizado proveniente de indústria têxtil diluído em água destilada (1:1, v/v), sendo adicionado a este, 2% de ágar; (correspondente ao tratamento controle) e para o tratamento com lignina, foi adicionado mais 2% de bagaço de cana moído. As misturas foram autoclavadas à 121°C, 1 atm, durante 20 min e logo em seguida, aproximadamente 20 mL foram vertidas em placas de Petri.

Posteriormente, foi repicado um disco (0,5 cm  $\phi$ ) no centro da placa de Petri contendo micélio de *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 (F2) e *Pleurotus sajor-caju* PSC 94/03 (F6), procedentes de colônias com 8 dias de idade crescidas em meio MEA (malte, extrato de levedura, ágar). As placas foram incubadas no interior de estufa BOD, à 28°C, sob condição de escuro e após 30 dias, a descoloração do efluente foi avaliada através de reflectância.

O procedimento da avaliação de reflectância (medida de cor de objeto opaco) consistiu no uso de um 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 pelas letras “L” (cor variando de preto a branco), “a” (de verde a vermelho) e “b” (de azul a amarelo), numa escala compreendida entre 0 e 100 para o parâmetro “L” e -60 a +60, para os demais parâmetros (Anexo A – pag. 139).

#### **4.3.2 Descoloração de corante em bagaço de cana contendo efluente / corante técnico**

Foram colocados em frascos Erlenmeyers (125 mL), 5 g de bagaço de cana moído e 30 mL de efluente equalizado e para o outro tratamento, 30 mL de meio mínimo para fungos contendo corante índigo (0,02%). O material em triplicata foi autoclavado à 121°C, 1 atm, durante 20 min.

Posteriormente, foi adicionado a estes, três discos (0,5 cm  $\phi$ ) contendo micélio das duas linhagens de *P. sajor-caju* (F2 e F6), procedentes de colônias com 8 dias de idade crescidas em meio MEA e o controle consistiu em material sem inoculação dos

fungos citados. Os frascos foram incubados no interior de estufa BOD, à 28°C, sob condição de escuro.

Após a verificação visual de descoloração do material, foi adicionado 30 mL de água destilada e com auxílio de espátula, este foi homogeneizado e posteriormente filtrado em papel de filtro (Whatman n.1). A descoloração do corante presente no bagaço foi avaliada através do método de reflectância (item 4.3.1 – pag. 47), com o material que ficou retido no papel de filtro.

### **4.3.3 Influência do tempo de incubação dos fungos na descoloração do efluente**

#### **4.3.3.1 Preparo do material de incubação**

Foram colocados em frascos Erlemeyers (125 mL), 3,5 g de bagaço de cana fragmentado, 1,5 g de farelo de trigo e 30 mL de água. O material foi autoclavado à 121°C, 1 atm, durante 20 min.

Posteriormente, foi adicionado a estes, três discos (0,5 cm  $\phi$ ) contendo micélio das duas linhagens de *P. sajor-caju* (F2 e F6). O controle consistiu em material sem inoculação do fungo. Os frascos foram incubados no interior de estufa BOD, à 28°C, sob condição de escuro.

#### **4.3.3.2 Obtenção de extratos para determinação da atividade de enzimas ligninolíticas**

O líquido intersticial foi coletado, aos 7, 14 e 21 dias de incubação. Foi adicionado 30 mL de água destilada e o material foi homogeneizado com auxílio de espátula e em seguida filtrado em papel de filtro Whatman (n.1). O líquido obtido foi centrifugado a 2687,3 *g* por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase e manganês peroxidase – item 4.3.6 – pag. 52).

#### **4.3.3.3 Descoloração em meio sólido**

Foi adicionado aos frascos Erlemeyers contendo o material de incubação, aos 7, 14 e 21 dias, 15 mL de efluente líquido não-autoclavado. Em seguida homogeneizado com auxílio de espátula, e mantido na BOD 28°C, em condições de escuro, sendo posteriormente, a observação do tempo de descoloração total do material realizada, através de avaliação visual.

#### **4.3.3.4 Descoloração em meio líquido**

O extrato obtido segundo o item 4.3.3.2 (pag 50), foi misturado ao efluente líquido diluído em 4 concentrações diferentes, e a avaliação da descoloração realizada através de leitura de absorbância, com auxílio de espectrofômetro, 0 (zero) e 72 horas. O controle consistiu de extratos (obtidos das duas linhagens de *P. sajor-caju* - F2 e F6) fervidos à 100°C durante 20 min.

A determinação do comprimento de onda adequado para leitura da absorbância do material, foi realizada diluindo o efluente dez vezes no material obtido segundo o item 4.3.3.2 (pag. 50) (sete dias de incubação) e realizado posteriormente uma varredura através de espectrofotômetro.

#### **4.3.4 Obtenção de líquido intersticial para determinação do potencial Hidrogeniônico (pH), da atividade de enzimas ligninolíticas e execução dos testes de toxicidade.**

Foram colocados em frascos Erlemeyers (125 mL), 5 g de bagaço de cana moído e 30 mL de efluente equalizado e como controle, foi utilizado 30 mL de meio mínimo para fungos (para verificar se os metabólitos produzidos pelos fungos apresentam efeito tóxico). O material foi autoclavado à 121°C, 1 atm, durante 20 min.

Posteriormente, foi adicionado a estes, três discos (0,5 cm  $\phi$ ) contendo micélio dos fungos F2 e F6 e o controle abiótico consistiu em material sem inoculação do fungo. Os frascos foram incubados no interior de estufa BOD, à 28°C, sob condição de escuro.

Foi coletado amostras com intervalo de 3 dias, até a descoloração total do efluente, foi adicionado 30 mL de água destilada e o material foi homogeneizado com auxílio de espátula e em seguida filtrado em papel de filtro Whatman (n.1). O líquido obtido foi centrifugado a 2687,3 *g* por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para determinação de pH e determinação da atividade das enzimas ligninolíticas. Para a condução dos experimentos de toxicidade, foram empregadas amostras, obtidas após a descoloração total, aos 14, 20 e 40 dias de incubação.

#### **4.3.5 Determinação do potencial Hidrogeniônico**

A determinação de pH das amostras obtidas segundo o item 4.3.4 foi realizada com auxílio de pHmêtro (Hanna instruments HI 8314) calibrado com tampão a pH 4,0; 7,0 e 10,0.

#### **4.3.6 Determinação da atividade de enzimas ligninolíticas**

##### **4.3.6.1 Lacase (Szklarz et al.,1984, modificado)**

Foi realizada empregando-se siringaldazina como substrato enzimático. A mistura da reação foi composta de 0,6 mL de sobrenadante (obtido através da centrifugação do filtrado – 2687,3 g / 10min); 0,1 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0); 0,1 mL de água destilada e 0,1 mL de siringaldazina (0,1% em etanol).

A oxidação da siringaldazina ( $\epsilon_{525} = 65.000/\text{Mcm}$ ) até quinona foi acompanhada durante 10 min à 525 nm, sendo a atividade expressa em UI/L (unidade internacional/Litro - onde unidade internacional significa  $\mu\text{mol.min}$ )

##### **4.3.6.2 Manganês peroxidase (Kuwahara et al., 1984)**

A atividade desta enzima foi determinada avaliando-se a oxidação do vermelho de fenol ( $\epsilon_{610} = 4460 \text{ mol/cm}$ ) na presença de manganês e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A reação foi obtida mediante a mistura de 0,5 mL do extrato enzimático; 0,1 mL de lactado de sódio 0,25 M; 0,05 mL de  $\text{MnSO}_4$ ; 0,2 mL de albumina bovina 0,5%; 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%; 0,05 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tampão succinato de sódio 0,2 M pH 4,5. A mistura foi

incubada a 30°C por 5 min e a reação interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 N. A absorbância foi lida a 610 nm e a atividade expressa em UI/L.

#### 4.3.6.3 Peroxidase (Szklarz et al., 1984, modificado)

A determinação da atividade de peroxidase foi realizada, empregando-se a siringadazina como substrato enzimático. A mistura da reação foi composta de 0,6 mL de sobrenadante, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,0 mM e 0,1 mL de siringadazina (0,1% em etanol). A absorbância foi lida a 460 nm e a atividade expressa em UI/L.

O cálculo da atividade enzimática segue a fórmula:

$$\text{Enzima UI/L} = \frac{\Delta \text{Abs} \times 10^6}{\epsilon \times R \times T}$$

$$\epsilon \times R \times T$$

onde:

$\Delta \text{Abs}$  = Absorbância final - Absorbância inicial.

$\epsilon$  = coeficiente de extinção da enzima, dependente do comprimento de onda em que é lida (460 nm = 29400 L/M.cm, 525 nm = 65000 L/M.cm, 610 nm = 4460 L/M.cm).

R = volume, em mL, do sobrenadante utilizado na reação.

T = tempo de reação.

### 4.3.7. Avaliação da toxicidade empregando-se bioindicadores

#### 4.3.7.1 Teste com semente de alface (*Lactuca sativa* L.)

Os testes foram realizados utilizando-se procedimentos padronizados pelo National Water Research Institute (NRWI), verificando-se a inibição da germinação e a alongação da raiz após 48 horas de exposição (Dutka, 1989).

O material obtido segundo o item 4.3.4 (pag. 51), foi filtrado através de membrana (Millipore – 0,22 µm) e diluído nas concentrações de 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125 e 1.56 % em água destilada e 2 mL de cada solução foram utilizadas para embeber discos de papel de filtro (Whatman n.1) colocadas no interior de placas de poliestireno (9 cm φ). Para controle negativo de toxicidade, foram empregados 2 mL de água destilada. Foram colocadas em cada placa, 20 sementes de alface.

As placas foram incubadas em temperatura ambiente, envoltas em papel alumínio e após 48 horas, a avaliação da germinação das sementes e do tamanho das raízes germinadas foi realizada com auxílio de papel milimetrado. A porcentagem da variação de crescimento foi calculada segundo a equação:

$$\% \text{ var. crescimento} = \frac{\text{comprimento médio amostra} - \text{compr. médio controle}}{\text{compr. médio controle}} \times 100$$

O bioensaio com sementes de alface é um ensaio estático de toxicidade aguda (48 h de exposição) em que se avalia os efeitos fitotóxicos de um composto puro ou de uma mistura complexa no processo de germinação das sementes e no crescimento das raízes durante os primeiros dias de crescimento. Como pontos finais para a avaliação

dos efeitos fitotóxicos, se determina a inibição na germinação e a inibição na elongação da raiz. É importante destacar que durante a germinação e os primeiros dias de desenvolvimento da plântula, ocorrem numerosos processos fisiológicos na qual a presença de uma substância tóxica pode interferir, alterando a sobrevivência e o desenvolvimento normal das plantas.

#### **4.3.7.2 Teste com *Hydra attenuata***

Os testes de toxicidade aguda com *Hydra attenuata* foram realizados de acordo com os procedimentos padronizados pelo Centre Saint-Laurent (Blaise & Kusui, 1997)

O extrato obtido segundo o item 4.3.4 (pag. 51) foi filtrado através de filtro (Millipore) com poros de 0,22 µm.

Foi adicionado a estas soluções, cloreto de cálcio e tampão TES (N-tris (hidroximetil) ácido metil 1-2-aminoetanesulfônico e posteriormente ajustado o pH para  $7,0 \pm 0,1$  para manter o máximo de equilíbrio as condições necessárias para as *Hydras*.

As soluções foram diluídas em meio para *Hydras* nas concentrações de 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.56% e somente meio como controle. O experimento de toxicidade foi conduzido em microplacas de poliestireno contendo 12 “pocinhos” cada. Foram realizadas 3 repetições para cada concentração (4 mL por poço) e utilizadas 3 organismos para cada repetição. As avaliações foram realizadas diariamente até 96 horas após o início do experimento, sendo observadas a morfologia dos organismos com auxílio de estereoscópio. De acordo com a morfologia (na qual indica os níveis de toxicidade), foi elaborado uma tabela que aponta as concentrações que apresentam efeitos letais e subletais para cada tratamento utilizado.

A concentração limiar de toxicidade (LT) foi determinado de acordo com os valores de NOEC (concentração onde nenhum efeito foi observado) e LOEC (concentração onde foi observado menor efeito), seguindo a fórmula:

$$LM = (NOEC \times LOEC)^{1/2}$$

#### 4.3.7.3 Teste com alga

A alga *Selenastrum capricornutum* obtida da Coleção de Culturas Americana (ATCC n. 22662), foi transferida para meio de cultura 1x (preparado adicionando 1 mL de cada uma das soluções estoques 1000x para 1 L de água destilada e autoclavado posteriormente). A cultura foi incubada sob iluminação contínua com lâmpadas frias fluorescentes ( $4.000 \pm 10\%$  lux) à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e agitada manualmente por poucos segundos, três vezes ao dia. No quinto dia de repicagem, a população da alga foi enumerada com auxílio de hematocitômetro e microscópio óptico e 2 mL de meio foi ajustado para a concentração de  $2,6 \times 10^6$  cel./mL, sendo posteriormente adicionado 18 mL de meio 18x (preparado adicionando 18 mL de cada uma das soluções estoque 1000x para 1 L de água destilada). Obtendo-se portanto, 20 mL de solução com densidade de  $2,6 \times 10^5$  cel./mL.

O volume de 100  $\mu\text{L}$  desta solução, foi transferido para frascos contendo 2,5 mL de meio 1x (autoclavado), correspondendo ao tratamento controle e, para os frascos contendo as amostras obtidas segundo o item 4.3.4 (pag. 51), e filtradas em membrana (Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ ) nas diluições de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125% (a diluição foi realizada com meio 1x). Sendo que a concentração de algas no início do teste foi de  $1 \times 10^4$  cel./mL. Os frascos foram vedados com filme plástico transparente e incubados sob

condição de luminosidade contínua ( $4.000 \pm 10\%$  lux) , à 25°C por 72 h, sendo realizado agitação manual três vezes ao dia.

Após 72 horas, o teste foi avaliado realizado-se a contagem das células, empregando-se hematocítômetro com auxílio de microscópio óptico (Blaise et al., 2000).

#### **4.3.8 Caracterização de metabólitos secundários (3,4-dicloroanilina) através do uso de eletroforese capilar**

##### **4.3.8.1 Preparação da amostra**

Foram colocados em frascos Erlemeyers (125 mL), 5 g de bagaço de cana moído e 30 mL de efluente equalizado. O material foi autoclavado à 121°C, 1 atm, durante 20 min.

Posteriormente, foi adicionado a estes, três discos (0,5 cm  $\phi$ ) contendo micélio das duas linhagens de *P. sajor-caju* (F2 e F6). O controle abiótico consistiu em material sem inoculação do fungo. Os frascos foram incubados no interior de estufa BOD, à 28°C, sob condição de escuro.

Após 30 dias de incubação, foi adicionado 30 mL de água destilada, e o conteúdo dos frascos foi homogeneizado com auxílio de espátula sendo o material filtrado em papel de filtro Whatman (n.1). O filtrado obtido foi centrifugado a 2687, 3 g durante 15 min e o volume de 50 mL do sobrenadante foi concentrado em rota-evaporador a 60°C até aproximadamente 10 mL e em seguida, foi realizado o "clean-up" da amostra, passando em resina catiônica. Posteriormente, a amostra foi concentrada novamente em rota-evaporador a 60°C até a secagem completa e o

resíduo obtido foi ressuspenso em 5 mL de tampão borato 0,1 M pH 9,3, sendo novamente filtrado através de filtro (Millipore) com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Armas, 2002).

#### 4.3.8.2 Análise por fluorescência induzida por laser (LIF)

Para análise dos metabólitos por LIF, foi empregado um aparelho de Eletroforese Capilar Beckman P/ACE System 5510 (Laboratório de Cromatografia, IQSC/USP) equipado com lasers de íon-argônio de 488 nm e hélio-cádmio de 325 nm. Foram empregados capilares de sílica-fundida não tratada com 57,0 cm de comprimento total (c.t.), 50,0 cm de comprimento efetivo (c.e.) e 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno (d.i.) (Armas, 2002).

Segundo Molina & Silva (2001), foi efetuada a derivatização de 400  $\mu\text{L}$  da solução obtida segundo item anterior e padrão de 3,4-dicloroanilina em 100  $\mu\text{L}$  de tampão bicarbonato de sódio 0,65  $\text{mol L}^{-1}$  pH 8,7 com 500  $\mu\text{L}$  do agente derivatizante isocianato de fluoresceína “FITC” isômero I 98% 2  $\text{mmol L}^{-1}$  preparado em acetona. A mistura foi homogeneizada e mantida no escuro a 40°C por 5 horas, sendo, posteriormente, mantida a -20°C até a análise.

A separação foi realizada por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) em tampão tetraborato de sódio 5  $\text{mmol L}^{-1}$  acrescido de surfactante aniônico Triton X-100 20  $\text{mmol L}^{-1}$  e ácido bórico 4,5  $\text{mmol L}^{-1}$ ; pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção hidrodinâmica por 1 seg. a 0,5 psi; voltagem de 28 kV; detecção por fluorescência induzida por laser, com excitação em 488 nm e emissão em comprimentos de onda superiores a 520 nm.

#### **4.3.9 Análise de material através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As amostras de bagaço de cana contendo o efluente, tratadas e não tratadas pelos fungos F2 e F6, foram obtidas da mesma forma como descrito no item 4.3.8.1 (pag. 57) (30 dias de incubação), sendo o material de estudo, àquele retido no papel de filtro.

Segundo BAL-TEC, 1999 (modificado), as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído (2%) em tampão cacodilato de sódio (0,2 M pH 7,2). Em seguida foram desidratadas em banhos sucessivos de 10 min, em soluções de etanol de concentrações crescentes entre 30 e 100%, e submetidas a um tratamento crítico de pressão e temperatura (ponto crítico), no qual todo álcool das amostras, foi substituído gradualmente por CO<sub>2</sub>.

Posteriormente, as amostras foram tratadas com banho de ouro em Sputter Cater mod. SCD 050, para aumentar sua condutividade elétrica, e foram mantidas em dessecador até visualização em MEV.

As observações foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss, modelo 940 A), operando-se entre 10 e 15 kv de aceleração de corrente e uma distância de 15 mm entre as amostras e o filamento de tungstênio, em todas as análises. As imagens obtidas foram armazenadas em disquetes e posteriormente selecionadas.

#### **4.3.10 Obtenção de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de cana contendo efluente têxtil**

Foram colocados em sacos de polietileno, 100 g de bagaço de cana fragmentado e adicionados 500 mL de efluente líquido equalizado e para o tratamento controle, colocou-se 500 mL de meio mínimo para fungos. O material foi autoclavado a 121°C, 1 atm, durante 20 min. No dia seguinte, os sacos foram inoculados com 25 g de grão de trigo (4%) contendo micélio de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6) e estes foram incubados no interior de BOD, em condições de escuro, à 28°C. No décimo quarto dia de incubação, foram realizados pequenos furos nos sacos de polietileno, para permitir maior oxigenação e assim induzir a produção dos corpos de frutificação. A avaliação foi realizada através de análise visual, quatro dias após, observando-se a formação ou não dos mesmos.

#### **4.3.11 Análise estatística**

Para análise dos resultados, foi adotado o software "R: A Programming Environment for Data Analysis and Graphics", versão 1.7.1, 2003.

Os resultados de reflectância (variáveis L, a e b) dos experimentos de descoloração (dispostos em delineamento inteiramente casualizado) foram submetidos à transformação Box-Cox, quando necessário, e à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de médias de Tukey (pacote multcomp) a 5% de significância. Foram aplicados os testes de Bartlett para análise de homogeneidade de variância e de Shapiro-Wilk para normalidade dos resíduos.

Os experimentos de avaliação de atividade enzimática seguiram um delineamento inteiramente casualizado e foram analisados em um esquema fatorial (dias x tratamentos). Os resultados, transformados por Box-Cox, quando necessário, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e avaliação de normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação múltipla de médias adotou-se o teste de Tukey (função TukeyHSD, pacote base) ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores de  $CE_{50}$  para as variáveis percentual de germinação de sementes e alongação de raízes de alface foram calculados a partir de regressão polinomial de ordem 1, 2 ou 3, enquanto que para a variável percentual de inibição de crescimento de algas, os valores de  $CE_{50}$  foram obtidos a partir de regressão logarítmica.

Para avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de amostras teste em relação ao controle (concentração zero), para os bioensaios com alface e alga, adotou-se os seguintes procedimentos. Para os dados com homocedasticidade e normalidade, transformados ou não por Box-Cox ou  $\log(e)$ , utilizou-se ANOVA e comparação múltipla pelo método de Dunnett (pacote multcomp) a 5% de significância. Para os casos com presença de valores zero, onde não foi possível uma transformação normalizadora ou homogeneizadora de variâncias, adotou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla não paramétrica de Behrens-Fisher (pacote npmc) a 5% de probabilidade.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Descoloração de efluente por *P. sajor-caju* em meio sólido

Após a inoculação do fungos, as placas de Petri contendo o efluente diluído com e sem bagaço de cana foram avaliadas através de análise visual, verificando-se a descoloração completa do efluente por volta dos trinta dias somente nas placas que continham o bagaço de cana. O crescimento do micélio dos fungos foi similar nos dois tratamentos, no que se refere a velocidade e morfologia, a diferença observada, é que nas placas onde somente havia efluente diluído, o meio de cultura manteve-se da mesma cor comparado ao controle, onde o fungo não havia sido inoculado. Já nas placas, onde havia bagaço de cana, pôde ser verificado a descoloração completa do efluente, onde a cor azulada deste deixou de existir, apresentando-se o meio numa coloração clara (Figura 04). De acordo com os resultados deste experimento, podemos supor que os fungos empregados, necessitam de uma fonte de lignina para promoverem a descoloração do corante presente no efluente da indústria têxtil em estudo. Isto indica que o sistema implicado com a descoloração é indutivo e ligninolítico, resultados semelhantes foram observados por Platt et al. (1985) na descoloração do corante polivinalina antraquinona sulfonada (poly blue) por *Pleurotus florida* que só ocorreu quando o fungo foi previamente cultivado em substrato contendo palha de algodão.



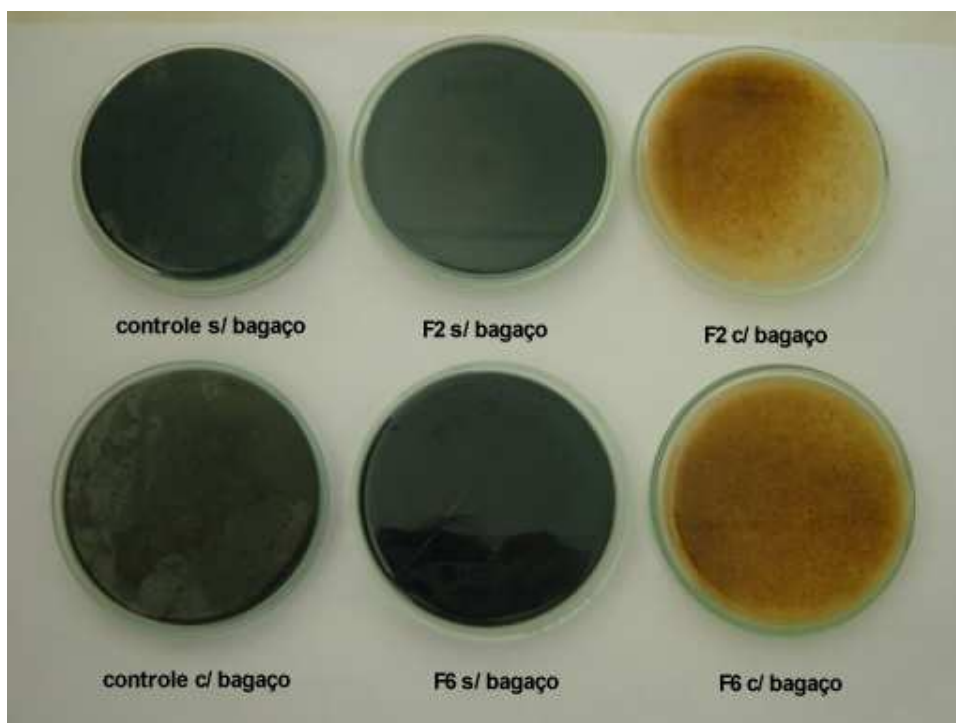


Figura 04 - Descoloração de efluente têxtil diluído 50%, acrescidos ou não de bagaço de cana por *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6).

A análise visual comprovada através de ilustração, fornece resultados precisos, mas entretanto, não se obtêm dados comparativos para que seja possível serem realizados análises estatísticas e assim tornar os resultados mais confiáveis. Mediante a carência deste tipo de informação, foi realizado também, leituras de reflectância, onde com o auxílio de um aparelho, um feixe de luz foi emitido sobre o material e em seguida, o brilho capturado, fornecendo dados representados pelas letras L, a e b em uma escala tridimensional, como descrito no item 4.3.1 (pag. 47).



De acordo com a Figura 05, onde podemos observar a distribuição dos pontos relativos a cada tratamento (3 repetições) em escala tridimensional (L, a, b), verificamos que as placas contendo efluente sem bagaço de cana inoculados com os fungos, onde não foi observada a descoloração, estão representadas por pontos localizados próximos aos pontos representados pelas placas controle (sem fungo). Entretanto, as placas contendo efluente com bagaço inoculadas, estão representadas por pontos distantes ao controle, implicando no fato de apresentarem coloração diferente.

Os dados foram dispostos tridimensionalmente na Figura 05, para permitir uma melhor comparação entre os tratamentos, e é conveniente comentar que os dados apresentaram diferenças significativas como pode ser observado na Tabela 09 (Anexo C – pag. 144), onde apresentam dados de análises estatísticas.

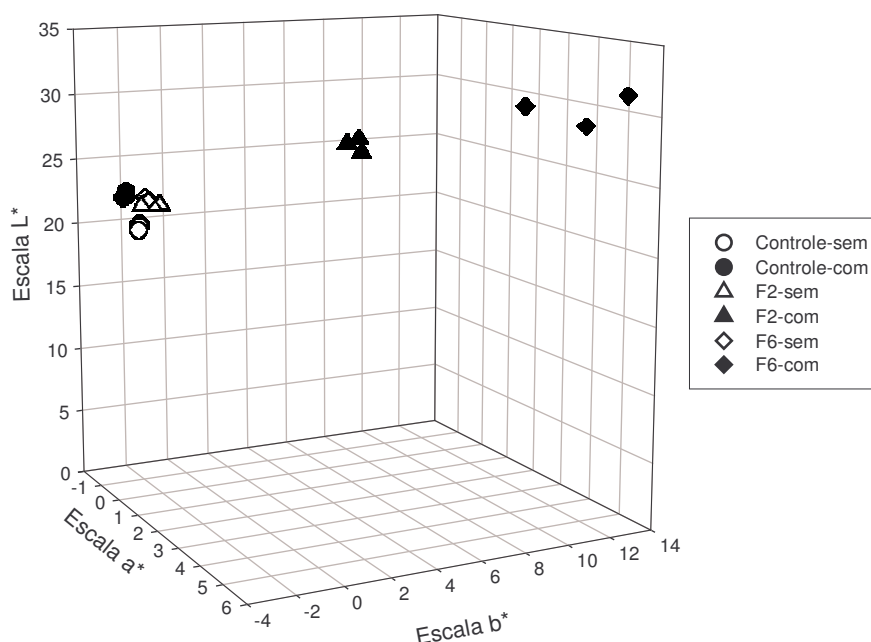


Figura 05 - Escala tridimensional de dados referentes aos parâmetros L, a, b obtidos através de reflectância, do efluente diluído 50 %, acrescidos ou não de bagaço de cana, tratados com *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6).

## 5.2 Descoloração de corante em bagaço de cana contendo efluente / corante técnico

Após ter verificado a necessidade de fonte de lignina para que os fungos possam promover a descoloração do corante, foram testadas várias proporções de bagaço de cana e efluente, afim de poder estudar e avaliar o processo de descoloração em condições apropriadas e com maior eficiência, de modo que o bagaço não ficasse muito encharcado ou seco, condições estas, desfavoráveis para o crescimento do *P. sajor-caju*. Foi escolhida portanto, a proporção de 5 g de bagaço de cana seco e fragmentado para 30 mL de efluente líquido ou meio mínimo contendo o corante (0,02%).

Foi avaliado a descoloração do corante índigo, na forma purificada e diluída em meio mínimo para fungos, nas mesmas condições utilizadas para o efluente, para verificar se os fungos apresentam a capacidade de descolorir o referido corante, responsável pela coloração azul do efluente coletado na indústria têxtil.

A descoloração total, tanto do efluente quanto do corante técnico foi observada aproximadamente aos 15 dias de incubação, através de análise visual dos frascos contendo os fungos (F2 e F6) (Figura 06). O padrão de descoloração do corante foi semelhante para os dois tipos de materiais, sendo o corante técnico mais facilmente descolorido por apresentar menor intensidade de cor.

Para realizar as análises através de reflectância, houve a necessidade de retirar o material dos frascos, pois o feixe de luz do aparelho deve incidir diretamente, sem a interferência de vidro ou qualquer outro material (Figura 07).

Nota-se uma aspecto diferente em relação ao bagaço ainda contido nos frascos, pois segundo o metodologia empregada, foi adicionado água destilada, homogeneizada

e em seguida filtrada em papel de filtro, procedimentos estes, que fragmentaram o micélio dos fungos, deixando o material de forma homogênea.

O bagaço contendo o efluente sem o tratamento pelos fungos, apresentou uma coloração esverdeada devido ao fato do corante ser azul e misturada com o bagaço que possui coloração palha. Enquanto que o material tratado pelo fungos, apresentou uma coloração alaranjada, devido a biodegradação do corante presente no efluente.

Chaudhari (2003), avaliou a descoloração de efluente contendo corante vat (índigo), utilizando um consórcio de bactérias em condições anaeróbias em reatores semi-contínuo, operando em vários tempos de retenção, e verificou que o corante índigo necessitou 5 dias de retenção para descolorir 95%.

Balan & Monteiro (2001a,b) estudaram a descoloração do corante índigo em meio de cultura líquido por quatro espécies de fungos basiodimicetos e verificaram que *Pleurotus sajor-caju* descoloriu 94% após 4 dias de incubação.

Ranzani (2002), realizou estudos com várias espécies de *Pleurotus* para descolorir dois corantes utilizados na indústria têxtil (índigo carmina e preto enxofre) e selecionou duas espécies de *Pleurotus sajor-caju* para degradar lodo têxtil misturado com bagaço de cana e folha de bananeira. Verificou que após 30 dias de incubação, os fungos descoloriram totalmente o material, reduzindo o valor de vários parâmetros, como DQO, fenóis, fibra detergente neutro (FDN) e fibra detergente ácido (FDA).



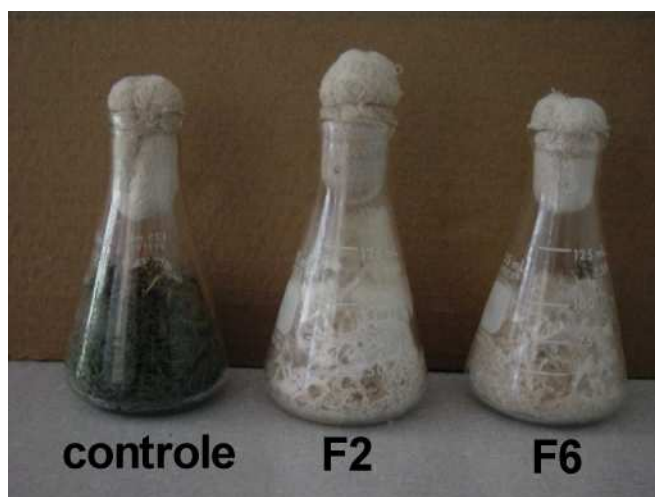


Figura 06 - Bagaço de cana misturado com efluente têxtil, inoculados com *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6) com 15 dias de incubação.



Figura 07 - Material homogeneizado a partir de bagaço de cana misturado com efluente têxtil, inoculados com *Pleurotus sajor-caju* com 15 dias de incubação.



De acordo com os resultados obtidos através da reflectância, segundo a Figura 08, pertinentes ao experimento com meio mínimo contendo corante técnico e a Figura 09, pertinentes ao experimento com o efluente líquido, podemos notar um comportamento similar na distribuição dos pontos representados pelos tratamentos, onde o material tratado pelos fungos, tanto o F2 como o F6 apresentam-se distantes do controle, confirmando o fato de apresentarem colorações distintas.

A significância dos dados, obtido por análises estatísticas estão ilustrados nas Tabelas 01 e 05 (Anexo C – pags. 142 e 143).

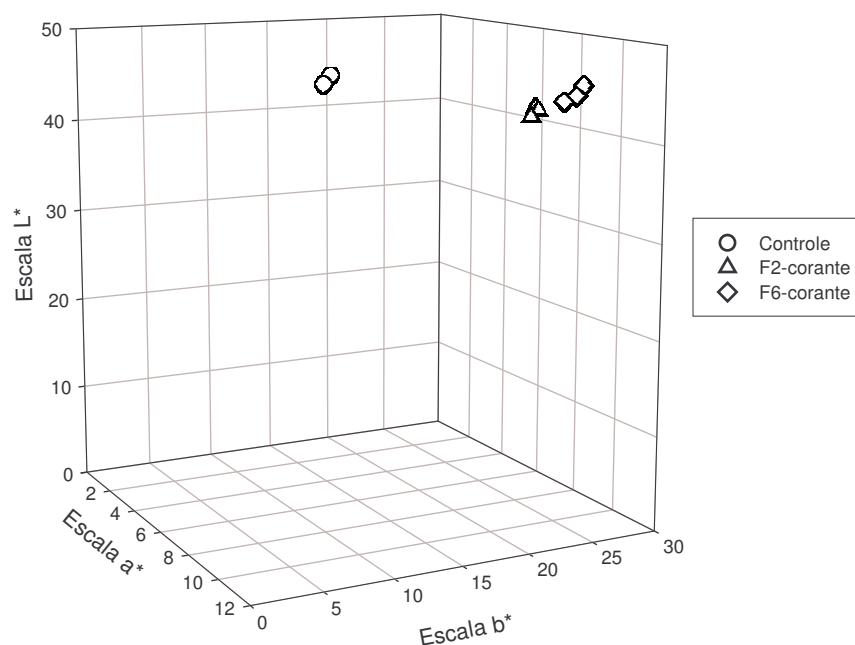


Figura 08 - Escala tridimensional de dados referentes aos parâmetros L, a, b obtidos através de reflectância, de bagaço de cana misturado com corante índigo tratado com *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6).

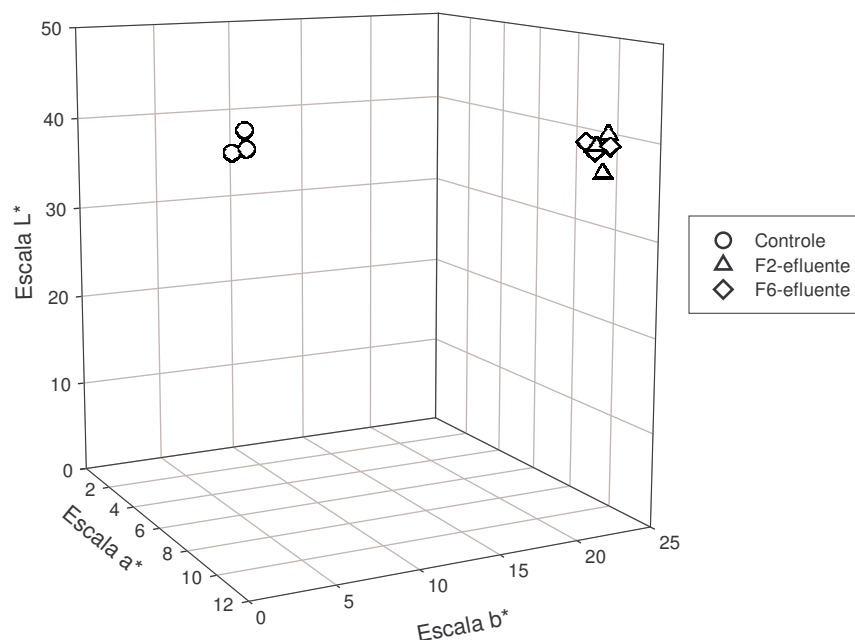


Figura 09 - Escala tridimensional de dados referentes aos parâmetros L, a, b obtidos através de reflectância, de bagaço de cana misturado com efluente tratado com *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6).

### 5.3 Influência do tempo de incubação dos fungos na descoloração do efluente e na produção de enzimas ligninolíticas

O bagaço de cana foi suplementado com farelo de trigo, o qual trata-se de um material de baixo custo, para promover um melhor crescimento dos fungos, pois no bagaço encharcado somente com água destilada, não foi observado o crescimento do micélio da mesma forma àqueles crescidos no efluente, quanto ao aspecto de vigor e velocidade.

### 5.3.1 Produção de enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase e MnP)

Foi verificado a atividade de enzimas ligninolíticas pelas duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* nos três períodos de incubação (7, 14 e 21 dias), sendo observado praticamente a mesma tendência para ambas em relação a produção destas.

Em relação a enzima lacase (Figura 10), observamos uma maior atividade aos 14 dias de incubação, onde verificamos pico de produção para F2 (11,88 UI/L) e para F6 (14,18 UI/L).

Para enzima peroxidase (Figura 11), notamos um comportamento um pouco diferente, pois o pico de produção para o F2 foi aos 21 dias de incubação (13,33 UI/L) e para o F6 aos 14 dias (12,95 UI/L).

No caso da enzima manganês peroxidase (MnP) (Figura 12), o pico de produção dos dois fungos, foi observado logo no sétimo dia de incubação (F2 13,49 e F6 18,25 UI/L).

Observamos que a maioria dos picos de produção das enzimas avaliadas ocorrem até o décimo quarto dia de incubação, e partir desta data, provavelmente a tendência, é que diminua a produção destas.

De acordo com teste estatístico de Tukey (5%) (Tabelas 13, 14 e 15 - Anexo C pag. 145), não foi verificado diferença entre os valores para os dois fungos, diferindo somente do tratamento controle.

Lang et al. (1998), estudaram a produção de enzimas ligninolíticas utilizando palha de trigo como substrato e verificaram que o micélio de *Pleurotus* sp., leva 14 dias para colonizar todo o substrato, e que as enzimas lacase e manganês peroxidase são detectadas neste período.

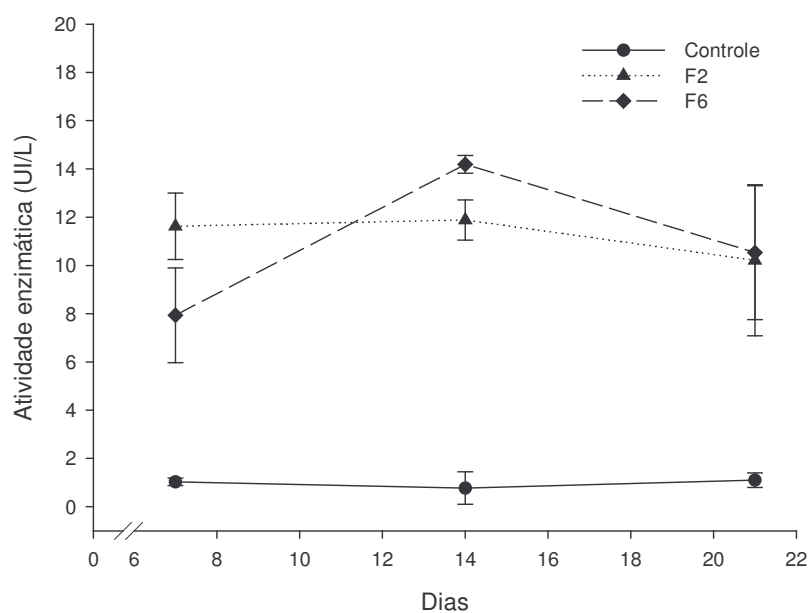


Figura 10 - Atividade enzimática de lacase em extratos obtidos através do crescimento de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6) em bagaço de cana suplementado com farelo de trigo.

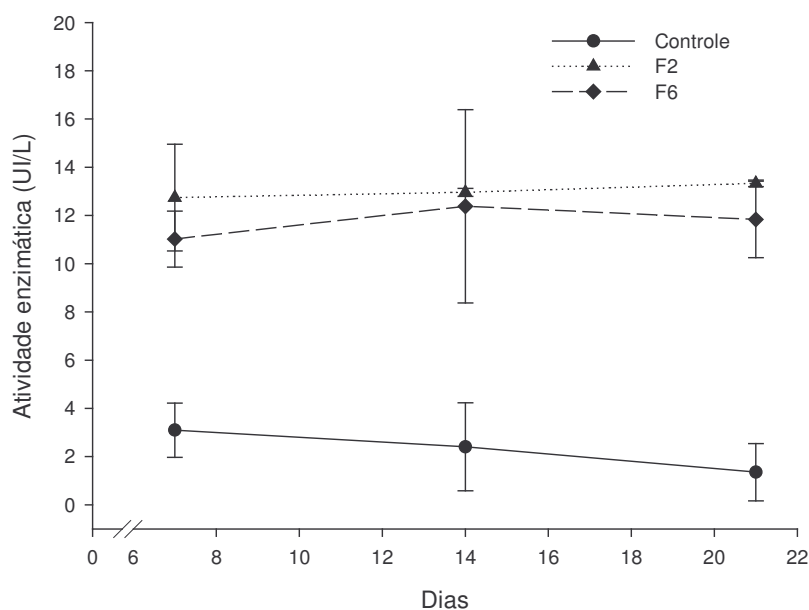


Figura 11 - Atividade enzimática de peroxidase em extratos obtidos através do crescimento de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6) em bagaço de cana suplementado com farelo de trigo.

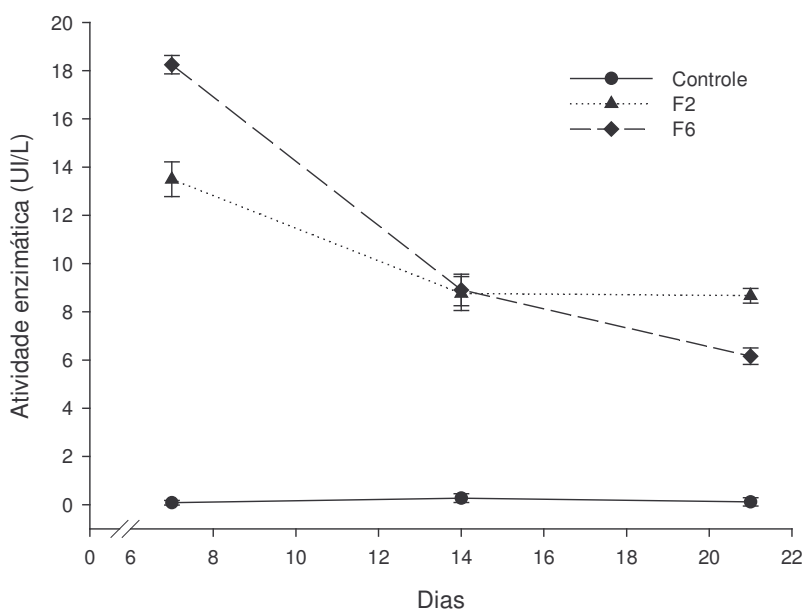


Figura 12 – Atividade enzimática de MnP em extratos obtidos através do crescimento de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6) em bagaço de cana suplementado com farelo de trigo.

### 5.3.2 Descoloração em meio sólido

Verificando-se o potencial da produção de enzimas ligninolíticas pelas duas linhagens de *Pleurotus* empregadas, em três tempos de incubação (7, 14 e 21 dias). Procurou-se então avaliar, se existe uma relação entre o potencial de descoloração e atividade enzimática.

Após ter colocado o efluente líquido nos frascos junto com o inóculo, houve a necessidade de homogeneizar o material com auxílio de espátula, com a finalidade do micélio dos fungos ficarem o mais uniforme possível em contato com o material a ser descolorido. No sétimo dia, o material foi homogeneizado novamente, com o mesmo objetivo.

Através de análise visual, foi observado o crescimento de novo micélio sobre o material e concomitante descoloração do efluente, sendo que nos frascos incubados aos 7 e 14 dias, a descoloração total foi observada 9 dias após ter colocado o efluente e aos 21 dias, o mesmo foi somente observado no décimo primeiro dia, necessitando portanto de dois dias adicionais de incubação. Tal comportamento foi observado da mesma forma para as duas linhagens de *Pleurotus* (F2 e F6).

Ao tentarmos relacionar estes resultados com o potencial enzimático avaliado, verificamos que a atividade das enzimas MnP e lacase decrescem de acordo com o tempo de incubação, sendo este comportamento observado principalmente com a enzima MnP. Se considerarmos que as enzimas contribuem ou são responsáveis pela descoloração do efluente, o tempo maior de descoloração requerido nos frascos com 21 dias de incubação, provavelmente, deve-se a diminuição da atividade destas enzimas ligninolíticas.

### **5.3.3 Descoloração em meio líquido**

Houve a necessidade de se fazer uma varredura do efluente, com auxílio de espectrofômetro, para determinar o comprimento de onda a ser utilizado para verificar a porcentagem de descoloração das amostras neste experimento. Segundo o espectro obtido (Anexo B – pag. 141), a absorbância máxima foi observada no comprimento de onda de 665 nm, sendo então este empregado para as leituras do material de incubação misturados ao efluente líquido.

O objetivo deste experimento foi verificar se o extrato enzimático obtido através da incubação dos fungos em bagaço de cana suplementado com farelo de trigo,

quando misturados ao efluente líquido, seria capaz de promover a descoloração do corante sem a presença de suporte sólido ligninolítico ou células fúngicas.

Os extratos utilizados foram com 7, 14 e 21 dias de incubação e posteriormente a mistura destes com as diferentes concentrações do efluente, foi realizada a primeira leitura em espectrofotômetro, correspondendo a zero hora, após o período de 72 h, outra leitura foi realizada novamente para verificar a possível descoloração.

Não foi observado o processo de descoloração de forma eficiente e significativa, como pode se visto na Tabela 01, onde verificamos que a porcentagem de descoloração de muitas amostras foram iguais a zero, e as que apresentaram algum potencial, não passou de 28,37% (extrato de F2 misturados a 0,4 mL de efluente, com 14 dias de incubação, lidos após 72 horas).

De acordo com estes resultados, podemos supor que existe a necessidade de um suporte sólido de natureza ligninolítica ou a presença de micélio, para que os fungos empregados sejam capazes de promoverem a descoloração do efluente têxtil.

Segundo o trabalho de Ranzani (2002), onde testou a descoloração do corante índigo em meio líquido por várias espécies de *Pleurotus*, constatou que a descoloração observada foi decorrente da adsorção do corante ao micélio dos fungos, sendo a presença de uma fonte de lignina imprescindível para que ocorra a descoloração.

Resultados semelhantes foram obtidos por Knapp et al. (1995), que estudaram a descoloração/degradação de 14 corantes, e concluíram que a descoloração poderia estar associada à adsorção do corante à biomassa fúngica e, nesse caso, quando a adsorção ocorreu, o exame do espectro de absorção da luz revelou que todos os picos haviam diminuído proporcionalmente e, quando a degradação ocorreu, houve completa

remoção dos picos ou mudanças significativas no espectro. A adsorção também foi visualizada na inspeção da massa micelial colorida.

Tabela 01 - Efeito de extratos obtidos através da incubação de *Pleurotus sajor-saju* (F2 e F6) em bagaço de cana suplementado com farelo de trigo na descoloração de efluente líquido.

| Tratamento | Extrato<br>enzimático :<br>efluente (v/v) | % descoloração   |         |         |                       |         |         |
|------------|-------------------------------------------|------------------|---------|---------|-----------------------|---------|---------|
|            |                                           | Leitura a 0 hora |         |         | Leitura após 72 horas |         |         |
|            |                                           | 7 dias           | 14 dias | 21 dias | 7 dias                | 14 dias | 21 dias |
| F2         | 4:2                                       | 0                | 4,42    | 0       | 8,33                  | 11,90   | 16,19   |
|            | 4:1                                       | 0                | 10,34   | 0       | 0                     | 0       | 16,73   |
|            | 4:0,4                                     | 3,16             | 13,90   | 8,95    | 14,44                 | 28,38   | 0       |
|            | 4:0,2                                     | 0                | 25,64   | 18,52   | 26,03                 | 0       | 10,45   |
| F6         | 4:2                                       | 0                | 0,17    | 0,52    | 0                     | 0       | 0       |
|            | 4:1                                       | 0                | 2,07    | 0       | 0                     | 0       | 0       |
|            | 4:0,4                                     | 0                | 10,74   | 8,18    | 14,28                 | 10,46   | 16,17   |
|            | 4:0,2                                     | 0                | 19,29   | 16,04   | 0                     | 17,73   | 0       |

#### **5.4 Estudo dos metabólitos obtidos através do processo de biodegradação, em relação a atividade enzimática, potencial de toxicidade e caracterização dos produtos de degradação**

Foram extraídos no intervalo de três em três dias após a inoculação até a descoloração total (15 dias), o líquido intersticial do bagaço de cana contendo o efluente têxtil. A Figura 13 refere-se ao material obtido no décimo quinto dia, onde pode ser observado a diferença na coloração dos extratos, sendo que o material tratado pelos fungos apresentaram cor alaranjada e o não tratado, a cor azulada escura característica do efluente. O material obtido em cinco intervalos de tempos (3, 6, 9, 12 e 15 dias) foram utilizados para verificar a variação de pH e a atividade das enzimas ligninolíticas lacase, peroxidase e MnP.

O tratamento correspondente ao bagaço de cana contendo meio mínimo para fungos com glicose, teve por finalidade, verificar se o fungos estudados produziram compostos que viessem a causar toxicidade nos biondicadores, mesmo na ausência do efluente têxtil. Ao invés de utilizar farelo de trigo como no item 4.3.3.1 (pag. 49), empregou-se meio mínimo com glicose, uma fonte de carbono simples, para fornecer condições favoráveis ao crescimento dos fungos, e também com o objetivo de minimizar qualquer efeito que pudesse influenciar nos resultados dos experimentos referentes a toxicidade.

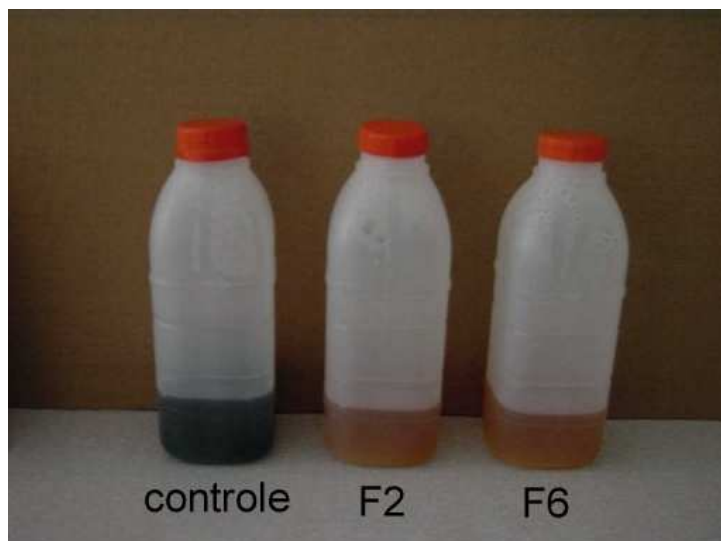


Figura 13 - Extratos obtidos através da incubação de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6) em bagaço de cana contendo efluente têxtil após descoloração total.

#### 5.4.1 Monitoramento de pH

Segundo os dados obtidos pela medida de pH, podemos observar na Figura 14 que o efluente não tratado pelos fungos manteve o pH estável na faixa de 9, enquanto nos tratamentos onde o fungo estava presente, pôde ser observado outro comportamento, onde verificou-se a diminuição do pH no decorrer do tempo. Nos extratos obtidos através dos fungos incubados em bagaço de cana contendo meio mínimo com glicose, observou-se valores de pH menores quando comparados com as amostras contendo efluente.



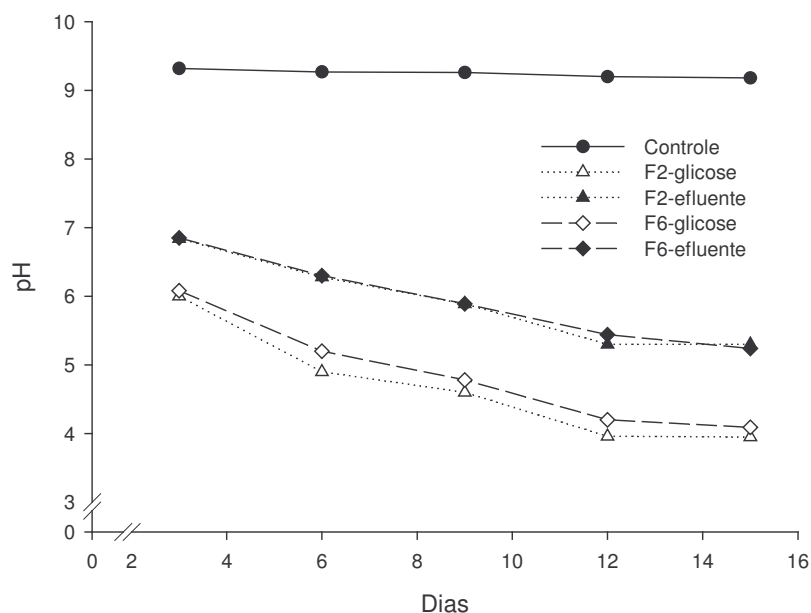


Figura 14 - Potencial hidrogeniônico de extratos obtidos através da incubação de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6) em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose.

#### 5.4.2 Atividade enzimática

De acordo com as Figuras 15, 16 e 17, verificamos que, na grande maioria das determinações enzimáticas, os extratos obtidos através do crescimento dos fungos em bagaço de cana contendo meio mínimo com glicose, apresentaram atividade enzimática menor, comparado aos fungos incubados na presença do efluente têxtil, provavelmente, o fato observado deve-se a necessidade do fungo em produzir mais enzimas, para promover a degradação do efluente.

Os resultados obtidos através da determinação da enzima lacase são visualizados na Figura 15 e pudemos observar pico de produção aos nove dias de incubação para todos os tratamentos, na qual os fungos incubados na presença do

efluente apresentaram valores de 13,65 UI/L (F2) e 11,41 UI/L (F6) (estes valores diferiram estatisticamente de acordo com Teste de Tukey - 5%) (Tabela 16 – Anexo C pag. 146).

O mesmo comportamento foi verificado em relação a enzima peroxidase (Figura 16), onde o pico de produção enzimática também foi observado aos nove dias de incubação. O F2 incubado na presença do efluente apresentou valor de 14,57 UI/L e F6 15,21 UI/L.

No caso da enzima MnP (Figura 17), observamos o pico de produção enzimática no décimo segundo dia de incubação, sendo interessante ressaltar, que tal fato foi observado três dias antes de ser verificado descoloração total do efluente. O valor de atividade obtido pelo F2 incubado na presença do efluente foi de 11,68 UI/L e para o F6 foi de 10,58 UI/L.

De acordo com os resultados obtidos, verificamos que existe a produção de enzimas ligninolíticas quando incubamos os fungos em bagaço de cana contendo efluente têxtil, fato este, que nos leva a supor que estas estão envolvidas no processo de descoloração e que, a lacase, peroxidase e manganês peroxidase tem influência neste processo, pois apresentam atividade em todo o período de incubação estudado.

Harazono et al. (2003) estudaram a descoloração de corantes azo reativos (vermelho reativo 120) pelo fungo *Phanerochaete sordida* em meio de cultura líquido, e verificaram a descoloração de 90,6% no sétimo dia de incubação, sendo que a atividade de manganês peroxidase foi detectada durante este processo.

Nyanhongo et al. (2003) compararam a habilidade de quatro fungos ligninolíticos (*Trametes modesta*, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor* e *Sclerotium rolfsii*) na produção de lacase, sendo que esta enzima foi testada para descolorir oito corantes

sintéticos (antraquinona, azo, índigo, triarilmetano entre outros), verificando-se que a melhor espécie foi *T. modesta*, onde a lacase deste fungo apresentou melhores condições de descoloração na faixa de pH entre 3 e 6.

A reação entre peroxidases ligninolíticas extracelulares produzidas por *Phanerochaete chrysosporium* e o corante índigo carmina foi estudado por Podgornik et al. (2001), sendo verificado a influência de manganês peroxidase e lignina peroxidase no processo de descoloração. E apesar de ambas as enzimas apresentarem este potencial de descoloração, o processo é observado com mais rapidez através da reação com MnP.

Chagas & Durrant (2001) estudaram a descoloração de corante azo por *P. chrysosporium* e *Pleurotus sajor-caju* em meio de cultura sólido, e verificaram que *P. chrysosporium* descoloriu parcialmente todos os corantes testados, enquanto que *P. sajor-caju* descoloriu totalmente os corantes amaranço, novo coccine e laranja G e 60% o corante tartrazina. As enzimas manganês peroxidase e  $\beta$ -glicosidase parecem estar envolvidas na descoloração dos corantes por *P. chrysosporium*, enquanto que para *P. sajor-caju*, a atividade de lacase provavelmente está envolvida neste processo.

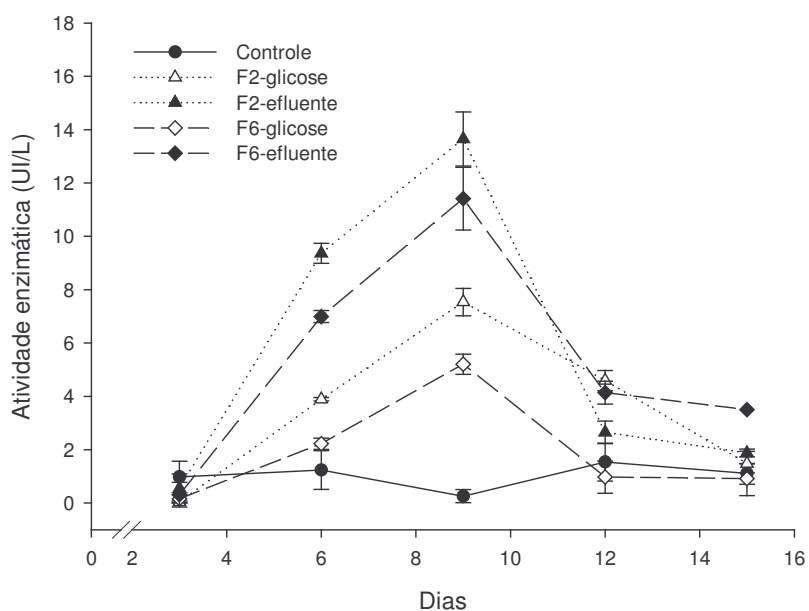


Figura 15 - Atividade enzimática de lacase em extratos obtidos através da incubação de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6) em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose.

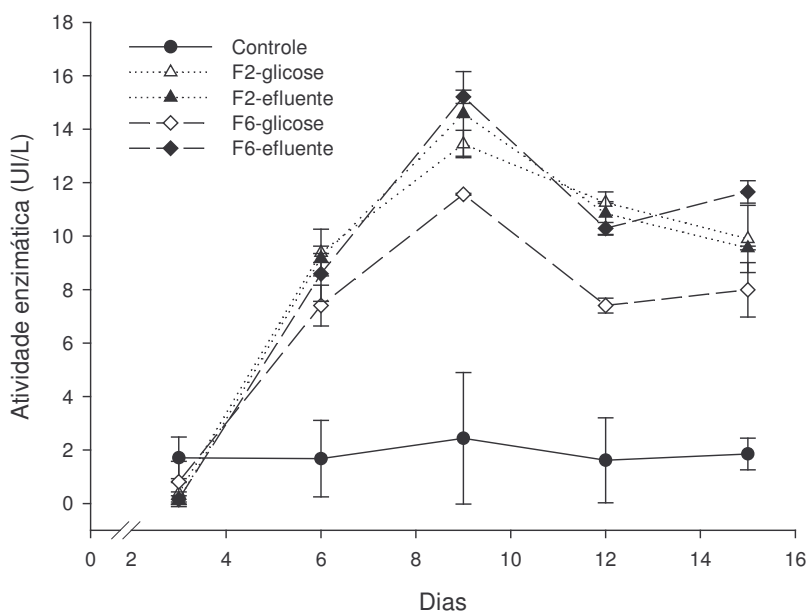


Figura 16 - Atividade enzimática de peroxidase em extratos obtidos através da incubação de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6) em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose.

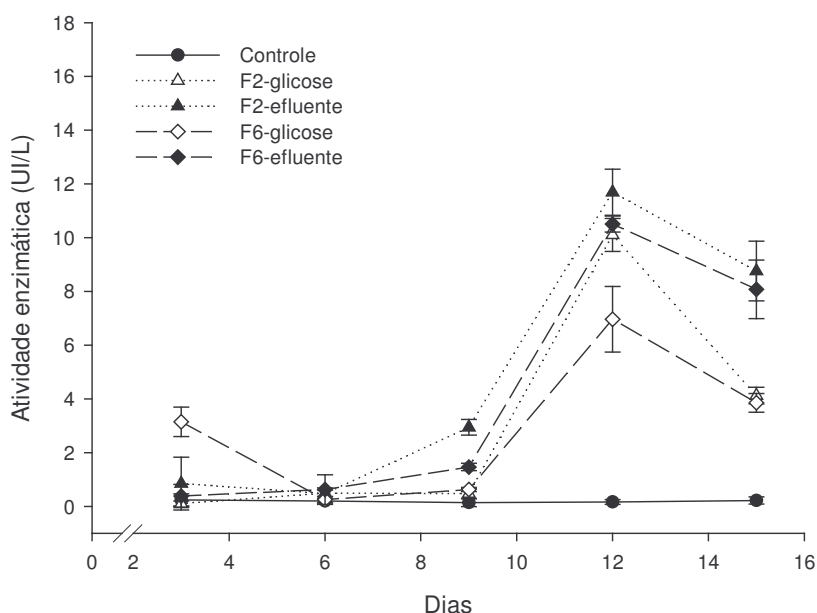


Figura 17 - Atividade enzimática de MnP em extratos obtidos através da incubação de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6) em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose.

#### 5.4.3 Testes de toxicidade

Foram realizados os testes de toxicidade com amostras obtidas segundo o item 4.3.4 (pag. 51), após a descoloração total do efluente, com 14, 20 e 40 dias de incubação. Através de ensaios preliminares com os bioindicadores, verificou-se que as amostras onde o efluente estava presente obtidas logo após a descoloração completa (14 dias), apresentaram efeito tóxico superior às aquelas não tratadas com os fungos. Devido a esta observação, foram realizados testes com material incubados por 14 dias e também com outros intervalos de tempo, como 20 e 40 dias, para verificar se os supostos compostos tóxicos obtidos através do processo de biodegradação pudessem ser mineralizados com um tempo maior de incubação e assim eliminar ou diminuir a toxicidade observada.

#### 5.4.3.1 Sementes de alface

Nas Figuras 18 a 23, podemos observar o efeito dos extratos sobre a germinação das sementes e alongação das raízes, de acordo com uma escala crescente de concentração. Na Tabela 02, verificamos a concentração efetiva que causou 50% de inibição da germinação e alongação das raízes de alface ( $CE_{50}$ ), a equação correspondente a curva de regressão na qual foi estimada a  $CE_{50}$  (quando possível foi calculado) e o valor de  $r^2$  da equação.

No período de 14 dias de incubação, não foi verificado efeito tóxico significativo sobre a germinação das sementes e alongação das raízes como pode ser observado nas Figuras 18 e 19, fato este que não permitiu o cálculo para obtenção dos valores de  $CE_{50}$ .

As sementes de alface apresentaram sensibilidade em relação aos extratos obtidos pelo crescimento dos fungos em bagaço de cana com meio mínimo e glicose no material incubado por 20 dias, pois estes causaram expressiva inibição na germinação das sementes e na alongação das raízes (Figuras 20 e 21). Observamos que a toxicidade diminui com o material incubado por 40 dias (Figuras 22 e 23).

De acordo com as Figuras 20, 21, 22 e 23, podemos observar uma tendência de que o efluente tratado pelos fungos causaram uma inibição maior em relação ao efluente não tratado sobre os parâmetros avaliados.

Os valores de  $CE_{50}$  confirmam esta tendência, como pode ser verificado na Tabela 02, onde aos 20 dias de incubação os valores referentes ao percentual de inibição de germinação para o efluente tratado com o fungo F2 foi de 27,71% e para o fungo F6 foi de 27,08% comparado ao efluente não tratado que não apresentou inibição

de 50% em nenhuma de suas concentrações. Ainda para este parâmetro, no material com 40 dias de incubação, o efluente tratado com F2 apresentou  $CE_{50}$  de 37,27% e F6 41,69%, novamente comparado ao efluente que também não apresentou inibição de 50%.

Em relação ao parâmetro onde foi avaliado a inibição de alongação das raízes, no tempo de incubação correspondente a 20 dias, o valor de  $CE_{50}$  do efluente não tratado foi de 43,73%, enquanto que o tratado com F2 foi de 23,49% e F6 16,05%. No material incubado por 40 dias, o efluente tratado com F2 apresentou valor de  $CE_{50}$  de 37,27% e o tratado com F6 36,58%, sendo que o efluente não tratado novamente não apresentou inibição de 50% em nenhuma de suas concentrações.

De acordo com os resultados obtidos através deste bioensaio, verificamos que nos tempos de 20 e 40 dias de incubação, o efluente tratado pelos fungos F2 e F6 apresentou maior toxicidade em relação aos parâmetros avaliados na semente de alface, quando comparados ao material correspondente ao efluente sem tratamento.

As significâncias obtidas através de análise estatística dos efeitos de diferentes concentrações de amostra (efluente, efluente tratado pelos fungos, extrato de fungos crescidos com glicose) sobre o percentual de germinação de sementes de alface em relação ao controle encontram-se na Tabela 19 (Anexo C – pag. 148) e sobre o percentual de alongação de raízes na Tabela 20 (Anexo C – pag. 149).

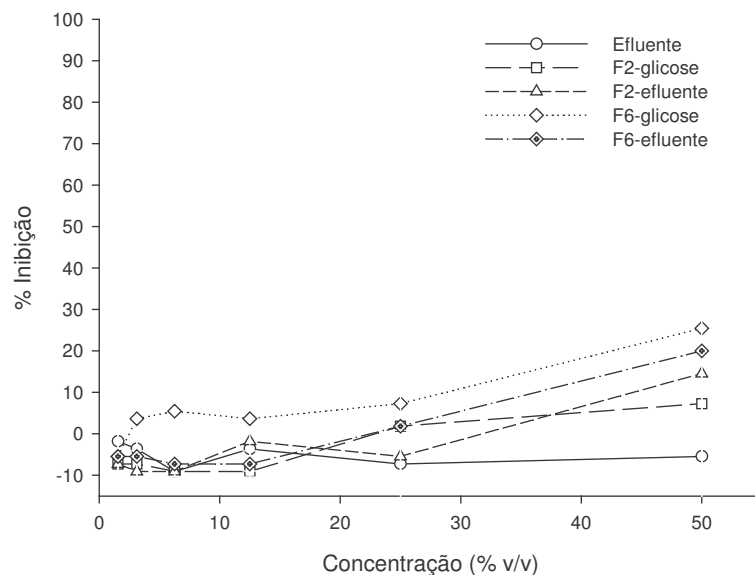


Figura 18 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 14 dias, de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na germinação de sementes de alface.

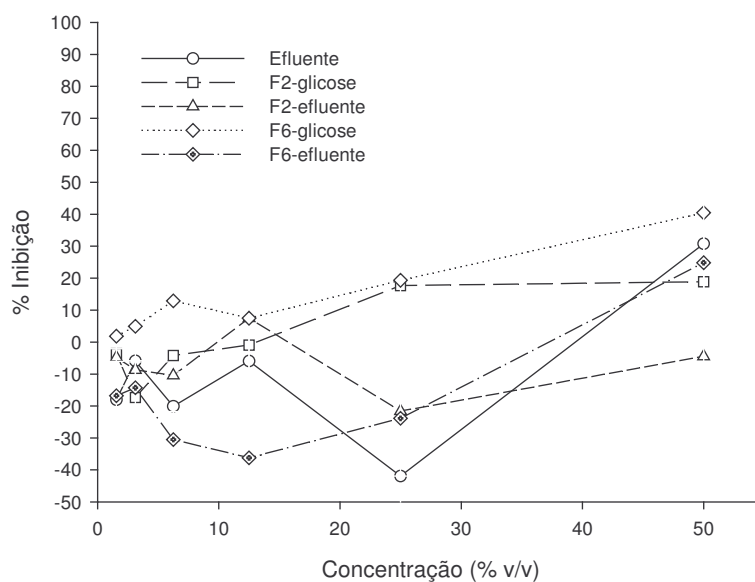


Figura 19 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 14 dias, de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na elongação de raízes de alface.

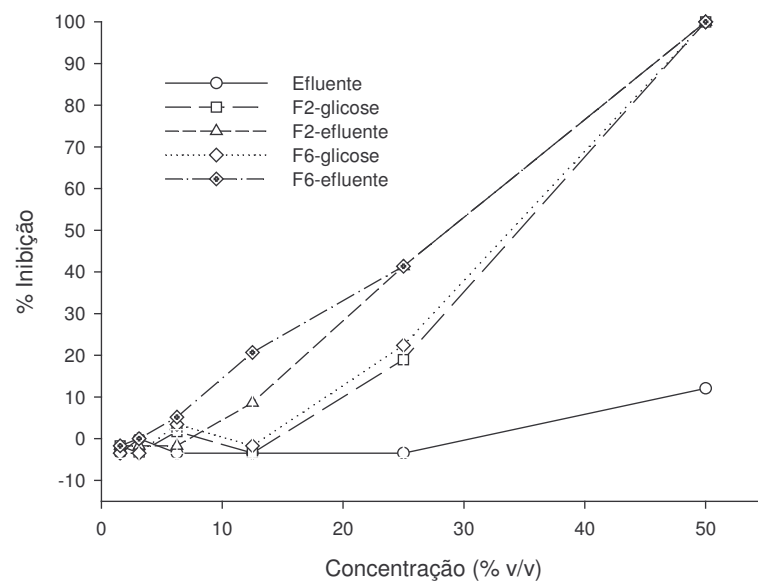


Figura 20 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 20 dias, de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na germinação de sementes de alface.

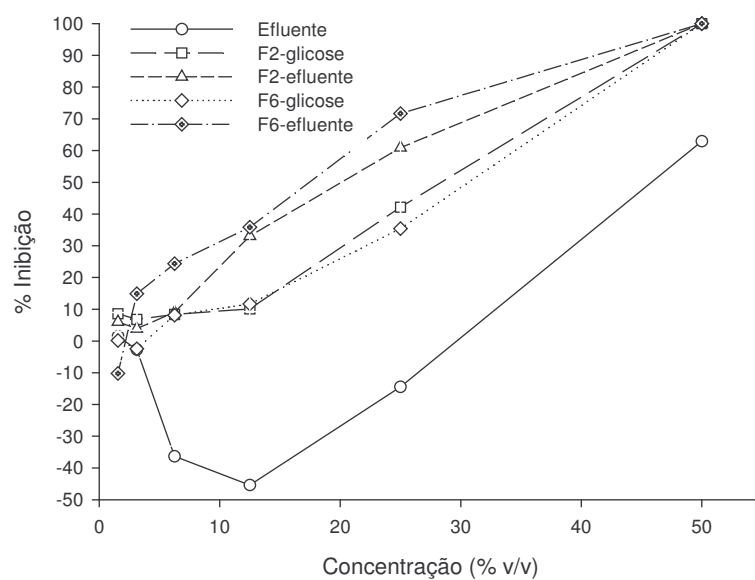


Figura 21 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 20 dias, de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na elongação de raízes de alface.

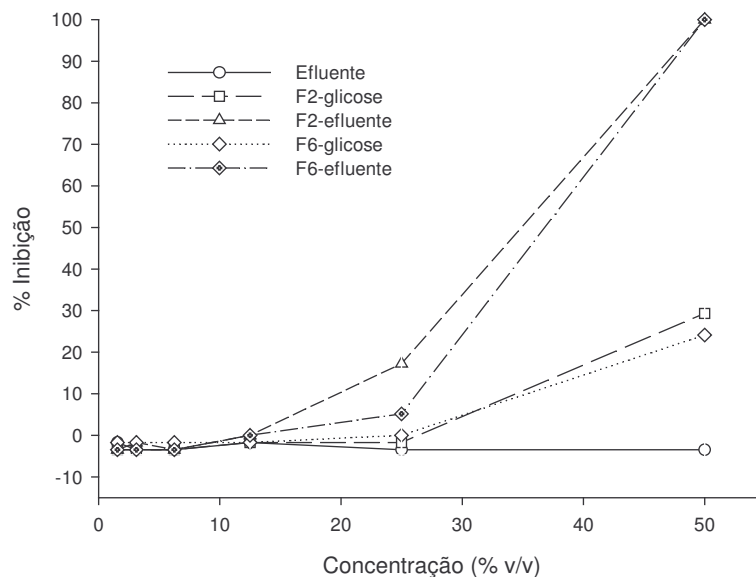


Figura 22 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 40 dias, de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na germinação de sementes de alface.

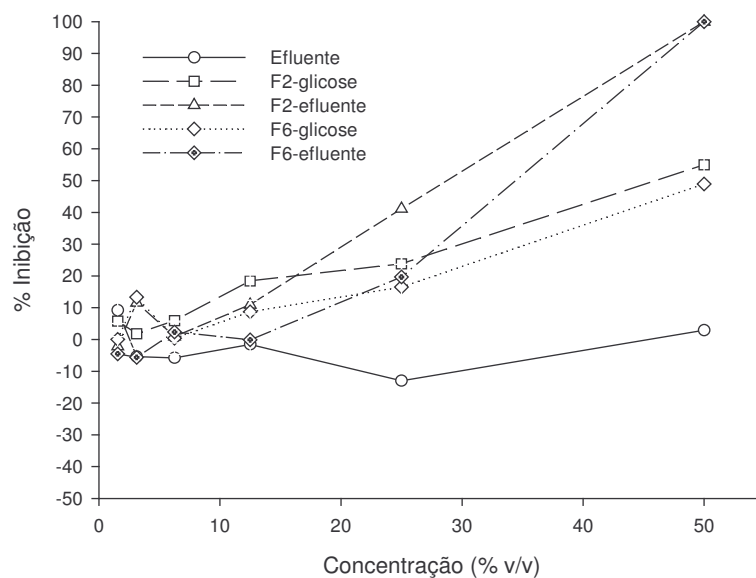


Figura 23 - Efeito de extratos obtidos através da incubação por 40 dias, de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, na elongação de raízes de alface.

Tabela 02 – Resultados do cálculo de CE<sub>50</sub> para bioensaios com sementes de alface (*Lactuca sativa*)

| Amostra                                          | 14 dias                     |         |                | 20 dias                     |                                               |                | 40 dias                     |                                             |                |
|--------------------------------------------------|-----------------------------|---------|----------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|----------------|-----------------------------|---------------------------------------------|----------------|
|                                                  | CE <sub>50</sub> (%<br>v/v) | Equação | r <sup>2</sup> | CE <sub>50</sub> (%<br>v/v) | Equação                                       | r <sup>2</sup> | CE <sub>50</sub> (%<br>v/v) | Equação                                     | r <sup>2</sup> |
| ----- Percentual de Inibição de Germinação ----- |                             |         |                |                             |                                               |                |                             |                                             |                |
| Efluente                                         | -                           | -       | -              | -                           | -                                             | -              | -                           | -                                           | -              |
| F2-glicose                                       | -                           | -       | -              | 37,24                       | $y = -0,884 - 0,545x + 0,051x^2$              | 0,996          | -                           | -                                           | -              |
| F2-efluente                                      | -                           | -       | -              | 27,71                       | $y = -0,901 - 0,815x + 0,144x^2 - 0,002x^3$   | 0,999          | 37,27                       | $y = -1,911 - 0,495x + 0,051x^2$            | 0,999          |
| F6-glicose                                       | -                           | -       | -              | 36,32                       | $y = -2,285 - 0,175x + 0,044x^2$              | 0,994          | -                           | -                                           | -              |
| F6-efluente                                      | -                           | -       | -              | 27,08                       | $y = -6,869 + 2,100x$                         | 0,996          | 41,69                       | $y = -5,126 + 0,738x - 0,053x^2 + 0,002x^3$ | 0,999          |
| ----- Percentual de Inibição de Elongação -----  |                             |         |                |                             |                                               |                |                             |                                             |                |
| Efluente                                         | -                           | -       | -              | 38,14                       | $y = 21,049 - 11,546x + 0,563x^2 - 0,0063x^3$ | 0,986          | -                           | -                                           | -              |
| F2-glicose                                       | -                           | -       | -              | 27,71                       | $y = 11,135 - 1,779x + 0,169x^2 - 0,002x^3$   | 0,999          | 46,11                       | $y = 0,870 + 1,066x$                        | 0,974          |
| F2-efluente                                      | -                           | -       | -              | 23,49                       | $y = 1,835 + 2,050x$                          | 0,977          | 27,62                       | $y = -7,066 + 2,066x$                       | 0,966          |
| F6-glicose                                       | -                           | -       | -              | 31,82                       | $y = -2,122 + 0,930x + 0,022x^2$              | 0,996          | 50,49                       | $y = 4,157 + 0,077x + 0,016x^2$             | 0,931          |
| F6-efluente                                      | -                           | -       | -              | 16,05                       | $y = -6,157 + 4,151x - 0,041x^2$              | 0,9711         | 36,58                       | $y = -3,616 - 0,181x + 0,045x^2$            | 0,996          |

“-“ não calculado

#### 5.4.3.2 *Hydra attenuata*

Os bioensaios com *Hydra attenuata* tiveram uma duração máxima de 96 h e durante este período, os organismos se mantiveram imersos na amostra, sendo analisados diariamente (cada 24 h) para registrar as alterações morfológicas. Quando a hidra é exposta a compostos tóxicos, esta pode manifestar mudanças graduais da sua estrutura corporal cuja expressão permite determinar doses do efeito subletal (estágio bulbo e encurtamento dos tentáculos) e letal (estágio tulipa e desintegração dos organismos).

Para validar os resultados deste bioensaio, os organismos expostos ao seu próprio meio de cultivo, sendo considerados o controle do teste, não podiam apresentar nenhum sinal de toxicidade, pois se caso isto acontecesse, outros fatores inerentes as amostras poderiam estar influenciando as condições na qual os organismos encontravam-se submetidos.

A Tabela 03 ilustra os resultados obtidos através do efeito de extratos de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), cultivados em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose sobre *Hydra attenuata*, fornecendo dados referentes ao NOEC (concentração da amostra onde nenhum efeito foi observado), ao LOEC (concentração da amostra onde foi observado menor efeito) e o limiar de toxicidade (LT) obtido pelo cálculo descrito em material e métodos (item 4.3.7.2 – pag. 55) em relação a subletalidade e letalidade.

Podemos verificar que os extratos fúngicos obtidos com o crescimento em bagaço de cana em meio mínimo contendo glicose das duas linhagens, não apresentaram efeito tóxico sobre os organismos em nenhum tempo de incubação.

Aos 14 dias de incubação, o efluente têxtil não tratado pelos fungos apresentou limiar de toxicidade de 17,67% v/v, em comparação as amostras de efluente tratado, que apresentaram LT de 35,35% v/v em relação a subletalidade, implicando no fato, de que uma concentração menor causou o mesmo efeito tóxico, indicando que esta amostra apresentou efeito mais acentuado. No mesmo período de incubação foi observado efeito tóxico letal, somente nas amostras de efluente não-tratado, apresentando LT de 35,35% v/v.

No 20<sup>o</sup> dia de incubação, verificamos um comportamento diferente, apresentando o material de efluente tratados pelos fungos um maior potencial tóxico em relação a letalidade, pois o LT das amostras tratadas foram de 17,67% v/v, enquanto que o não-tratado foi de 35,35% v/v.

Após 40 dias de incubação, novamente observamos um maior efeito tóxico do efluente tratado pelos fungo, mas em relação a subletalidade. O LT das amostras de efluente tratado foi de 8,84% v/v, enquanto o da outra foi de 17,67% v/v.

Não houve a possibilidade de obter valores referentes a CE<sub>50</sub> das amostras, pois o efeito de toxicidade observado foi muito acentuado entre as concentrações empregadas. De acordo com este comportamento, foram realizados testes com uma maior gama de concentrações para possibilitar uma melhor análise, mas infelizmente não foram obtidos resultados satisfatórios que pudessem contornar esta dificuldade.

TABELA 03 - Efeito de extratos obtidos de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose sobre *Hydra attenuata*.

| DIAS<br>INCUBAÇÃO | AMOSTRAS    | subletalidade |      |       | letalidade |      |       |
|-------------------|-------------|---------------|------|-------|------------|------|-------|
|                   |             | *NOEC         | LOEC | LT    | NOEC       | LOEC | LT    |
| 14                | Efluente    | 12,5          | 25   | 17,67 | 25         | 50   | 35,35 |
|                   | F2-glicose  | -             | -    | -     | -          | -    | -     |
|                   | F2-efluente | 25            | 50   | 35,35 | -          | -    | -     |
|                   | F6-glicose  | -             | -    | -     | -          | -    | -     |
|                   | F6-efluente | 25            | 50   | 35,35 | -          | -    | -     |
| 20                | Efluente    | 6,25          | 12,5 | 8,84  | 25         | 50   | 35,35 |
|                   | F2-glicose  | -             | -    | -     | -          | -    | -     |
|                   | F2-efluente | 6,25          | 12,5 | 8,84  | 12,5       | 25   | 17,67 |
|                   | F6-glicose  | -             | -    | -     | -          | -    | -     |
|                   | F6-efluente | 6,25          | 12,5 | 8,84  | 12,5       | 25   | 17,67 |
| 40                | Efluente    | 12,5          | 25   | 17,67 | 12,5       | 25   | 17,67 |
|                   | F2-glicose  | -             | -    | -     | -          | -    | -     |
|                   | F2-efluente | 6,25          | 12,5 | 8,84  | 12,5       | 25   | 17,67 |
|                   | F6-glicose  | -             | -    | -     | -          | -    | -     |
|                   | F6-efluente | 6,25          | 12,5 | 8,84  | 12,5       | 25   | 17,67 |

\*NOEC- conc. onde nenhum efeito foi observado; LOEC- conc. onde foi observado menor efeito; LT- limiar de toxicidade.

#### 5.4.3.3 *Selenastrum capricornutum*

Nos testes biológicos, certas condições de exposição devem ser satisfeitas para que os resultados sejam julgados como aceitáveis. A validade dos testes para os ensaios de fitotoxicidade com esta alga são condicionados aos seguintes parâmetros: o coeficiente de variação de cinco amostras controle a  $t = 72h$ , após a contagem em câmara de Neubauer, não podem exceder a 40%; e a densidade celular nos frascos controles devem aumentar por um fator de no mínimo 16.

Assim como para *Hydra attenuata*, também foi verificado que os extratos fúngicos obtidos com o crescimento em bagaço de cana em meio mínimo contendo glicose das duas linhagens, não apresentam efeito tóxico sobre o crescimento populacional das algas durante o período de incubação.

Em relação ao efluente tratado e não tratado pelos fungos, foi observado efeito de inibição no crescimento destas, como podemos verificar nas Figuras 24, 25, 26 (referentes ao tempo de incubação) e na Tabela 04.

Nas Figuras 24 a 26, observa-se o efeito dos extratos sobre o crescimento das algas, de acordo com uma escala crescente da concentração das amostras. Já na Tabela 04, verificamos a concentração efetiva que causou 50% de inibição do crescimento ( $CE_{50}$ ), a equação correspondente a curva de regressão na qual foi estimada a  $CE_{50}$  e o valor de  $r^2$  da equação.

Em todos os tempos de incubação (14, 20 e 40 dias) (Figuras 24, 25 e 26), foi observado a mesma tendência, das amostras referentes ao efluente tratado pelos fungos, causarem aumento da inibição do crescimento de acordo com aumento da concentração em relação ao efluente não tratado. Em relação aos valores de  $CE_{50}$ , as

amostras referentes ao período de 14 dias de incubação, demonstram que o efluente apresentou maior toxicidade pois obteve-se um valor menor de CE50 em relação às demais amostras, implicando no fato, de que uma menor concentração da amostra apresentou o mesmo efeito de inibição (50%), mas se observarmos na Figura 24, somente nas concentrações iniciais esta amostra apresentou níveis de inibição acima das demais, não sendo verificado esta tendência da concentração acima de 10%.

Em relação ao tempo de 20 dias de incubação, o efluente apresentou valor de CE50 correspondente a 31,16%, o efluente tratado com F2 13,28% e o tratado com F6 6,97% e no tempo de 40 dias, os valores correspondentes foram efluente 19,73%, F2 9,46% e F6 3,25%, confirmando a tendência observada nas figuras, de que o material tratado pelos fungos apresentaram maior toxicidade, causando maior inibição no crescimento populacional das algas.

As significâncias obtidas através de análise estatística de efeitos de diferentes concentrações de amostra (efluente, efluente tratado pelos fungos, extrato de fungos crescidos com glicose) sobre o percentual de crescimento populacional de alga em relação ao controle encontram-se na Tabela 21 (Anexo C – pag. 150).

Shukla et al. (1994), estudaram o efeito tóxico do corante têxtil laranja cromo GL sobre a cianobactéria *Nostoc muscorum*, e verificaram que concentrações acima de 20 mg/L causam redução no teor de proteínas, clorofila, ficocianina, carotenóides e que a evolução de oxigênio fotossintético também diminuiu 92%.

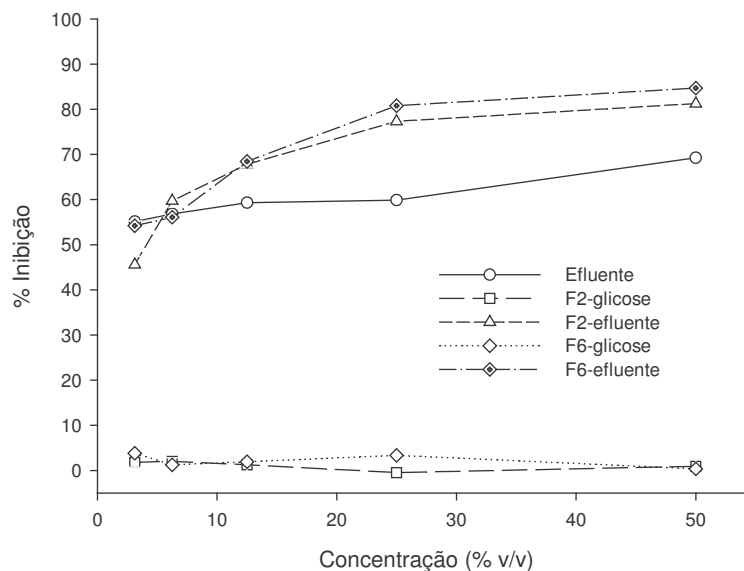


Figura 24 – Efeito de extratos obtidos através da incubação por 14 dias, de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, no crescimento populacional da alga unicelular *Selenastrum capricornutum*.

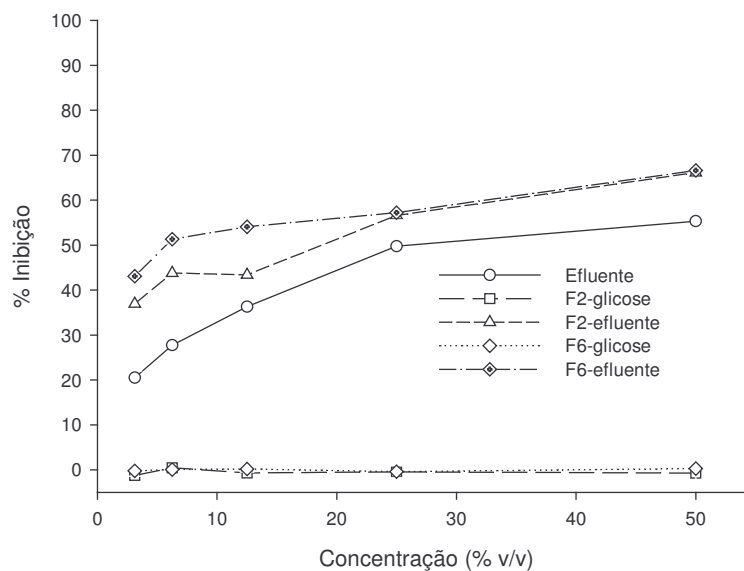


Figura 25– Efeito de extratos obtidos através da incubação por 20 dias, de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, no crescimento populacional da alga unicelular *Selenastrum capricornutum*.

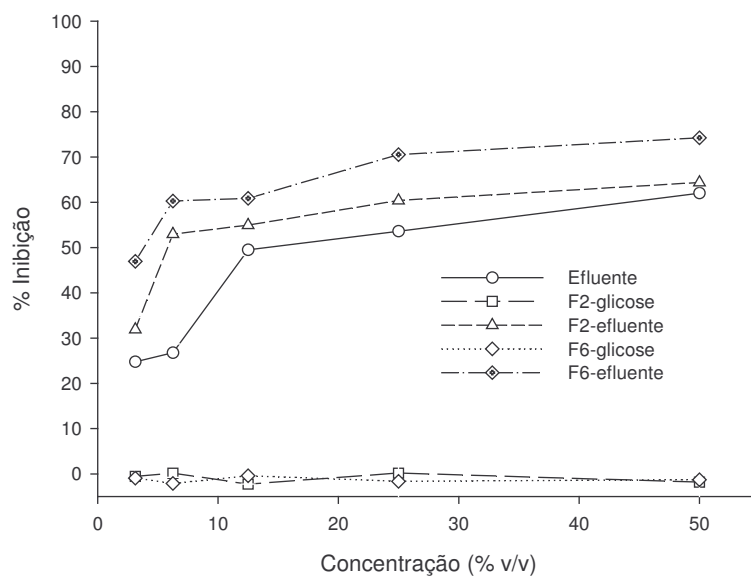


Figura 26 - Efeito de extratos obtidos através da incubação por 40 dias, de *Pleurotus sajor-caju* (F2 e F6), em bagaço de cana contendo efluente ou meio mínimo com glicose, no crescimento populacional da alga unicelular *Selenastrum capricornutum*.

Tabela 04 – Resultados do cálculo de CE<sub>50</sub> para bioensaios com alga (*Selenastrum capricornutum*)

| Amostra     | 14 dias                     |                              |                | 20 dias                     |                              |                | 40 dias                     |                              |                |
|-------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|
|             | CE <sub>50</sub><br>(% v/v) | Equação                      | r <sup>2</sup> | CE <sub>50</sub><br>(% v/v) | Equação                      | r <sup>2</sup> | CE <sub>50</sub><br>(% v/v) | Equação                      | r <sup>2</sup> |
| Efluente    | 1,34*                       | y = 48,665 +<br>4,52.ln(x)   | 0,818          | 31,16                       | y = 4,509 +<br>13,227.ln(x)  | 0,985          | 19,73                       | y = 6,389 +<br>14,625.ln(x)  | 0,924          |
| F2-glicose  | -                           | -                            | -              | -                           | -                            | -              | -                           | -                            | -              |
| F2-efluente | 3,50                        | y = 33,919 +<br>12,834.ln(x) | 0,965          | 13,28                       | y = 23,441 +<br>10,269.ln(x) | 0,913          | 9,46                        | y = 26,532 +<br>10,445.ln(x) | 0,828          |
| F6-glicose  | -                           | -                            | -              | -                           | -                            | -              | -                           | -                            | -              |
| F6-efluente | 2,72*                       | y = 37,620 +<br>12,364.ln(x) | 0,952          | 6,97                        | y = 35,161 +<br>7,643.ln(x)  | 0,9519         | 3,26                        | y = 38,939 +<br>9,355.ln(x)  | 0,930          |

“-“ não calculado, por não atingir 50% de inibição

“\*” extrapolado, apesar dos valores serem superiores a 50% de inibição

Ambrósio & Campos-Takaki (2003), estudaram a descoloração de corantes azo reativos pelo fungo *Cunninghamella elegans* em várias condições de meio de cultivo, sendo observado que a taxa de descoloração foi grandemente influenciado pelo tempo de incubação, estrutura molecular dos corantes e presença ou ausência de co-substratos. Foi verificado que o processo de descoloração estava associado à biodegradação em adição a bioadsorção dos corante ao micélio dos fungos e que, metabólitos tóxicos foram produzidos através deste processo, pois causaram inibição da respiração de *Escherichia coli*.

Gottlieb et al. (2003), verificaram o aumento de toxicidade quando houve a descoloração do corante preto reativo hidrolisado em condições anaeróbias, utilizando a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri* como indicador, sendo que o mesmo não foi observado quando foi utilizado biorreator aeróbio. Também foi estudado a genotoxicidade do material obtido pelo processo de degradação, apresentado resultados negativos para ambas as condições.

#### **5.4.4 Caracterização de metabólitos secundários (3,4-DCA)**

Os resultados obtidos através dos testes de toxicidade, onde pôde ser verificado que o efluente tratado com os fungos apresentaram potencial tóxico maior do que o efluente não tratado, levam a supor, que os componentes presentes no efluente não foram totalmente biodegradados, sendo produzidos metabólitos secundários mais tóxicos.

A identificação de compostos desconhecidos presentes em amostras desta natureza, representa um processo bastante complexo, pois existe a necessidade de

conhecer características destes compostos, para empregar metodologias adequadas para sua caracterização. De acordo com o trabalho de Dávila-Jiménez et al. (2000), onde realizou um tratamento eletroquímico com o corante índigo, através da metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conseguiu caracterizar dois compostos obtidos por este processo de degradação, uma delas é a 3,4-dicloroanilina, que trata-se de um composto intermediário de alguns herbicidas que apresenta potencial tóxico sobre vários organismos.

O procedimento de separação e detecção do suposto composto formado através do processo de biodegradação do efluente têxtil contendo o corante índigo pelas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* foi baseado no protocolo de Molina & Silva (2001), onde o 3,4-DCA foi derivatizado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), separados por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) e detectados por fluorescência induzida por laser.

A metodologia empregada permitiu a detecção do composto 3,4-DCA, como pode ser visto na Figura 28, onde foi injetada uma solução padrão desta na concentração de  $266 \mu\text{g mL}^{-1}$ , foi observada o pico referente ao composto no tempo de dois minutos e meio. A Figura 27, refere-se ao cromatograma eletrocínético onde foi injetada apenas solução tampão, e conseqüentemente não observa-se pico neste tempo de detecção.

Como esperado, não foi observado o pico correspondente ao 3,4-DCA no cromatograma, onde foi injetada amostra referente ao efluente têxtil não tratado pelos fungos (Figura 29).

As Figuras 30 e 31 refere-se respectivamente aos cromatogramas obtidos pela injeção de amostras referentes ao efluente tratado com os fungos F2 e F6, onde também não foi verificado a presença de pico no tempo de detecção de dois minutos e meio, correspondente a 3,4-DCA. De acordo com estes resultados, supõe-se que o composto 3,4-DCA não está presente nestas amostras, não sendo portanto, o composto formado através do processo de biodegradação pelos fungos.

Com o intuito de verificar se o pico correspondente ao 3,4-DCA não estaria sendo detectado em tempo diferente àquele do padrão, a amostra de efluente tratado com o fungo F6 foi fortificada com 3,4-DCA (Figura 32) e a saída do pico foi observada no tempo de dois minutos e meio, assim como na Figura 27.

Cripps et al. (1990) examinaram por cromatografia em camada delgada a formação de metabólitos da biodegradação de corantes azo e heterocíclicos por *P. chrysosporium*. O azul B, tropeolina e vermelho Congo formaram metabólitos coloridos e visíveis em culturas com e sem limitação de nitrogênio, o laranja II apresentou somente um metabólito possível de ser visualizado em luz UV após incubação com lignina peroxidase.

A degradação de corantes azo por processos químicos via reações entre nitrato férrico e  $H_2O_2$ , revelou a produção de benzeno e outros metabólitos, que foram demonstrados por Spadaro et al. (1994) através do uso de cromatografia líquida de alta eficiência.

Martins et al. (2003) verificaram que *Trametes versicolor* apresenta potencial para degradação de corantes azo derivados de seringol que possuem grupos carboxílicos ou sulfônicos, quando cultivados em meio líquido por 7 dias, e que através da análise por CG-MS (cromatografia a gás associado ao espectro de massa), foi

possível identificar os produtos de degradação, que consistiram em metabólitos hidroxilados (álcool 3-hidroxibenzil e ácido 3-hidroxibenzóico), propondo ainda, uma possível via metabólica de degradação.

Ensaio de descoloração foram realizados com o corante azo derivado de ácido meta-aminobenzóico e seringol utilizando *P. chrysosporium* por Martins et al. (2002), e verificaram que os produtos de degradação identificados por CG-MS, estavam relacionados com precursores de quebra de anel aromático, confirmando o fato de reações enzimáticas serem responsáveis pelo processo de degradação.

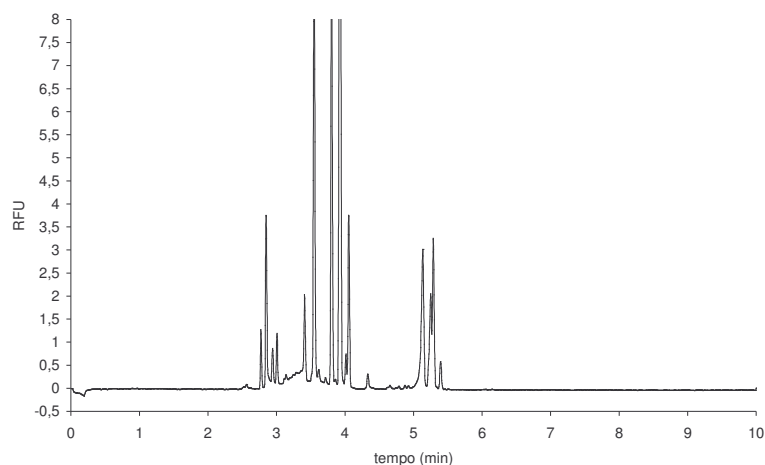


Figura 27 – Cromatograma eletrocinético de uma solução branco (tampão carbonatos 1M pH 9,6) derivatizada com FITC 8mM e diluída 41 vezes. Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75  $\mu$ m d.i.; tampão **tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM** pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de **28 kV**; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão.

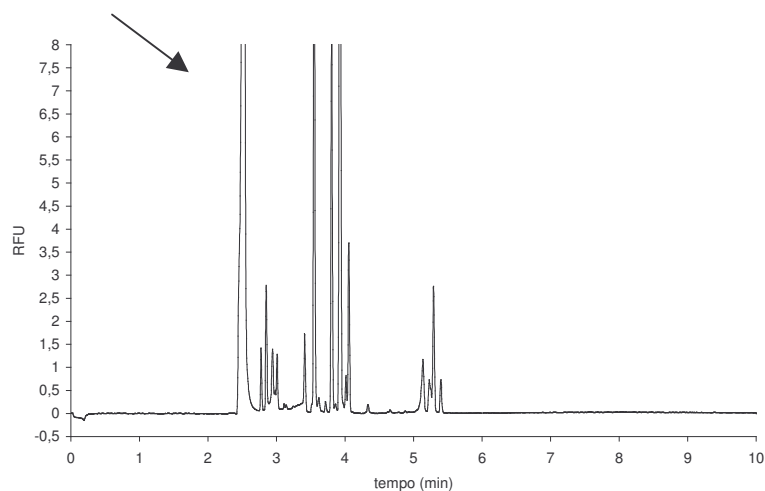


Figura 28 – Cromatograma eletrocinético de uma solução de 3,4-Dicloroanilina **266  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>** derivatizada com FITC 8mM e diluída 41 vezes (**6,48  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>**). Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75  $\mu$ m d.i.; tampão **tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM** pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de **28 kV**; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão.

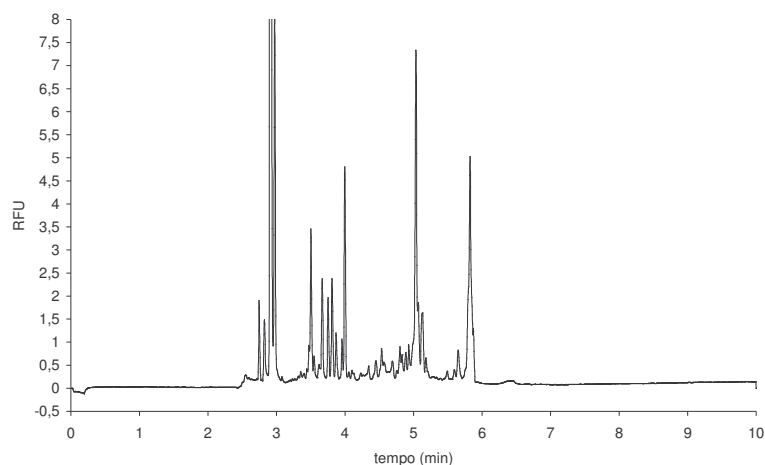


Figura 29 – Cromatograma eletrocinético de um extrato de amostra de efluente controle derivatizado com FITC 8mM e diluído 41 vezes ( $6,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75  $\mu\text{m}$  d.i.; tampão **tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM** pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de **28 kV**; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão.

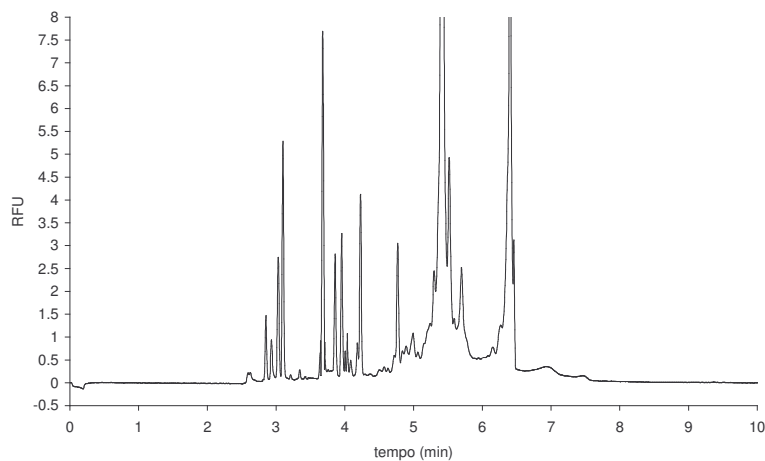


Figura 30 – Cromatograma eletrocinético de um extrato de amostra de efluente tratado com fungo F2 derivatizado com FITC 8mM e diluído 41 vezes ( $6,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75  $\mu\text{m}$  d.i.; tampão **tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM** pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de **28 kV**; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão.

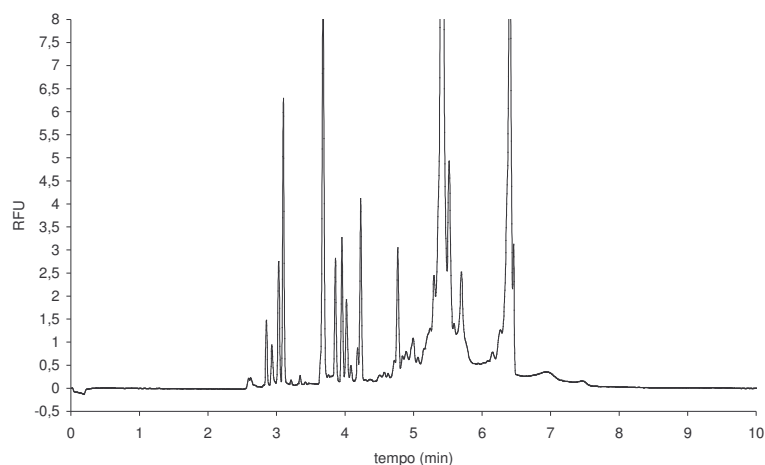


Figura 31 – Cromatograma eletrocinético de um extrato de amostra de efluente tratado com fungo F6 derivatizado com FITC 8mM e diluído 41 vezes ( $6,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75  $\mu\text{m}$  d.i.; tampão **tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM** pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de **28 kV**; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão.

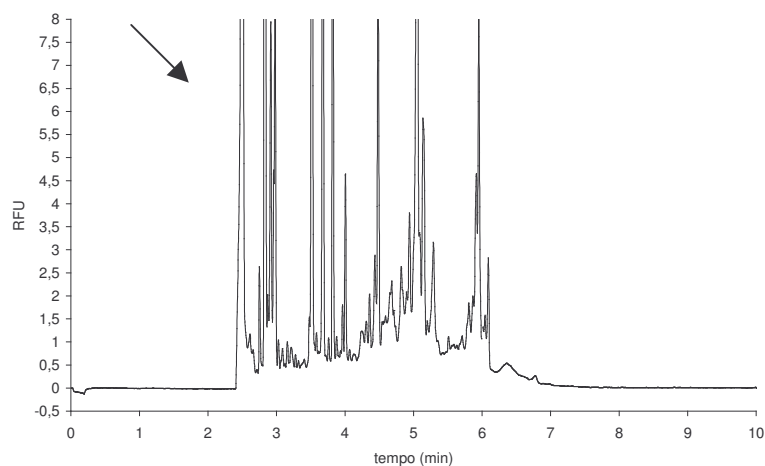


Figura 32 – Cromatograma eletrocinético de um extrato de amostra de efluente tratado com fungo F6 derivatizado com FITC 8mM e diluído 41 vezes ( $6,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fortificado com padrão de 3,4-Dicloroanilina derivatizada com FITC. Condições: capilar de 57,0 cm c.t., 50,0 cm c.e. e 75  $\mu\text{m}$  d.i.; tampão **tetraborato de sódio 5mM, ácido bórico 4,5mM e Triton X-100 20mM** pH 9,5; temperatura de 25°C; injeção por 1 seg. a 0,5 psi.; voltagem de **28 kV**; detecção LIF/laser 488nm excitação e >520nm emissão.

### 5.5 Análise do material por microscopia eletrônica de varredura

Com o intuito de verificar se ocorre alguma mudança estrutural no suporte ligninolítico, sendo empregado neste caso, o bagaço de cana, realizou-se observações deste material com auxílio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 337 vezes.

A Figura 33 refere-se a foto obtida de fragmento de bagaço contendo efluente (controle) e a Figura 34, refere-se ao mesmo material após a descoloração completa pelo fungo (incubação por 14 dias). Através da análise destas fotos, não observamos nenhuma diferença significativa quanta a estrutura do bagaço de cana, podendo supor que o processo de biodegradação ocorre somente no efluente líquido, considerando o fato de que o fungo utiliza o bagaço como suporte e fonte de lignina para induzir a atividade das enzimas envolvidas neste processo.

A Figura 35 refere-se a foto obtida de bagaço contendo efluente com a presença de micélio do fungo (14 dias de incubação), onde observa-se o crescimento de *Pleurotus sajor-caju* sobre o fragmento de bagaço colonizado.

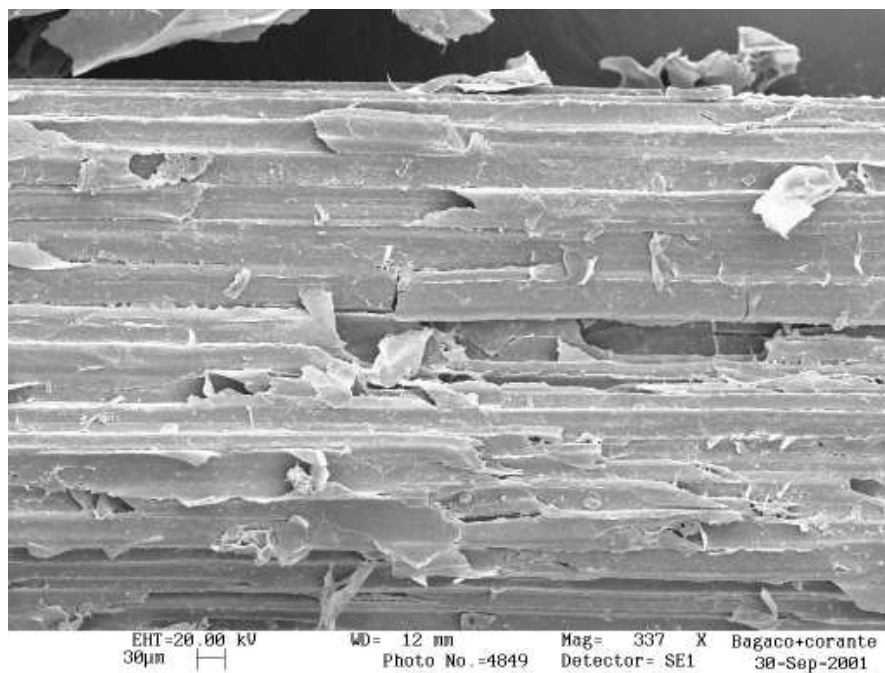


Figura 33 - Foto obtida através de microscopia eletrônica de varredura, de fragmento de bagaço de cana contendo efluente têxtil.

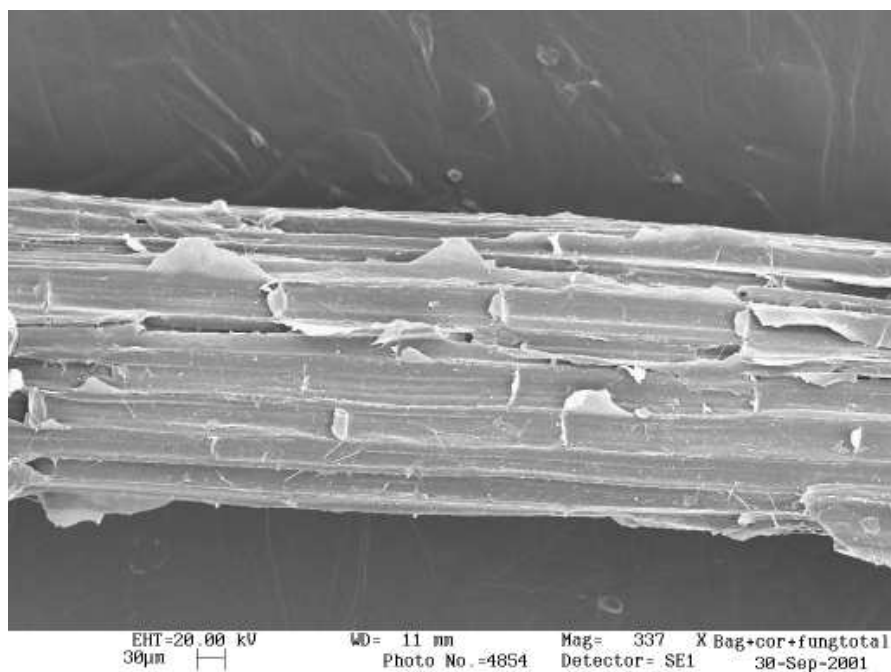


Figura 34 - Foto obtida através de microscopia eletrônica de varredura, de fragmento de bagaço de cana contendo efluente têxtil, após descoloração com *Pleurotus sajor-caju*.

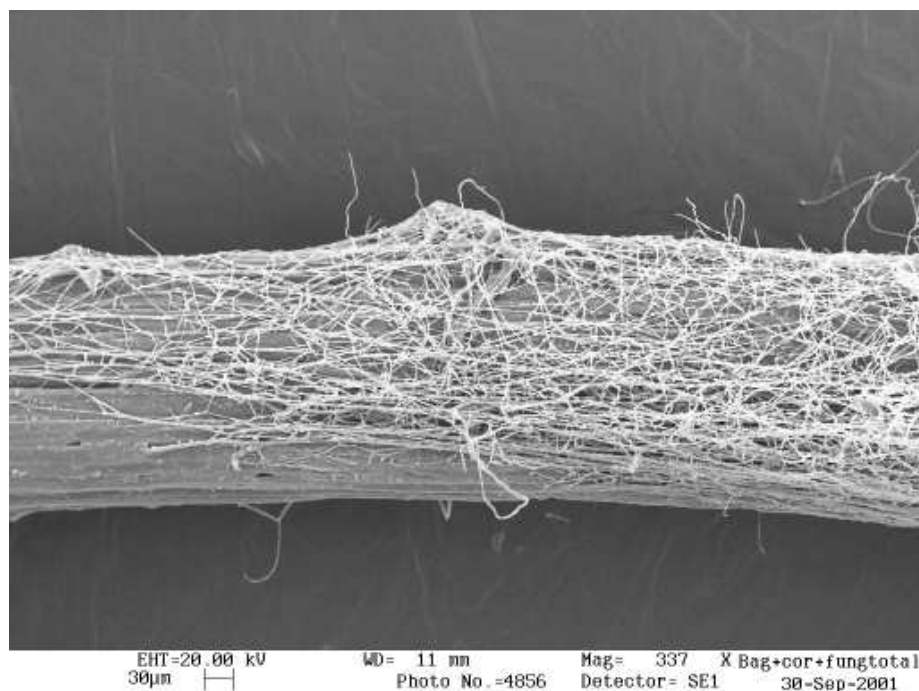


Figura 35 – Foto obtida através de microscopia eletrônica de varredura, de fragmento de bagaço de cana contendo efluente têxtil, com a presença de micélio de *Pleurotus sajor-caju*.

### 5.6 Obtenção de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de cana contendo efluente têxtil

O micélio dos fungos F2 e F6 cresceram sobre o bagaço de cana contendo o efluente têxtil, tomando todo o conteúdo do saco em 14 dias, sendo observado a descoloração total do corante presente no efluente e a formação de primórdios de corpos de frutificação dos fungos inoculados. Nos sacos controle, onde havia adicionado meio mínimo para fungos ao bagaço de cana, foi observado o crescimento de micélio com menos vigor, comparado àqueles que continham efluente.

Foram realizados pequenos furos (1cm  $\phi$ ) nos sacos plásticos, principalmente nos locais onde foram observados a formação dos primórdios, com a finalidade de

permitir a entrada de oxigênio e assim favorecer o crescimento dos corpos de frutificação.

No décimo oitavo dia após inoculação, já observava um melhor desenvolvimentos dos corpos de frutificação, como pode ser visto nas Figuras 36, 37 e 38. Não foi observado a formação de corpos de frutificação apenas no material controle (sem efluente) inoculado com o fungo F6.

De acordo com as observações realizadas através deste experimento, verificamos que a presença de efluente têxtil no bagaço de cana, não interfere na formação de corpos de frutificação das linhagens de *Pleurotus sajor-caju* empregadas, favorecendo inclusive a sua formação, no caso da linhagem F6.

Exemplos do emprego de resíduos industriais empregados tanto na fermentação líquida, quanto na sólida têm sido mostrado na literatura científica.

A possibilidade de emprego de resíduos industriais para o cultivo de *Pleurotus* ssp. foi exemplificada por Tautorius (1985) e Rajarathanam et al. (1992), a polpa e os resíduos da fabricação do papel são exemplos de resíduos celulósicos que são dispostos no ambiente ocasionando problemas ambientais e poluição de solos. A produção do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* foi obtida empregando-se como substrato de cultivo uma mistura do lodo da polpa de celulose com resíduos da indústria de maçã.

Sanjust et al. (1991), estudaram três espécies de *Pleurotus* na degradação de resíduos aquosos da indústria de azeitonas. Esse resíduo é particularmente rico em compostos fenólicos relacionados à lignina os quais são também substratos para atuação de lacases. As três espécies estudadas cresceram satisfatoriamente nesse resíduo, particularmente *P. ostreatus* e *P. floridae* e produziram grandes quantidades de

lacase com concomitante destruição dos compostos fenólicos presentes no resíduo. Os autores também notaram que o odor desagradável inicial do resíduo desapareceu ao final da fermentação.

Outros resíduos industriais potenciais são citados por Rajarathanam et al. (1992), tais como bagaço de citronela (utilizada para extração de óleos essenciais), restos da extração do linho, casca de laranja e resíduos da destilaria de vinhos.



Figura 36 – Corpo de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* (F2), formado em bagaço de cana contendo meio mínimo com glicose.





Figura 37 – Corpo de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* (F2), formado em bagaço de cana contendo efluente têxtil.



Figura 38 - Corpo de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* (F6), formado em bagaço de cana contendo efluente têxtil.



## 6 CONCLUSÕES

→ As duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* estudadas (CCB 020 e PSC 94/03) necessitam de fonte de lignina para promoverem a descoloração do efluente têxtil coletado em uma indústria localizado no Município de Americana-SP.

→ Os fungos apresentaram a capacidade de descolorir totalmente o corante índigo (0,02%) em meio mínimo e o efluente líquido misturados ao bagaço de cana fragmentado, após 14 dias de incubação.

→ A metodologia baseada em reflectância, mostrou-se bastante eficiente para avaliar a descoloração do efluente pelos fungos, fornecendo dados numéricos, viabilizando assim, a análise estatística dos resultados.

→ Observou-se que ocorre descoloração do efluente quando este é adicionado a um substrato sólido colonizado pelos fungos, sendo o processo observado mais rapidamente nos tempos de incubação de 7 e 14 dias, coincidindo com maior atividade enzimática.

→ Foi verificado a produção das enzimas lacase, peroxidase e manganês peroxidase pelas duas linhagens de fungos, nos extratos obtidos durante a descoloração do efluente, implicando no fato destas influenciarem o processo sinergisticamente.

→ Em relação aos extratos obtidos pelo crescimento dos fungos em bagaço contendo meio mínimo com glicose, somente foi observado algum efeito tóxico na germinação de sementes e alongação de raízes de alface.

→ O efluente tratado com as duas linhagens de *Pleurotus*, apresentou efeito tóxico nos três bioindicadores empregados aos 14, 20 e 40 dias de incubação.

→ O metabólito 3,4-dicloroanilina não foi detectado nas amostras referentes aos produtos de biodegradação do efluente, através da separação por eletroforese capilar.

→ Não foi observada alteração estrutural no bagaço de cana através de microscopia eletrônica de varredura, quando este foi misturado ao efluente líquido e posteriormente tratado com *Pleurotus sajor-caju*.

→ A presença de efluente têxtil no bagaço de cana proporcionou a formação de corpos de frutificação na linhagem PSC 94/03 (F6), pois os mesmos não foram observados no material contendo apenas meio mínimo para fungos com glicose.

→ Em relação aos parâmetros estudados, não foram verificadas diferenças significativas entre o comportamento das duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju*.

→ As linhagens de *Pleurotus* estudadas apresentaram grande potencial de descoloração de efluente têxtil, provavelmente por não estarem promovendo uma

biodegradação total do material, a toxicidade final é elevada. Estudos neste assunto ainda necessitam serem realizados, buscando condições mais apropriadas para que os fungos possam mineralizar os compostos presentes no efluente.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHMEDOVA, Z.R. Cellulolytic, xylanolytic, and lignolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 32-37, 1994.
- ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, v. 211, p. 132, 1981.
- ALTRIA, K.D. (Ed.) **Capillary electrophoresis guidebook**: principles, operation, and applications. Totowa: Humana, 349p., 1996.
- AMBRÓSIO, S.T.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. **Bioresource Technology**, 2003 (no prelo).
- ANDER, P.; ERIKSSON, K.E. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**, v. 109, p. 1-8, 1976.
- ANDER, P.; STOYTSCHEV, I.; ERIKSSON, K.E. Cleavage and metabolism of methoxyl groups from vanilic and ferulic acids by brown-rot and soft-rot fungi. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 22, p. 255-266, 1988.
- ARENSBERG, P.; HEMMINGSEN, V.H.; NYHOLM, N. A miniscale algal toxicity test. **Chemosphere**, v. 30, p. 2103-2115, 1995.
- ARMAS, E.D. Comportamento de glifosate em solo de várzea sob sistema plantio direto e a eletroforese capilar na análise de resíduos. Dissertação (Mestrado), Centro de Energia Nuclear na Agricultura-USP, Piracicaba-SP, 102p, 2002.
- ASPLAND, J.R. Direct dye structure. **Textile Chemist and Colorist**, v. 23, n. 12, p. 30-32, 1991.

- BACKA, S.; GIERER, J.; REITBERGER, T.; NILSSON, T. Hydroxyl radical activity in brown-rot fungi studied by a new chemiluminescence method. **Holzforschung**, v. 46, p. 61-67, 1992.
- BAKER, D.R. **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley & Sons, 244p., 1995.
- BALAN, D.S.L. Biodegradabilidade e toxicidade de efluentes têxteis. **Química Têxtil**, v. 54, p. 26-31, 1999.
- BALAN, D.S.L; MONTEIRO, R.T.R. Biodegradabilidade do corante têxtil índigo por fungos ligninolíticos. **Revista Latino Americana de Tecnologia Têxtil**, v. 13, p. 47-54, 2001b.
- BALAN, D.S.L; MONTEIRO, R.T.R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 141-145, 2001a.
- BAL-TEC Preparation **technology for electron microscopy** - Catalogue N.5 A- Systems and devices. Liechtenstein: Bal-Tec AG, 1999.
- BANAT, M.B.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile dye containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.
- BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science Technology**, v. 28, n. 2, p. 78-87, 1994.
- BARRASA, J.M.; GONZALEZ, A.E.; MARTINEZ, A.T. Ultrastructural aspects of fungal delignification of chilean woods by *Ganoderma australe* and *Phlebia chrysoscrea*. **Holzforschung**, v. 46, p. 1-8, 1992.
- BARTHA, R.; PRAMER, D. Metabolism of acylanilide herbicides. **Advances Applied Microbiology**, v. 13, p. 317-341, 1970.
- BLAISE, C.; FORGET, G.; TROTTIER, S. Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. **Technical Methods**, v. 15, n. 4, p. 352-359, 2000.

- BLAISE, C.; KUSUI, T. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate based *Hydra attenuata* assay. **Environmental Toxicology Water Quality**, v. 12, p. 63-60, 1997.
- BLANCHETTE, R.A. Delignification by wood-decay fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 381-398, 1991.
- BLANCHETTE, R.A.; OBST, J.R.; TIMELL, T.E. Biodegradation of compression wood and tension by white and brown-rot fungi. **Holzforschung**, v. 48, p. 34-42, 1994.
- BONONI, V.L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S.F.B. Cultivo de cogumelos comestíveis. 2ª Edição. São Paulo: Ícone, 206p. 1999.
- BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 764p, 1993.
- BUMPUS, J. A. Microbial degradation of azo dyes. In: SINGH, V.P. Biotransformations: microbial degradation of health risk compounds. Elsevier Science, p. 157-177, 1995.
- BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of environmental pollutants by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin degrading system. **BioEssay**, v. 6, p. 199-170, 1986.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y.J.; CHANG, J.F.; PEBERDY, S.Y.; YU, F.; YU, H.S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p. 537-542, 1996.
- CEGARRA, J. Biotecnologia aplicada aos processos de química têxtil. **Química Têxtil**, v. 58, p. 5-14, 2000.
- CETESB – Companhia de Saneamento Ambiental. **Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo, 7p, 1990b.
- CETESB – Companhia de Saneamento Ambiental. **Microbiologia de lodos ativados**. São Paulo, 23p, 1991.

- CETESB – Companhia de Saneamento Ambiental. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo, 17p, 1990a.
- CETESB – Companhia de Saneamento Ambiental. **Série Manuais: Operação e manutenção de lagoas anaeróbias e facultativas**. São Paulo, 91p, 1989.
- CHAGAS. E.P.; DURRANT, L.R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 473-477, 2001.
- CHAUDHARI, B.M.S. Decolorization of indigo and azo dyes in semicontinuous reactors with long hydraulic retention time. **Process biochemistry**, v. 38, p. 1213-1221, 2003.
- CLARK, E. (trad.) Corantes e o meio ambiente – Guia para usuários. **Química Têxtil**, v.28, p. 2231, 1995.
- CONCHON, J.A.; MATUSAKI, L.F.; CONCHON, E.A.; CONCHON, E. Lodo biológico têxtil: um método de disposição econômico e racional. **Química Têxtil**, n.48, p. 74-77, 1997.
- CONTATO, I.M. Emprego de *Aspergillus niger* paramorfogênico para avaliação do grau de interferência dos aditivos químicos na biosorção de corantes têxteis de efluentes industriais. Rio Claro, 1995. 173p. **Tese** (Doutorado) – UNESP.
- COWGILL, U.M.; TAKAHASHI, I.T.; APPELGATH, S.L. A comparison of the effect of four benchmark chemicals on *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia quadrangula*. **Environmental Toxicology Chemical**, v. 4, p. 415-422, 1985.
- CRIPPS, C.; BUMPUS, J.A.; AUST, D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1114-1118, 1990.
- DANIEL, G.; VOLC, J.; KUBATOVA, E.; NILSSON, T. Ultrastructural and immunocytochemical studies on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing enzyme pyranose oxidase in

- Phanerochaete chrysosporium* grown under liquid culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3667-3676, 1992.
- DÁVILA-JIMÉNEZ, M.M.; ELIZALDE-GONZÁLEZ, M.P.; GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, A.; PELÁEZ-CID, A.A. Electrochemical treatment of textile dyes and their analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 889, p. 253-259, 2000.
- DHALIWAL, R.P.S.; GARCHA, H.S.; KHANNA, P.K. High laccase producing mutants of *Pleurotus florida*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 39-41, 1992.
- DI MUCCIO, A.; CAMONI, I.; DOMMARCO, R. 3,3', 4,4'-Tetrachloroazobenzen and 3,3',4,4'-Tetrachloroazoxybenzen in technical grade herbicides: propanil, diuron, linuron, and neburon. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 8, p. 511-515, 1984.
- DUENSER, H. Textile Wastewater Treatment. **Indian Textile Journal**, v. 102, p. 80-96, 1992.
- DURÁN, N. Siderophores on wood degradation: Reduction of molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTES, 4., Recife, 1996. **Proceedings**, v. 5. p. 164-169, 1996.
- DUTKA, B.J. (Ed.) **Methods microbiological for toxicological analysis of water, wastewater and sediments**. National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canadá, 127p. 1989.
- ECKENFELDER, W.W. Strategies for toxicity reduction in industrial wastewaters. **Water Science and Technology**, v. 24, n. 7, p. 185-193, 1991.
- ENOKI, A.; YOSHIOKA, S.; TANAKA, H.; FUSE, G. Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing and one electron oxidation system of brown-rot fungi. S.L.: International Research Group on Wood Preservation. (IRG/WP Document, 1445), 1990.

- ERIKSSON, K.E.L. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science and Technology**, v. 24, p. 79-101, 1990.
- ERIKSSON, K.E.L.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Berlin: Springer, 1990.
- ESLYN, W.E.; KIRK, T.K.; EFFLAND, M.J. Changes in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. **Phytopathology**, v. 65, p. 473-476, 1975.
- FERREIRA, J.E.F. **Produção de cogumelos**. Guaíba: Agropecuária. 137p. 1998.
- FREITAG, M.; MORRELL, J.J. Decolorization of the polymeric dye poly R-478 by wood-inhabiting fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 811-822, 1992.
- GHOSH, P.; SINGH, A. Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 295-327, 1993.
- GINOCCHIO, J.C.; BISCHOFBERGER, H.; GMÜNDER, A. La decolorazione degli scarichi comunali. **Selezione Tessile**, v. 5, p. 45-48, 1985.
- GLATZ, B.A. Short-term bioassays for environmental mutagens and carcinogens. **Water Technology Quality**, p. 396-402, jul., 1979.
- GLENN, J. K.; GOLD, M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1741-1747, 1983.
- GOLD, M.H.; ALIC, M. Molecular biology of lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiology Reviews**, v. 57, n. 3, p. 606-622, 1993.
- GOTTLIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A.; FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 49-56, 2003.

- GREEN III, F.; CLAUSEN, C.A.; LARSEN, M.J.; HIGHLEY, T.L. Immuno-scanning electron microscopic localization of extracellular wood-degrading enzymes within the fibrillar sheath of the brown-rot fungus *Postia placenta*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 898-904, 1992.
- GROFF, K.A. Textile waste. **Water Environmental Research**. v. 65, 1993.
- GUZMÁN, G.; MATA, G.; SALMONES, D.; SOTO-VELAZCO, C.; GUZMÁN-DAVALOS, L. **El cultivo de los hongos comestibles**. Instituto Politécnico Nacional, Xalapa, 1993. 245p.
- HAAPALA, R.; LINKO, S. Production of *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase under various culture conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 494-498, 1993.
- HAAS, L. Tintura com índigo soluciones a los procesos de aplicacion y a la técnica mecánica. **International Textile Bulletin**, v. 36, n. 2, p. 45-50, 1990.
- HARAZONO, K.; WATANABE, Y.; NAKAMURA, K. Decolorization of azo dye by the white-rot basidiomycetes *Phanerochaete sordida* and by its manganese peroxidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.95, n.5, p. 455-459, 2003.
- HART, E. Reciclagem de água, um programa economicamente viável e tecnicamente inovativo. **Química Têxtil**, p. 36, 1994.
- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Review**, v.13, p. 125-135, 1994.
- HIGHLEY, T.L.; MURMANIS, L.; PALMER, J.G. Micromorphology of degradation in western hemlock and sweetgum by brown-rot fungus *Poria placenta*. **Holzforschung**, v. 39, p. 73-78, 1985.
- HOHN, W. Nuevas desarrollos para la depuracion/decoloracion del agua residual. **International Textile Bulletin**, v. 42, n. 1, p. 17-21, 1996.

- HUNGER, K.; JUNG, R. Toxicology and ecology of organic colorants. **Chimia**, v. 45, n. 10, p. 297-300, 1991.
- IHAKA, R; GENTLEMAN, R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**. v. 5, n. 3, p. 299-314, 1996.
- ISENSEE, A.R.; KAUFMANN, D.D.; JONES, G.E. Fate of 3,4-dichloroaniline in a rice (*Oryz sativa*) – Paddy microecosystem. **Weed Science**, v. 30, p. 608-613, 1982.
- JIN, L.; SCHULTZ, T.P.; NICHOLAS, D.D. Structural characterization of brown-rotted lignin. **Holzforschung**, v. 44, p. 133-138, 1990.
- KÄÄRIK, A. The identification o the mycelia of wood decay fungi by their oxidation reaction with phenolic compounds. **Studies of Forest Suece**, v. 31, p. 1-80, 1965.
- KANNAN, F.; OBLISAMI, G. Influence of paper mill effluent irrigation on soil enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p. 923-926, 1990.
- KEREM, Z.; FRIESEM,D.; HADAR,Y. Lignocellulose degradation during solid state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1121-1127, 1992.
- KEREM, Z.; HADAR, Y. Effect of manganese on preferential degradation of lignin by *Pleurotus ostreatus* during soli-state fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3057-3062,1993.
- KIMBROUGH, R.D. Human health effects of selected pesticides chloraniline derivatives. **Journal Environmental Science Health**, v. 15, p. 977-992, 1980.
- KIRBY, N.; Mc MULLAN, G.; MARCHANT, R. Decolorisation of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 761-764, 1995.
- KIRK, T.K. Effects of microorganisms on lignin. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, p. 185-210, 1971.

- KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.
- KIRK-OTHMER, T. **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: Wiley-Inter Science, 1979.
- KLÜTTGEN, B.; KUNTZ, N.; RATTE, H.T. Combined effects of 3,4-dichloroaniline and food concentration on life-table data of two related cladocerans *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia quadrangula*. **Chemosphere**, v. 32, n. 10, p. 2015-2028, 1996.
- KNAPP, J.S.; NEWBY, P.S.; REECE, L.P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 664-668, 1995.
- KUMARAN, S.; SASTRY, C.A.; VIKINESWARY, S. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago-hampas. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 43-49, 1997.
- KUO-CHENG, C.; JANE-YII, W.; DAR-JEN, L.; SZ-CHWUN, J.H. Decolorization of textile dyes by newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 57-68, 2003.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, p. 247-250, 1984.
- LAGUNAS, F.G.; LIS, M.J. Tratamento de efluentes na indústria têxtil algodoeira. **Química Têxtil**, v. 50, p.6-13, 1998.
- LANG, E.; NERUD, F.; ZADRAZIL, F. Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 167, p. 238-244, 1998.
- LARSEN, M.J.; GREEN III, F. Mycofibrillar cell wall extensions in the hypha sheath of *Postia placenta*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 905-911, 1992.

- LEISOLA, M.; WALDNER, R. Inc: ZADRAZIL, F.; REINIGER, P. (eds) Treatment of lignocellulosics with white rot fungi. Elsevier Applied Science, London, pp.37-42, 1988.
- LEISOLA, M.S.A.; FLECHTER, A. New trends in lignin biodegradation. In: MIZRAHI, A.; WEZEL, A.L. **Advances in Biotechnological Process** 5. New York, Alan R. Liss Inc., p.59-89, 1985.
- LEWIS, D. Coloração 2000. **Química Têxtil**, v. 58, p. 54-61, 2000.
- LONGO, A.N. Sistemas de Tratamentos de Águas Residuais Têxteis. **Química Têxtil**, v.20, p. 19-22, 1987.
- 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**, v. 52, n. 6, p. 967-973, 2003.
- MARTINS, M.A.M.; QUEIROZ, M.J.; SILVESTRE, A.J.D.; LIMA, N. Relationship of chemical structures of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 361-368, 2002.
- MOLINA, M.; SILVA, M. Simultaneous determination of phosphorus-containing amino acid-herbicides by nonionic surfactant micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. **Electrophoresis**, v.22, n. 6, p. 1175-1181, 2001.
- MOYSON, E.; VERACHTERT, H. Factors influencing the lignin-peroxidase producing ability of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 391-394, 1993.
- 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**, v. 36, p. 1449-1456, 2003.

- ORTEGA, G.M.; MARTÍNEZ, E.O.; BETANCOURT, D.; GONZÁLEZ, A.C.; OTERO, M.A. Bioconversion of sugar cane crop residues with white-rot fungi *Pleurotus* sp. **World Journal of Microbiology**, v.8, p. 402-405, 1992.
- ORTH, A.B.; ROYSE, D.J.; TIEN, M. Ubiquity of lignin wood-degrading fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 4017-4023, 1993.
- ORTOLANO, M.R. Utilização de ensaios com a bactéria *Spirillum volutans* no monitoramento da toxicidade de efluentes de indústria de celulose e papel. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 83p, 1994.
- PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; MARZULLO, L.; DESIDERIO, B.; NITTI, G.; CANNIO, R.; SANNIA, G. Stability and activity of phenol oxidase from the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 632-636, 1993.
- PASTI-GRIGSBY, M.B.; PASZCZYNSKI, S.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D.L.; CRAWFORD, R.L. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3605-3613, 1992.
- PASZCZYNSKI, A.; PASTY-GRIGSBY, M.B.; GOSZCZYNSKY, 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**, v. 58, n. 11, p. 3598-3604, 1992.
- PATRA, A.K.; PANI, B.K. Evaluation of banana leaf as a new alternate substrate to paddy straw for oyster mushroom cultivation. **Journal of Phytochemical Research**, v.8, n.2, p. 145-148, 1995.
- PLATT, M.W.; HADAR, Y.; CHET, I. The decolorization of the polymeric dye poly blue by lignin degrading fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 394-396, 1985.

- PODGORNIK, H.; POLJANSEK, I.; PERDIH, A. Transformation of indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 166-172, 2001.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HERMONDS, L.M.; McDONALD, D.K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advance in Genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.
- PORTER, J.J. Membrane filtration techniques used for recovery of dyes, chemicals and energy. **Textile Chemist and Colorist**, v. 22, n. 6, p. 22-25, 1990.
- PRITCHARD, P.H. Fate of environmental pollutants. **Journal Water Pollutant Control Federation**, v. 57, n. 6, p. 658-667, 1985.
- RAGUNATHAM, R.; GURUSAMY, M.; PALANISWAMY, M.; SWAMINATHAN, K. Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. **Food Chemistry**, v.55, n. 2, p. 139-144, 1996.
- RAJARATHANAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus* Mushrooms. Part III: biotransformations of natural lignocelulosic wastes; commercial applications and implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 31-113, 1989.
- RAJARATHANAM, S.; SHASHIREKA, M.N.; BANO, Z. Biopotentialites of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 37, p. 233-361, 1992.
- RANZANI, M.R.T.C. Uso de basidiomicetos comestíveis – *Pleurotus* spp. para descoloração/degradação de corantes têxteis. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, 218p, 2002.
- RAYNER, A.D.M.; BODDY, L. **Fungal decomposition of wood: its biology and ecology**. Chichester: John Wiley, 1998.
- RODRIGUEZ, J.; DURÁN, N. Some new aspects of enzymatic lignin biodegradation. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 21, p. 411-422, 1988.

- ROJÍEKOVÁ, R.; MARSÁLEK, B.; DUTKA, B.; McINNIS, R. Bioassays used for ecotoxicity at contaminated areas. Workshop NATO - Lituânia, 1998.
- RUEL, K.; JOSELEAU, J.P. Involvement of an extracellular glucan sheath during degradation of *Populus* wood by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 374-383, 1991.
- SALEM, V. Corantes na Indústria Têxtil. Uma abordagem Ecológica. **Química Têxtil**, v. 28, p. 16-21, 1995.
- SANJUST, E.; LOI, F.; RESCIGNO, A.; RINALDI, A.; SANNA, M.T.; FADDA, M.B. Laccase induction in *Pleurotus* spp. by olive milling wastewater. **Meeting of the Italian Society**, v. 40, n. 3, p. 170-171, 1991.
- SANNIA, G.; GIARDINA, P.; LUNA, M.; ROSSI, M.; BUONOCORE, V. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 11, p. 797-800, 1986.
- SEMPLE, K.T.; FERMOR, T.R. The bioremediation of xenobiotic contamination by composts and associated microflora. In: **Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi**. Oxford, 17-22, p. 917-924, 1995.
- SHEN, J.; ZHAO, Y. Treatment of wastewater from dye plants by biological activated carbon process. **Huajing Wuran Yu Fangzhi**, v. 13, n. 5, p. 2-6, 1991.
- SHIN, K.S.; OH, I.K.; KIM, C.J. Production and purification of remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1744-1748, 1997.
- SHU, H.; HUANG, C. Degradation of commercial azo dyes in water using ozonation and U.V. light enhanced ozonation process. **Chemosphere**, v. 31, p. 3813-3825, 1995.
- SHUKLA, S.P.; KUMAR, A.; TIWARI, D.N.; MISHRA, B.P.; UPTA, G.S. Assessment of the effect of the toxicity of a textile dye on *Nostoc muscorum* ISU, a diazotrophic cyanobacterium. **Environmental Pollution**, v. 84, p. 23-25, 1994.

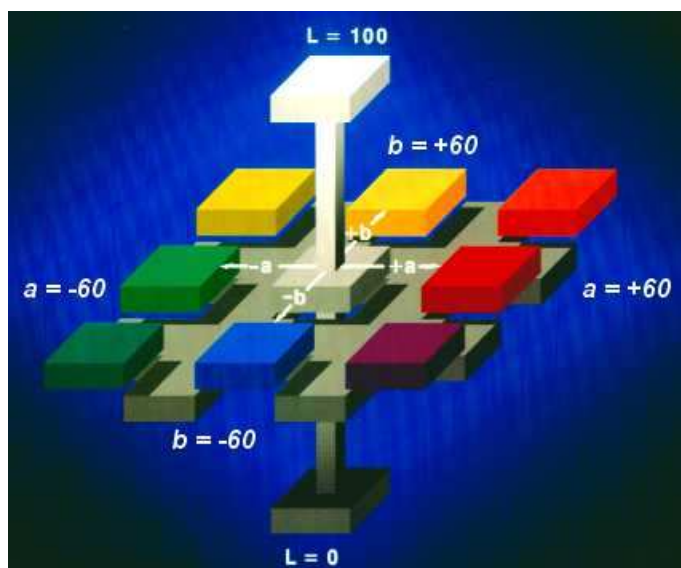
- SOSAK-SWIDERSKA, B.; TYRAWKA, D.; MASLIKOWSKA, B. Microalgal ecotoxicity test with 3,4-dichloroaniline. **Chemosphere**, v. 37, n. 14, p. 2975-2982, 1998.
- SPADARO, J.T.; GOLD, M.H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2397-2401, 1992.
- STANIGHER, C.A. Tratamento de efluente de tinturaria com sistema de lodo ativado. **Química Têxtil**, v. 17, p. 10-14, 1987.
- STURION, G.L.; OETTERER, M. Utilização da folha de bananeira como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 2, p. 194-200, 1995.
- SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, p. 234-240, 1984.
- TAUTORUS, T.E. Mushroom fermentation. In: MIZRAHI, A.; WEZEL, A.L. **Advances in Biotechnological Process** 5. New York, Alan R. Liss Inc., p.227-273, 1985.
- TROTMAN, E.R. Chemical constitution and colour, and classification of dyes. In: Dyeing and technology of textile fibres. London, Butler and Tanner Ltd, 1964, p.1-17.
- TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 1-17, 1995.
- VALENTOVIC, M.A.; YAHIA, T.; BALL, J.G.; HONG, S.K.; BROWN, P.I.; RANKIN, G.O. 3,4-Dichloroaniline acute toxicity in male Fischer 344 rats. **Toxicology**, v. 124, p. 125-134, 1997.
- VYAS, B.R.M.; MOLITORIS, H.P. Involvement of an extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue R. **Applied and Environmental Wastewater**, v. 61, p. 3919-3927, 1995.

VYAS, B.R.M.; VOLC, J.; SASEK, V. Effects of temperature on the production of manganese peroxidase and lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. **Folia Microbiologica**, v. 39, p. 19-22, 1994.

YOUNG, L.; YU, J. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v. 31, n. 5, p. 1187-1193, 1997.

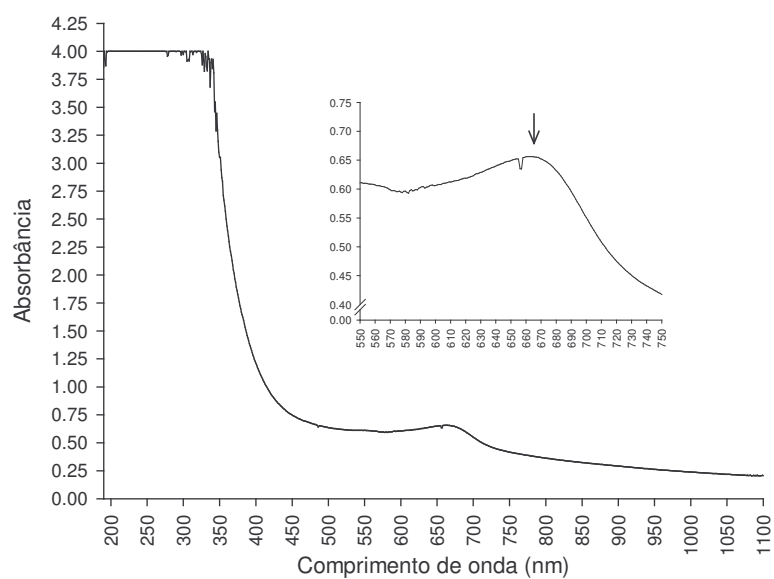
ZOLLINGER, H. 40 years of dye chemistry – past experience and future prospects. **Melliand Textilber**, v. 69, n. 9, p. 644-649, 1998.



**ANEXO A – Sistema coordenado de cor tridimensional L, a, b**



**ANEXO B – Espectro referente a varredura em espectrofotômetro, de efluente  
têxtil diluído 10 vezes**



### ANEXO C – Análise estatística

Tabela 01– Análise estatística para os dados de reflectância, referente a Figura 08

|            | Variáveis |    |        |   |       |   |
|------------|-----------|----|--------|---|-------|---|
|            | L*        |    | a*     |   | b*    |   |
| Controle   | 44,13     | ab | 2,8    | C | 16,53 | c |
| F2-corante | 42,90     | bc | 9,343  | B | 24,11 | b |
| F6-corante | 44,71     | a  | 10,053 | A | 26,11 | a |

\* Médias seguidas por letras distintas minúsculas em cada coluna, diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 02 – Quadro da Análise de Variâncias para a variável L

| Causa de Variação | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrados Médios | F    | Prob (>F) |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|-----------|
| Tratamento        | 3                  | 12,36             | 4,12             | 13,1 | 0,0019    |
| Resíduos          | 8                  | 2,52              | 0,31             |      |           |

Tabela 03 – Quadro da Análise de Variâncias para a variável a

| Causa de Variação | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrados Médios | F    | Prob (>F) |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|-----------|
| Tratamento        | 3                  | 113,1             | 37,7             | 1704 | 1,5e-11   |
| Resíduos          | 8                  | 0,2               | 0,022            |      |           |

Tabela 04 – Quadro da Análise de Variâncias para a variável b

| Causa de Variação | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrados Médios | F   | Prob (>F) |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----|-----------|
| Tratamento        | 3                  | 162,3             | 54,1             | 357 | 7,4e-09   |
| Resíduos          | 8                  | 1,2               | 0,2              |     |           |

Tabela 05 – Análise estatística para os dados de reflectância, referente a Figura 09.

|             | Variáveis |   |       |   |       |   |
|-------------|-----------|---|-------|---|-------|---|
|             | L*        |   | a*    |   | b*    |   |
| Controle    | 36,43     | a | 0,80  | a | 10,03 | a |
| F2-efluente | 38,94     | a | 10,68 | b | 23,05 | b |
| F6-efluente | 39,37     | a | 10,63 | b | 22,70 | b |

\* Médias seguidas por letras distintas minúsculas em cada coluna, diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 06 – Quadro da Análise de Variâncias para a variável L

| Causa de Variação | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrados Médios | F    | Prob (>F) |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|-----------|
| Tratamento        | 3                  | 15,57             | 5,19             | 3,03 | 0,093     |
| Resíduos          | 8                  | 13,72             | 1,72             |      |           |

Tabela 07 – Quadro da Análise de Variâncias para a variável a

| Causa de Variação | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrados Médios | F    | Prob (>F) |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|-----------|
| Tratamento        | 3                  | 223,9             | 74,6             | 1536 | 2,2e-11   |
| Resíduos          | 8                  | 0,4               | 0,049            |      |           |

Tabela 08 – Quadro da Análise de Variâncias para a variável b

| Causa de Variação | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrados Médios | F   | Prob (>F) |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----|-----------|
| Tratamento        | 3                  | 367               | 122              | 236 | 3,8e-08   |
| Resíduos          | 8                  | 4                 | 1                |     |           |

Tabela 09 - Análise estatística para os dados de reflectância, referente a Figura 05.

|           | Variáveis |    |       |   |       |    |
|-----------|-----------|----|-------|---|-------|----|
|           | L*        |    | a*    |   | b*    |    |
| Contr-com | 22,63     | c  | -1,10 | a | -2,53 | a  |
| Contr-sem | 20,57     | a  | -0,40 | b | -2,50 | ab |
| F2-com    | 26,73     | d  | 1,33  | c | 5,83  | c  |
| F2-sem    | 22,03     | b  | -0,53 | b | -1,83 | b  |
| F6-com    | 30,30     | e  | 4,83  | d | 11,87 | d  |
| F6-sem    | 22,43     | bc | -0,63 | b | -1,93 | ab |

\* Médias seguidas por letras distintas minúsculas em cada coluna, diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 10 – Quadro da Análise de Variâncias para a variável L– transformado por Box-Cox

| Causa de Variação | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrados Médios | F   | Prob (>F) |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----|-----------|
| Tratamento        | 5                  | 8,93e-14          | 1,79e-14         | 521 | 1,4e-13   |
| Resíduos          | 12                 | 4,00e-16          | 3,40e-17         |     |           |

Tabela 11 – Quadro da Análise de Variâncias para a variável a – transformado por Box-Cox

| Causa de Variação | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrados Médios | F   | Prob (>F) |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----|-----------|
| Tratamento        | 5                  | 0,1417            | 0,0283           | 180 | 7,5e-11   |
| Resíduos          | 12                 | 0,0019            | 0,0002           |     |           |

Tabela 12 – Quadro da Análise de Variâncias para a variável b – transformado por Box-Cox

| Causa de Variação | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrados Médios | F   | Prob (>F) |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----|-----------|
| Tratamento        | 5                  | 6,45              | 1,29             | 386 | 8e-13     |
| Resíduos          | 12                 | 0,04              | 0,0033           |     |           |

Tabela 13 – Atividade de Lacase (Figura 10).

|      |    | Tratamento       |     |                   |     |                   |     |
|------|----|------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|
|      |    | Controle*        |     | F2                |     | F6                |     |
| Dias | 7  | 1,031 ±<br>0,157 | a B | 11,624 ±<br>1,375 | a A | 7,935 ±<br>1,962  | a A |
|      | 14 | 0,772 ±<br>0,670 | a B | 11,880 ±<br>0,831 | a A | 14,188 ±<br>0,369 | a A |
|      | 21 | 1,101 ±<br>0,301 | a B | 10,213 ±<br>3,133 | a A | 10,530 ±<br>2,773 | a A |

\*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas em cada linha e letras minúsculas em cada coluna, diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 14 – Atividade de Peroxidase (Figura 11).

|      |    | Tratamento       |     |                   |     |                   |     |
|------|----|------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|
|      |    | Controle*        |     | F2                |     | F6                |     |
| Dias | 7  | 3,096 ±<br>1,125 | a B | 12,744 ±<br>2,212 | a A | 11,020 ±<br>1,157 | a A |
|      | 14 | 2,407 ±<br>1,825 | a B | 12,959 ±<br>0,170 | a A | 12,381 ±<br>4,008 | a A |
|      | 21 | 1,353 ±<br>1,190 | a B | 13,333 ±<br>0,136 | a A | 11,837 ±<br>1,585 | a A |

\*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas em cada linha e letras minúsculas em cada coluna, diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 15 – Atividade de Manganês Peroxidase (Figura 12).

|      |    | Tratamento       |     |                   |     |                   |     |
|------|----|------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|
|      |    | Controle*        |     | F2                |     | F6                |     |
| Dias | 7  | 0,080 ±<br>0,094 | a B | 13,498 ±<br>0,722 | a A | 18,251 ±<br>0,383 | a A |
|      | 14 | 0,273 ±<br>0,182 | a B | 8,759 ±<br>0,704  | b A | 8,909 ±<br>0,653  | b A |
|      | 21 | 0,118 ±<br>0,174 | a B | 8,669 ±<br>0,305  | b A | 6,158 ±<br>0,340  | b A |

\*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas em cada linha e letras minúsculas em cada coluna, diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 16 – Atividade de Lacase (Figura 15).

|      |    | Tratamento    |      |                |      |               |     |                |     |               |      |
|------|----|---------------|------|----------------|------|---------------|-----|----------------|-----|---------------|------|
|      |    | Controle*     |      | F2-efluente    |      | F2-glicose    |     | F6-efluente    |     | F6-glicose    |      |
|      | 3  | 0,979 ± 0,594 | a A  | 0,560 ± 0,534  | d A  | 0,043 ± 0,037 | c A | 0,312 ± 0,465  | d A | 0,163 ± 0,150 | c A  |
|      | 6  | 1,239 ± 0,726 | a D  | 9,364 ± 0,376  | b A  | 3,893 ± 0,066 | b C | 6,992 ± 0,225  | b B | 2,224 ± 0,211 | b CD |
| Dias | 9  | 0,258 ± 0,244 | a E  | 13,654 ± 1,012 | a A  | 7,538 ± 0,511 | a C | 11,415 ± 1,178 | a B | 5,205 ± 0,379 | a D  |
|      | 12 | 1,537 ± 0,709 | a BC | 2,650 ± 0,426  | c AB | 4,593 ± 0,376 | b A | 4,141 ± 0,428  | c A | 0,975 ± 0,602 | bc C |
|      | 15 | 1,111 ± 0,831 | a A  | 1,878 ± 0,147  | cd A | 1,478 ± 0,007 | c A | 3,500 ± 0,000  | c A | 0,919 ± 0,219 | bc A |

\*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas em cada linha e letras minúsculas em cada coluna, diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 17 – Atividade de Peroxidase (Figura 16).

|      |    | Tratamento    |     |                |      |                |      |                |       |                |     |
|------|----|---------------|-----|----------------|------|----------------|------|----------------|-------|----------------|-----|
|      |    | Controle*     |     | F2-efluente    |      | F2-glicose     |      | F6-efluente    |       | F6-glicose     |     |
|      | 3  | 1,710 ± 0,777 | a A | 0,136 ± 0,156  | c A  | 0,374 ± 0,412  | c A  | 0,159 ± 0,275  | d A   | 0,817 ± 0,758  | c A |
|      | 6  | 1,679 ± 1,434 | a B | 9,184 ± 0,170  | b A  | 9,387 ± 0,872  | b A  | 8,594 ± 1,035  | c A   | 7,404 ± 0,766  | b A |
| Dias | 9  | 2,439 ± 2,461 | a C | 14,574 ± 1,581 | a A  | 13,446 ± 0,511 | a AB | 15,215 ± 0,247 | a A   | 11,565 ± 0,034 | a B |
|      | 12 | 1,618 ± 1,591 | a C | 10,850 ± 0,810 | b A  | 11,258 ± 0,034 | ab A | 10,289 ± 0,221 | bc AB | 7,404 ± 0,275  | b B |
|      | 15 | 1,853 ± 0,591 | a C | 9,558 ± 0,068  | b AB | 9,897 ± 1,258  | b AB | 11,659 ± 0,419 | b A   | 7,994 ± 1,014  | b B |

\*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas em cada linha e letras minúsculas em cada coluna, diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 18 – Atividade de Manganês Peroxidase (Figura 17).

|      |    | Tratamento    |     |                |     |                |      |                |      |               |      |  |  |
|------|----|---------------|-----|----------------|-----|----------------|------|----------------|------|---------------|------|--|--|
|      |    | Controle*     |     | F2-efluente    |     | F2-glicose     |      | F6-efluente    |      | F6-glicose    |      |  |  |
|      | 3  | 0,240 ± 0,231 | a B | 0,852 ± 0,984  | d B | 0,105 ± 0,094  | c B  | 0,389 ± 0,431  | c B  | 3,149 ± 0,545 | b A  |  |  |
|      | 6  | 0,205 ± 0,080 | a A | 0,479 ± 0,212  | d A | 0,494 ± 0,118  | c A  | 0,627 ± 0,551  | c A  | 0,254 ± 0,103 | c A  |  |  |
| Dias | 9  | 0,140 ± 0,146 | a B | 2,945 ± 0,292  | c A | 0,478 ± 0,181  | c AB | 1,465 ± 0,137  | c AB | 0,628 ± 0,078 | c AB |  |  |
|      | 12 | 0,167 ± 0,089 | a C | 11,689 ± 0,858 | a A | 10,105 ± 0,612 | a A  | 10,508 ± 0,299 | a A  | 6,966 ± 1,220 | a B  |  |  |
|      | 15 | 0,218 ± 0,135 | a C | 8,760 ± 1,114  | b A | 4,126 ± 0,311  | b B  | 8,078 ± 1,092  | b A  | 3,857 ± 0,350 | b B  |  |  |

\*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas em cada linha e letras minúsculas em cada coluna, diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 19 - Significâncias de efeitos de diferentes concentrações de amostra (efluente, efluente tratado pelos fungos, extrato de fungos crescidos com glicose) sobre o percentual de germinação de sementes de alface em relação ao controle (Figuras 18, 19 e 20).

| Concentração                     | Amostras        |                 |                 |                 |                 |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                  | Efluente        | F2-glic.        | F2-efl.         | F6-glic.        | F6-efl.         |
| ----- 14 dias de incubação ----- |                 |                 |                 |                 |                 |
| 1,56                             | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> |
| 3,125                            | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 6,25                             | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 12,5                             | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 25                               | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 50                               | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| ----- 20 dias -----              |                 |                 |                 |                 |                 |
| 1,56                             | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> |
| 3,125                            | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 6,25                             | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 12,5                             | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 25                               | ns              | ns              | *               | ns              | *               |
| 50                               | ns              | *               | *               | *               | *               |
| ----- 40 dias -----              |                 |                 |                 |                 |                 |
| 1,56                             | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> |
| 3,125                            | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 6,25                             | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 12,5                             | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 25                               | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 50                               | ns              | *               | *               | ns              | *               |

<sup>a</sup> Comparação múltipla não-paramétrica pelo teste de Behrens-Fisher a 5% de probabilidade

onde ns - não significante e

\* - significante

Tabela 20 - Significâncias de efeitos de diferentes concentrações de amostra (efluente, efluente tratado pelos fungos, extrato de fungos crescidos com glicose) sobre o percentual de alongação de raízes de alface em relação ao controle (Figuras 21, 22 e 23).

| Concentração                     | Amostras        |                 |                 |                 |                 |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                  | Efluente        | F2-glic.        | F2-efl.         | F6-glic.        | F6-efl.         |
| ----- 14 dias de incubação ----- |                 |                 |                 |                 |                 |
| 1,56                             | ns <sup>b</sup> | ns <sup>b</sup> | ns <sup>b</sup> | ns <sup>b</sup> | ns <sup>b</sup> |
| 3,125                            | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 6,25                             | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 12,5                             | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 25                               | *               | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 50                               | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| ----- 20 dias -----              |                 |                 |                 |                 |                 |
| 1,56                             | ns <sup>b</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>a</sup> |
| 3,125                            | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 6,25                             | *               | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 12,5                             | *               | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 25                               | ns              | ns              | *               | ns              | *               |
| 50                               | *               | *               | *               | *               | *               |
| ----- 40 dias -----              |                 |                 |                 |                 |                 |
| 1,56                             | ns <sup>b</sup> | ns <sup>b</sup> | ns <sup>a</sup> | ns <sup>b</sup> | ns <sup>a</sup> |
| 3,125                            | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 6,25                             | ns              | ns              | ns              | ns              | ns              |
| 12,5                             | ns              | *               | ns              | ns              | ns              |
| 25                               | *               | *               | ns              | ns              | ns              |
| 50                               | ns              | *               | *               | *               | *               |

<sup>a</sup> Comparação múltipla não-paramétrica pelo teste de Behrens-Fisher a 5% de probabilidade

<sup>b</sup> Comparação múltipla paramétrica de Dunnett a 5% de probabilidade

Tabela 21 - Significâncias de efeitos de diferentes concentrações de amostra (efluente, efluente tratado pelos fungos, extrato de fungos crescidos com glicose) sobre o percentual de crescimento populacional de alga em relação ao controle (Figuras 24, 25 e 26).

| Concentração                     | Amostras |                 |         |                 |         |
|----------------------------------|----------|-----------------|---------|-----------------|---------|
|                                  | Efluente | F2-glic.        | F2-efl. | F6-glic.        | F6-efl. |
| ----- 14 dias de incubação ----- |          |                 |         |                 |         |
| 1,56                             | *b       | ns <sup>b</sup> | * b     | ns <sup>b</sup> | * b     |
| 3,125                            | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 6,25                             | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 12,5                             | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 25                               | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 50                               | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| ----- 20 dias -----              |          |                 |         |                 |         |
| 1,56                             | * b      | ns <sup>b</sup> | * b     | ns <sup>b</sup> | * b     |
| 3,125                            | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 6,25                             | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 12,5                             | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 25                               | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 50                               | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| ----- 40 dias -----              |          |                 |         |                 |         |
| 1,56                             | * b      | ns <sup>b</sup> | * b     | ns <sup>b</sup> | * b     |
| 3,125                            | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 6,25                             | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 12,5                             | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 25                               | *        | ns              | *       | ns              | *       |
| 50                               | *        | ns              | *       | ns              | *       |

<sup>b</sup> Comparação múltipla paramétrica de Dunnett a 5% de probabilidade