

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química**

Tese de Doutorado

**REMEDIÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL:
COMBINAÇÃO ENTRE PROCESSO
QUÍMICO (OZÔNIO) E BIOLÓGICO
(*P. CHRYSOSPORIUM*).**

AIRTON KUNZ

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Campinas, setembro de 1999

UNIDADE	I Ch
N.º CHAMADA:	F11/Unicamp
	K964r
V.	Ex.
TOMBO BC/	40911
PROC.	278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	\$ 11,00
DATA	12/04/00
N.º CPD	

CM-00138995-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

K964r Kunz, Airton
Remediação de efluente têxtil: combinação entre
processo químico (ozônio) e biológico (*P. chrysosporium*) /
Airton Kunz. – Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química.

1. Ozônio. 2. *Phanerochaete chrysosporium*.
3. Efluente têxtil. 4. Tratamento combinado.
I. Durán Caballero, Nelson Eduardo. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. Nelson Durán pelas facilidades colocadas para desenvolver esta tese sempre propiciando uma grande liberdade para a realização do trabalho, pelas oportunidades e pela amizade que desenvolvemos durante este trabalho de tese.

- Aos professores Jaime Baeza, Juanita Freer, Hector Mansilla e todo o pessoal do Laboratório de Recursos Renovables (Concepcion – Chile) por se demonstrarem sempre tão prestativos durante o período de meu estágio.

- Aos amigos chilenos, Carolina, Lili, Sami, Romulo e Jaime Tellez.

- Ao pessoal do laboratório, Ana Olivia, Chico, Daniel, Darcio, prof. Juan, Mariangela Santiago, Mariangela Burgos, Natalia, Renato, Ronaldo, Rosana e Sandra pela convivência sempre muito agradável.

- Aos colegas do grupo do prof. Rittner (especialmente à Silvana e ao Rinaldo).

- À FAPESP pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho de tese.

- Ao Instituto de Química e seus funcionários pelo apoio técnico e material.

ÍNDICE

	pg
Abreviaturas utilizadas.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
1-Introdução.....	1
1.1-O problema do efluente têxtil.....	2
1.2-Classificação dos corantes.....	5
1.3-O uso do ozônio no tratamento de efluentes.....	7
1.3.1-Oxidação direta.....	9
1.3.2-Oxidação indireta.....	9
1.4-A utilização de fungos no tratamento de efluentes.....	11
1.4.1-Peroxidases.....	12
1.4.1.1-Lignina Peroxidase.....	13
1.4.1.2-Manganês Peroxidase.....	14
1.5-A integração de processos químicos e biológicos.....	15
2-Objetivos do trabalho.....	18
3-Parte experimental.....	19
3.1-Coleta do efluente têxtil.....	19
3.2-Amostras de corantes utilizados.....	19
3.3-Estudos preliminares no trat. de efluente têxtil com o fungo <i>P. chrysosporium</i>	19
3.3.1-Cultivo do fungo em meio sólido.....	19
3.3.2-Cultivo do fungo em meio líquido.....	20
3.3.2.1-Preparação da suspensão de esporos.....	20
3.3.2.2-Inoculação da suspensão de esporos no efluente.....	20
3.4-Experimentos realizados no LRR.....	21
3.4.1-Ozonização das soluções de corantes.....	21
3.4.1.1-Produção e medida de ozônio.....	21
3.4.1.2-Ozonização.....	21
3.4.2-Testes de toxicidade dos intermediários formados.....	21
3.4.3-Métodos analíticos utilizados nos experimentos realizados no LRR.....	22
3.4.3.1-Determinação da demanda química de oxigênio.....	22
3.4.3.2-Análises por CLAE.....	22
3.4.3.3-Determinação de sulfato.....	23
3.4.3.4-Determinação de cobre total por espectrometria de absorção atômica.....	23

3.5-Tratamento do efluente têxtil com o fungo <i>P. chrysosporium</i>	23
3.5.1-Preparação da suspensão de esporos.....	23
3.5.2-Inoculação da suspensão de esporos no efluente.....	23
3.5.3-Meio sintético para crescimento do fungo.....	24
3.5.3.1-Preparação da solução de elementos traço.....	24
3.5.3.2-Preparação da solução de vitaminas.....	25
3.5.3.3-Preparação da solução tampão.....	26
3.6-Tratamento com ozônio.....	27
3.6.1-Geração e medida de ozônio.....	27
3.6.2-Ozonização.....	27
3.7-Métodos analíticos utilizados nos itens 3.3; 3.5 e 3.6.....	30
3.7.1-Determinação de açúcares redutores.....	30
3.7.2-Determinação da atividade da enzima lignina peroxidase.....	30
3.7.3-Determinação da atividade da enzima manganês peroxidase.....	31
3.7.4-Determinação de fenóis totais.....	31
3.7.5-Determinação de metais totais por espectrometria de absorção atômica.....	32
3.7.6-Determinação de proteína solúvel.....	32
3.7.7-Determinação de cor.....	33
3.7.8-Determinação de cloretos.....	33
3.7.9-Determinação da distribuição da massa molecular do efluente têxtil.....	33
3.7.10-Determinação de carbono orgânico total.....	34
3.8-Estudos de transferência de massa no reator de ozônio.....	35
3.8.1-Preparação da solução do reagente índigo.....	35
3.8.1.1-Solução mãe.....	35
3.8.1.2-Solução índigo I.....	36
3.8.1.3-Solução índigo II.....	36
3.9-Ensaio de toxicidade.....	36
3.9.1-Ensaio de toxicidade com a alga <i>S. subspicatus</i>	36
3.9.1.1-Cultura da alga.....	36
3.9.1.2-Preparação do meio A.....	37
3.9.1.3-Condições do ensaio.....	38
3.9.1.4-Medida da concentração da alga.....	40
3.9.1.5-Expressão dos resultados do ensaio.....	41
3.9.2-Ensaio de toxicidade com a bactéria <i>E. coli</i>	42
3.9.2.1-Cultura da bactéria.....	42
3.9.2.2-Preparação do meio de cultura.....	42
3.9.2.3-Monitoramento de CO ₂ pelo sistema FIA condutométrico.....	43

3.9.2.4-Realização do ensaio.....	45
4-Resultados e discussão.....	46
4.1-Cultivo do fungo em meio sólido.....	46
4.2-Cultivo do fungo com efluente em meio líquido.....	47
4.3-Resultados obtidos no <i>laboratorio de recursos renovables</i>	51
4.3.1-Ozonização dos corantes.....	51
4.3.2-Toxicidade dos intermediários formados.....	56
4.3.3-Determinação de DQO e COT.....	59
4.3.4-Análise por CLAE dos compostos formados com a ozonização.....	61
4.4-Montagem e otimização do equipamento para ozonização.....	68
4.4.1-Interfaceamento.....	68
4.4.2-Medida da produção de ozônio.....	69
4.4.3-Transferência de massa no reator.....	70
4.5-Tratamento com ozônio.....	75
4.6-Tratamento biológico com o fungo <i>P. chrysosporium</i>	81
4.6.1-Determinação de metais por espectrometria de absorção atômica.....	89
4.7-Tratamento combinado do efluente têxtil.....	90
4.7.1-Sequência Ozônio- <i>P. chrysosporium</i>	93
4.7.1.1-Pré-tratamento com ozônio.....	93
4.7.1.2-Pós-tratamento com o fungo <i>P. chrysosporium</i>	93
4.7.2-Sequência <i>P. chrysosporium</i> -ozônio.....	102
4.7.2.1-Pré-tratamento com o fungo <i>P. chrysosporium</i>	102
4.7.2.2-Pós-tratamento com ozônio.....	105
5-Conclusões.....	111
6-Perspectivas para trabalhos futuros.....	112
6-Referências bibliográficas.....	113
7-Atividades desenvolvidas durante o período de doutoramento.....	125

ABREVIATURAS UTILIZADAS

APHA	American public health association
ATCC	American type culture collections
CBB	Comassie brilliant blue
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNUMAD	Conferência das nações unidas sobre o meio ambiente e desenvolvimento
COT	Carbono orgânico total
CPG	Cromatografia de permeação em gel
DNS	Dinitricsalicylic acid
DQO	Demanda química de oxigênio
EAA	Espectrometria de absorção atômica
EC 50	Concentração de uma substância que causa inibição de 50 % do parâmetro observado
FIA	Flow injection analysis
HRP	Peroxidase de raiz forte
ISO	International Standard Organization
LIP	Lignina peroxidase
LRR	Laboratorio de recursos renovables
MeV	Microscopia eletrônica de varredura
MnP	Manganês peroxidase
RPM	Rotações por minuto
R-5	Corante preto reativo-5
R-19	Corante azul reativo-19
R-21	Corante azul reativo-21

RESUMO

REMEDIÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL: COMBINAÇÃO ENTRE PROCESSO QUÍMICO (OZÔNIO) E BIOLÓGICO (FUNGO *P. CHRYSOSPORIUM*)

Autor: Airton Kunz

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero.

Sob o ponto de vista ambiental, a indústria têxtil produz efluentes ainda altamente impactantes aos corpos aquáticos receptores após seu tratamento por processos chamados convencionais. Isto se deve principalmente a presença de corantes, que são provenientes do tingimento da fibra, onde cerca de 30 % do corante aplicado se perde no efluente. Isso resulta em resíduos altamente coloridos que podem causar mudanças no ecossistema ao qual serão lançados.

Neste trabalho foram estudados um processo químico (ozônio) e um processo biológico (fungo *P. chrysosporium*) primeiramente isolados e posteriormente combinados avaliando-se qual a melhor sequência de tratamento para este efluente.

Pelos dados obtidos das sequências ozônio-*P.chrysosporium* e *P.chrysosporium*-ozônio é possível concluir que a segunda sequência mostra-se mais adequada principalmente por ser mais efetiva na descoloração do efluente, consumo de ozônio e toxicidade frente aos organismos teste utilizados. O aumento da toxicidade durante a ozonização na primeira sequência pode estar afetando a eficiência do pós-tratamento com o fungo embora este consiga reduzir a toxicidade do efluente após tratamento com ozônio.

Palavras-chave: Ozônio, *Phanerochaete chrysosporium*, efluente têxtil

ABSTRACT

TEXTILE EFFLUENT REMEDIATION: COMBINATION BETWEEN CHEMICAL (OZONE) AND BIOLOGICAL PROCESS (FUNGUS *P. CHRYSOSPORIUM*)

Author: Airton Kunz

Supervisor: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero.

The textile industry still produces highly impactant effluents to the receiving aquatic bodies after its treatment by conventional processes. This is mainly due to the presence of dyes released to the effluent during textile fiber dyeing. These results in highly coloured effluents that can cause changes in the ecosystem to which they will be released.

In this work a chemical process (ozone) and a biological one (*P. chrysosporium* fungus) were studied, isolated and afterwards combined evaluating the best treatment sequence for the effluent.

For the obtained sequence data ozone-*P. chrysosporium* and *P. chrysosporium*-ozone, it is possible to conclude that the second sequence is mostly recommended due to its efficiency in the effluent decoloration, ozone consumption, and toxicity reduction shown to the test organisms. The increase in the toxicity shown during the ozonization in the first sequence probably affects the efficiency of the post-treatment with the fungus although the toxicity be reduced at the end of the process.

Key-words: Ozone, *Phanerochaete chrysosporium*, textile effluent.

1 - INTRODUÇÃO

Atualmente passamos por um período de transformações em nossa sociedade no que diz respeito ao tratamento das questões relacionadas ao meio ambiente que nos cerca. De certa forma parece que, embora muito lentamente, as pessoas estão se conscientizando de que precisamos preservar o meio ambiente e a biodiversidade que ainda nos restam, porque a nossa sobrevivência e a de gerações que nos sucederão está diretamente condicionada a isto. Isto faz com que conceitos como qualidade de vida e desenvolvimento sustentável estejam cada vez mais em voga, sendo intensamente discutidos pela sociedade.

Estas transformações passaram a ser mais pronunciadas a partir do início desta década, principalmente após a conferência das nações unidas sobre meio ambiente e desenvolvimento (CNUMAD – Rio 92). Uma nova postura foi criada baseando-se na idéia de que o meio ambiente e o desenvolvimento precisam ser tratados em conjunto; ao contrário das propostas tradicionais que pregavam um desenvolvimento predador do meio ambiente sendo gerador de profundos desequilíbrios sociais e regionais (Philippi *e col*, 1998).

O setor industrial parece que também está se conscientizando com relação a este aspecto, tendo observado que antes de mais nada a preocupação com relação ao meio ambiente é sobretudo uma questão de sobrevivência num mercado cada vez mais competitivo. Esta preocupação está muito visível no que se refere, por exemplo, ao interesse de muitas empresas na implantação de sistemas de gestão ambiental e de interação e implementação das normas da série ISO 14000 (Kunz, 1997; Petillo *e col*, 1998).

Dentro deste contexto o setor industrial tem se preocupado em investir em novas tecnologias para reduzir custos e a poluição ao meio ambiente. Atualmente grandes investimentos são realizados na pesquisa e aplicação de tecnologias limpas as quais através de um único investimento, visam a economia energética, de água e a redução da poluição (Costa e Martins, 1998).

A economia de água nos processos produtivos merece uma especial atenção devido ao seu alto custo, bem como a algumas previsões de escassez já para o início do próximo século. Pode-se citar, por exemplo, a previsão feita pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (Sabesp) que estimou que já em 2010 a demanda de água deverá ser superior a disponibilidade hídrica do Estado (Furtado, 1997).

Aliadas às novas tecnologias aplicadas no processo produtivo, estudos para reutilização e ou remediação de efluentes vem sendo realizados e já aplicados, visando diminuir o desperdício de água e a emissão de poluentes no meio ambiente (Silva, 1997).

Quanto ao tratamento dos efluentes, os desafios são cada vez maiores e a busca de novas tecnologias, e a combinação das já existentes, para levar a cabo estes objetivos tem se tornado cada vez mais necessários. Isto se deve, além dos motivos expostos acima, a uma legislação cada vez mais rígida que obriga às indústrias a aumentarem a eficiência de seus sistemas de tratamento de efluentes para se adequarem aos padrões exigidos, além da inserção da variável ecológica na mentalidade do setor produtivo.

1.1 – O problema do efluente têxtil:

O aumento do parque industrial instalado em nosso país e também no mundo, tem trazido muitos benefícios à população proporcionando uma sensível melhora na qualidade de vida. No entanto, isto também tem trazido vários efeitos negativos como um eminente esgotamento de nossos recursos naturais não renováveis e a destruição de ecossistemas, principalmente em países chamados de terceiro mundo onde as legislações ambientais ainda não são suficientemente rígidas e eficientes.

As constantes agressões ao meio ambiente, principalmente favorecidas pela geração de grandes volumes de resíduos, os quais apresentam composição cada vez mais complexa, têm forçado a busca de novas tecnologias de remediação.

O setor têxtil, dentro do panorama atual, está em constante crescimento (TABELA 1) e apresenta um elevado potencial poluente. Uma indústria têxtil de médio porte apresenta um potencial poluidor de 7000 pessoas (em se tratando de carga

hidráulica), ou 20.000 pessoas (com relação a carga orgânica). Além disso, existe o agravante dos efluentes serem de composição extremamente variável, apresentando um alto potencial de choque ao corpo receptor (Conchon, 1995).

TABELA 1: Consumo *per Capita* de Têxteis.

	1990	1991	1992	1993	1994
Consumo (kg/habitante)	6,3	6,7	5,8	7,2	7,7

Fonte: ABIT-Associação Brasileira da Indústria Têxtil.

Sem dúvida, o maior problema no tratamento de efluentes têxteis se deve à presença de corantes oriundos principalmente da etapa de tingimento, durante os chamados beneficiamentos secundários do processamento têxtil (FIGURA 1). Estes corantes normalmente são recalcitrantes (compostos que permanecem num determinado ambiente de forma inalterada, podendo ser naturais ou xenobióticos) ou apresentam uma cinética de degradação muito lenta para os processos biológicos convencionais e geram efluentes finais (após o tratamento) com uma coloração ainda muito intensa (Bahorsky e Bryant, 1995; Peres, 1997).

O setor têxtil no Brasil consome atualmente cerca de 20 toneladas/ano de corantes. Deste montante, cerca de 30 % se perde nos resíduos, sendo que a maior parte passa por estas estações chamadas convencionais (normalmente lodo ativado), sendo descarregadas nos corpos receptores (Copper *et al.*, 1994; Furtado, 1996).

A princípio, o volume de corante produzido pode parecer pouco significativo quando comparado com o parque de máquinas instalado, no entanto devemos atentar para o alto potencial coloridor destes compostos. O olho humano pode detectar concentrações de corantes reativos na ordem de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas claras de rios, particularmente nas regiões do espectro entre o vermelho e o púrpuro (Pierce, 1994).

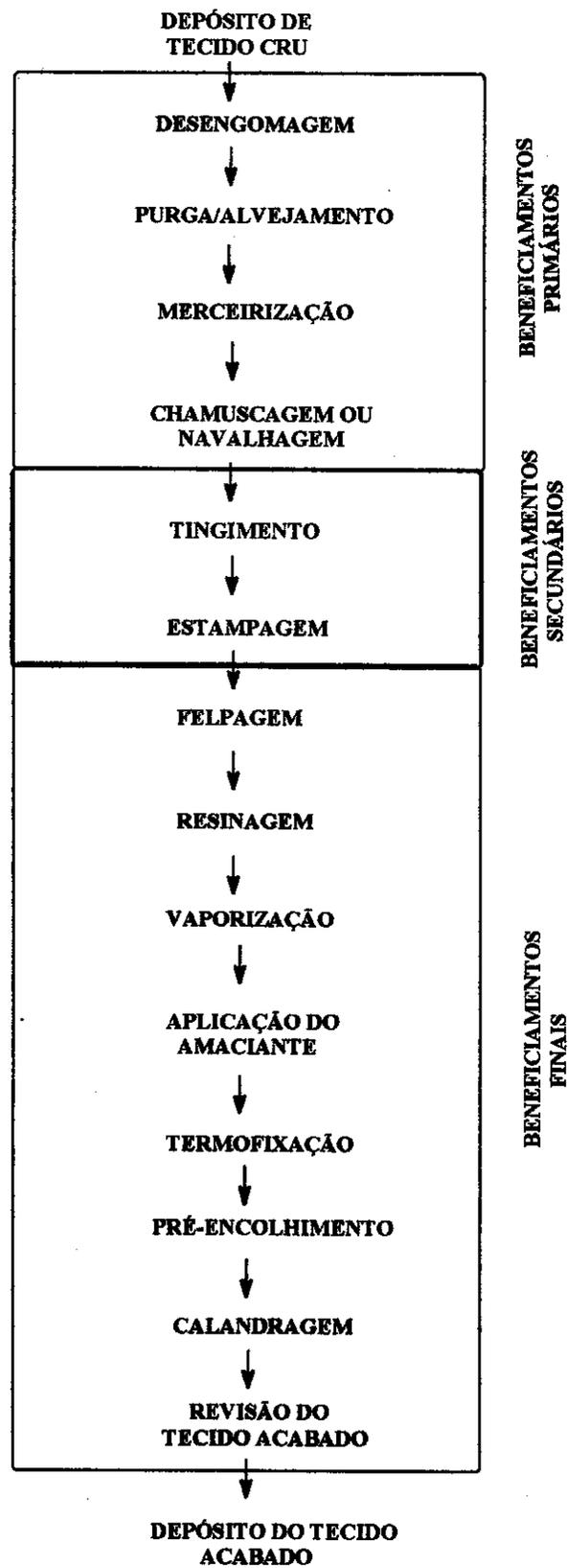


FIGURA 1: Fluxograma do beneficiamento têxtil (Furtado, 1996).

A poluição de corpos d'água com estes compostos provocam, além da poluição visual, alterações em ciclos biológicos afetando principalmente mecanismos de fotossíntese. Algumas classes de corantes e seus subprodutos, principalmente azocorantes, podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos (Chung e Cerniglia, 1992; Brown e DeVito, 1993).

1.2 – Classificação dos corantes:

A molécula de um corante utilizado para tingimento da fibra têxtil pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo e a estrutura responsável pela fixação à fibra.

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente nos corantes mas sem dúvida o mais representativo e largamente utilizado são o da família dos azocorantes (FIGURA 2). Os azocorantes representam atualmente cerca de 60 % do mercado mundial de corantes, sendo amplamente utilizados no tingimento da fibra têxtil (Vandevivere e col.; 1998).

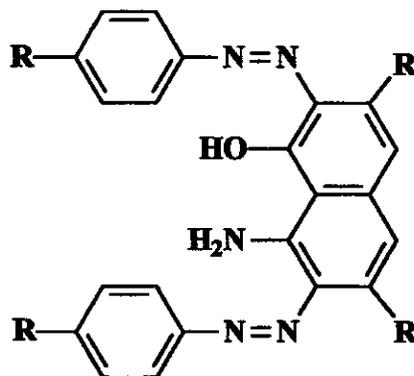


FIGURA 2: Estrutura química de um azo corante.

A outra parte da molécula do corante, além do grupo cromóforo, é responsável pela fixação do corante a fibra têxtil. Existem várias classes de corantes classificados segundo a forma de fixação a fibra, como por exemplo, corantes ácidos,

diretos, básicos, a tina, enxofre, etc (FIGURA 3) sendo este último o mais utilizado (Encyclopedia of Chemical Technology, 1990).

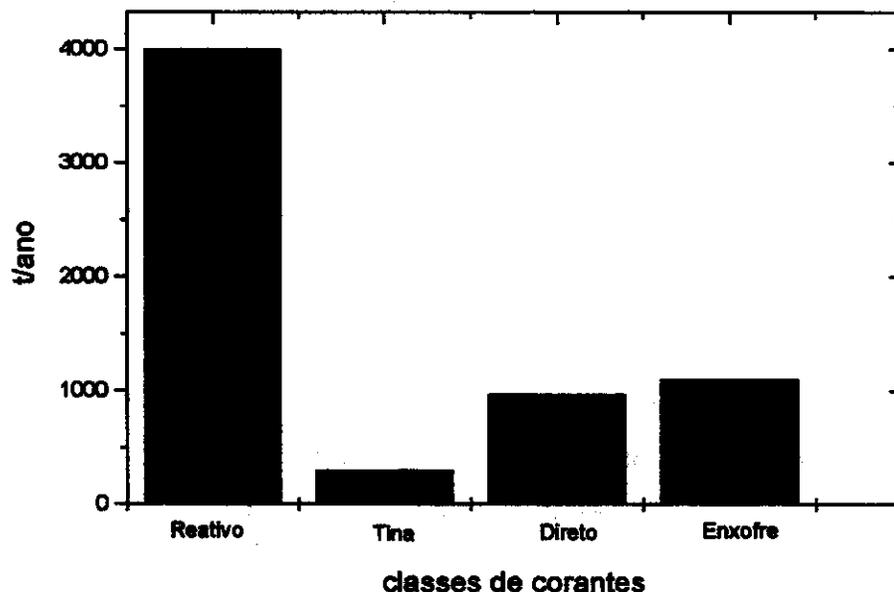


FIGURA 3: Consumo brasileiro de algumas classes de corantes para tingimento de fibras celulósicas (Mangold, 1995).

Os corantes reativos são assim chamados porque possuem a capacidade de formar ligações covalentes com a fibra (FIGURA 4). A isto se deve o fato destes corantes poderem ser aplicados quase que universalmente com boas características de tingimento, solidez e estabilidade química (Mangold, 1995; Alcantara e Daltin, 1996).

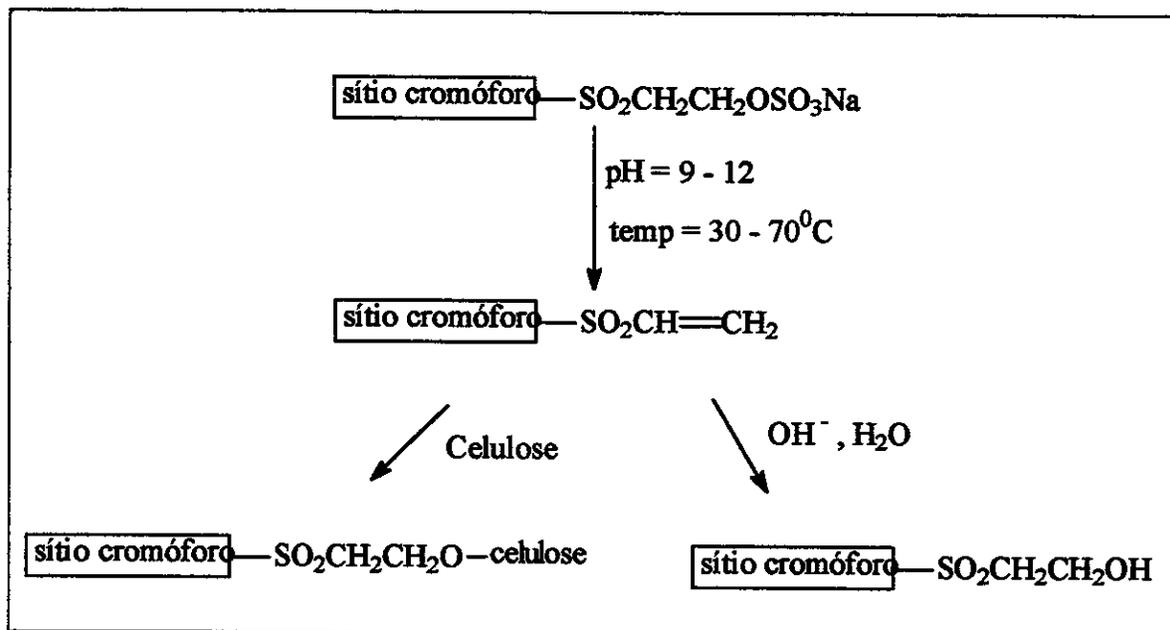


FIGURA 4: Interação do corante reativo com a fibra têxtil (Pelegrini *e col*, 1999).

1.3 – O uso do ozônio no tratamento de efluentes:

O ozônio, a forma triatômica do oxigênio, apresenta-se como um gás incolor e de odor pungente. Em fase aquosa, o ozônio decompõe-se rapidamente a oxigênio e espécies radiculares. O ozônio é um agente oxidante muito poderoso ($E^0 = 2,08 \text{ V}$) quando comparado a outros agentes oxidantes, como por exemplo H_2O_2 ($E^0 = 1,78 \text{ V}$), permitindo que esta espécie possa reagir com uma numerosa classe de compostos (Masten e Davis, 1994; Chamarro, 1996; Kunz *e col*, 1997a).

Devido a instabilidade do ozônio, o que impede sua armazenagem, torna-se necessário sua geração “in situ”. Dentre os diferentes processos utilizados para a geração de ozônio, o mais difundido é o método de descarga por efeito corona (FIGURA 5), sendo atualmente utilizado em praticamente todos os ozonizadores disponíveis comercialmente.

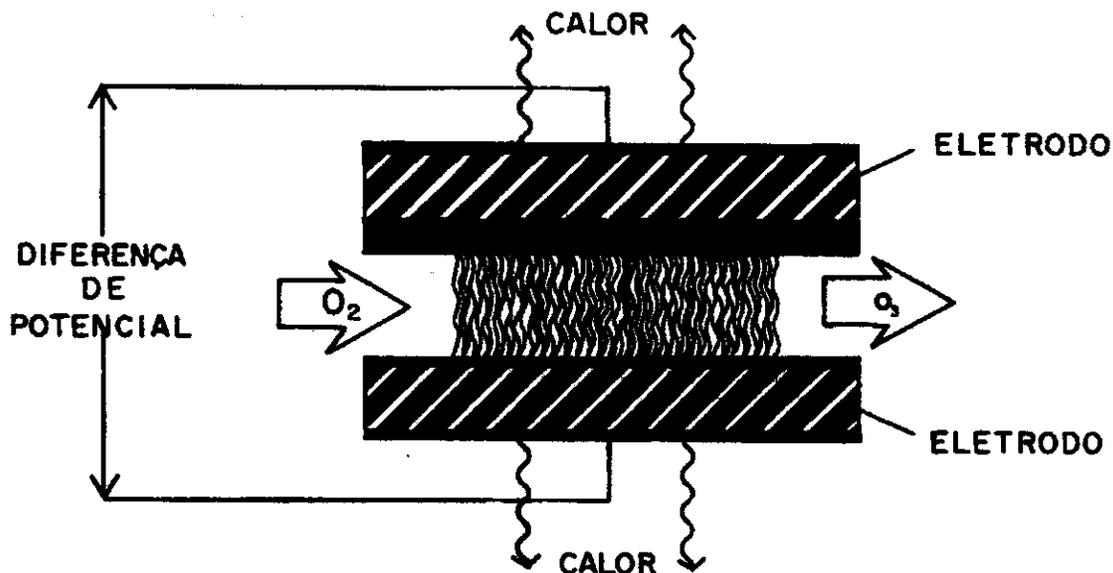


FIGURA 5: Geração de ozônio por efeito corona (Lin e Yeh, 1993).

Neste método, o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 10 KV). Isto causa a dissociação do oxigênio, sendo a formação do ozônio consequência da recombinação de espécies radiculares de oxigênio, com moléculas de oxigênio presentes no sistema. O rendimento deste processo varia entre 1 a 4 % (m/m) e entre 6 a 14 % (m/m) para sistemas alimentados por ar ou oxigênio, respectivamente (Rice, 1996).

A partir de sua descoberta e considerando-se suas características altamente oxidantes, o ozônio despertou grande interesse, sendo atualmente empregado para as mais diversas finalidades. Sua primeira aplicação em escala industrial ocorreu no início deste século, na França, sendo utilizado no tratamento de águas de abastecimento (Weber *e col*, 1986; Glaze, 1987; Mark, 1994).

No entanto, a grande dificuldade encontrada para utilização de ozônio em larga escala foi o alto custo dos sistemas de geração deste gás. Contudo, nesta década, o ozônio adquiriu novamente importância no cenário internacional, principalmente devido ao seu emprego na indústria de papel, onde vem substituindo o uso de cloro no processo de branqueamento de polpa celulósica (Rounsaville e Rice, 1997). A principal característica deste processo é a obtenção de polpas livre de cloro, o que tem colaborado

para uma diminuição da contaminação do meio ambiente pela indústria de papel. Isso impulsionou o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitaram a construção de ozonizadores de menor custo e de maior eficiência de conversão. Com isso, o ozônio tem se tornado atrativo para aplicação em outros campos, como por exemplo no tratamento de efluentes, motivado principalmente pelo barateamento de seus custos de geração.

A oxidação de poluentes através do ozônio pode ocorrer de maneira direta ou indireta (Masten e Davis, 1994):

1.3.1 Oxidação direta:

Através deste processo a molécula de ozônio reage diretamente com outras moléculas orgânicas ou inorgânicas através de reações de adição eletrofílica (FIGURA 6). O ataque eletrofílico pela molécula de ozônio pode ocorrer em átomos que carreguem uma densidade de carga negativa (N, P, O ou carbonos nucleofílicos) ou às ligações duplas ou triplas do tipo carbono-carbono, carbono-nitrogênio e nitrogênio-nitrogênio (Lin e Yeah, 1993).

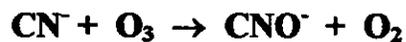


FIGURA 6: Alguns exemplos de oxidação direta com ozônio (Esplugas, 1995)

1.3.2 - Oxidação indireta:

Indiretamente o ozônio pode reagir via radical livre (principalmente $\cdot\text{OH}$) que é gerado pela decomposição do ozônio (FIGURA 7). O radical hidroxila é um oxidante poderoso ($E^0 = 2,80\text{V}$) e não seletivo podendo reagir através de três mecanismos; *i*) abstração de hidrogênio, *ii*) transferência de elétrons ou *iii*) adição radicalar (FIGURA 8).

Os radicais secundários formados durante estas reações podem reagir com o ozônio ou outros solutos.

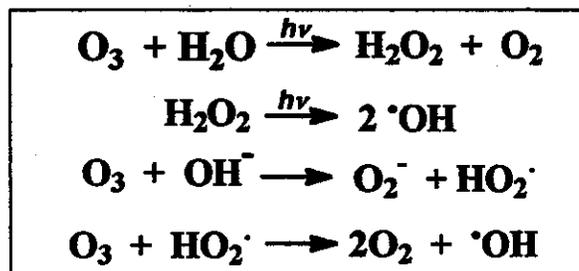


FIGURA 7: Reações de decomposição do ozônio formando espécies radicalares (Peleg, 1976; Chamarro *e col.*, 1996).

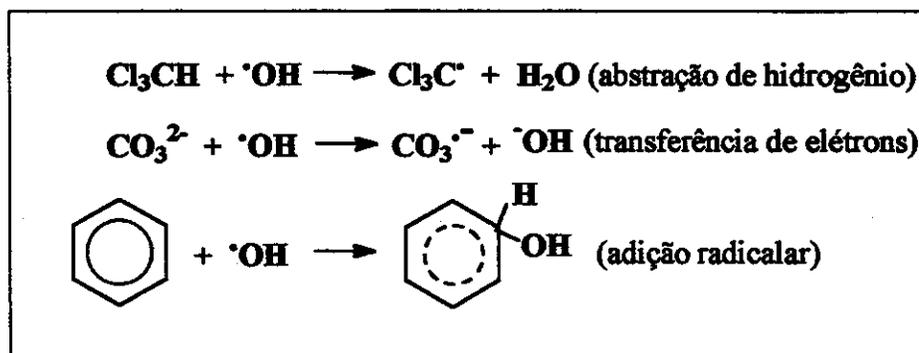


FIGURA 8: Tipos de reações iniciadas pelo radical hidroxila (Calvosa *e col.*, 1991).

Para o tratamento de efluentes têxteis o ozônio apresenta-se muito atrativo e com a possibilidade de aplicação considerável. Como os grupamentos cromóforos das moléculas dos corantes geralmente são compostos orgânicos policíclicos com ligações duplas do tipo carbono-carbono, carbono-oxigênio, carbono-nitrogênio e nitrogênio-nitrogênio; estas ligações podem ser clivadas dando origem a outras moléculas menores, perdendo suas características iniciais.

Neste sentido, vários estudos têm demonstrado a eficiência do ozônio na remoção de cor destes efluentes. Lin e Liu (1994) observaram a descoloração de efluente

têxtil submetido a ozonização em contra-corrente em tempos geralmente inferiores a cinco minutos. Shu e Huang (1995) estudando uma mistura de oito azo corantes, Liakou e Liberatos (1998) estudando a degradação do corante azo laranja 2 e Wu e col (1995), estudando processos alternativos para tratamento de efluentes de uma indústria de corantes reativos, observaram uma rápida cinética de descoloração das matrizes em questão.

1.4 – A utilização de fungos no tratamento de efluentes:

Os estudos envolvendo a biodegradação de efluentes tóxicos e recalcitrantes tem aumentado significativamente nos últimos anos. Uma principal atenção vem sendo dispensada à classe de fungos denominadas basidiomicetos, considerados como a mais evoluída classe de fungos. Estes fungos apresentam aplicações na indústria alimentícia, na produção de enzimas, na biopolpação, no tratamento de efluentes, etc. Eles são classificados de acordo com o tipo de degradação que provocam na madeira (Esposito, 1992):

Fungos de decomposição macia (“soft rot fungi”): Degradam a lignina a uma velocidade menor do que os polissacarídeos, produzindo um amolecimento característico na superfície da madeira.

Fungos de decomposição marrom (“brown rot fungi”): Degradam a porção polisacarídica da madeira, causando limitadas modificações na lignina, sem alteração do anel aromático.

Fungos de decomposição branca (“white rot fungi”): Atacam indistintamente os três componentes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) com velocidades similares.

Dentre os fungos basidiomicetos de decomposição branca, *Phanaerochaete chrysosporium*, isolado no início da década de 70, tem demonstrado resultados muito promissores na biodegradação de compostos e efluentes recalcitrantes (Haimann, 1995; Reddy, 1995; Zhang e col, 1998 e Swamy e col., 1999).

O interesse por este fungo se deve principalmente à expressão de algumas enzimas extracelulares (principalmente lignina peroxidase e manganês peroxidase) capazes de degradar uma gama de compostos xenobióticos e recalcitrantes (Barr e Aust, 1994).

1.4.1 - Peroxidases:

Esta família de enzimas é assim chamada porque dependem do peróxido de hidrogênio para que se tornem ativas. A FIGURA 9 representa o ciclo catalítico de uma peroxidase. Em um ciclo normal, a forma férrica da enzima é oxidada por peróxido de hidrogênio ao radical oxi-ferril, conhecido como composto I. Este composto é então reduzido pela transferência de um elétron do substrato (ex: lignina) para a forma conhecida como composto II. Uma subsequente transferência de elétron de outra molécula do substrato para enzima faz com esta retorne a sua forma inicial. O composto III refere-se a forma inativa da enzima.

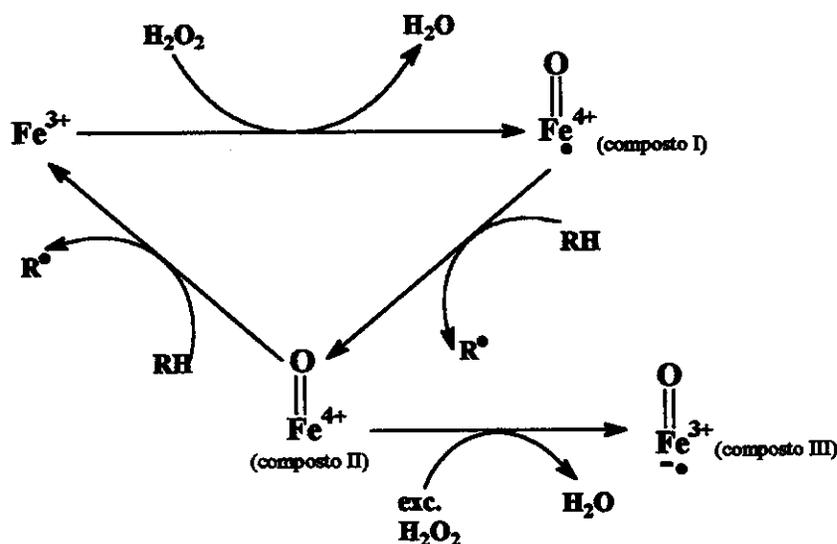


FIGURA 9: Ciclo catalítico da peroxidase (Deurzen e col., 1997 e Timofeevski e col., 1998)

1.4.1.1 - Lignina peroxidase (LIP)

A lignina peroxidase (FIGURA 10), uma enzima extracelular, foi isolada pela primeira vez em 1983. Esta enzima é uma hemoproteína de massa molecular entre 38 e 43 KDa, com ponto isoelétrico entre 3,2 e 4,7, possui um potencial de oxidação superior as peroxidases típicas, como por exemplo a peroxidase de rabanete (HRP) (Tien e Kirk, 1984; Durán e Esposito, 1997). A lignina peroxidase, devido a sua baixa especificidade, possui a capacidade de oxidar uma variedade de compostos xenobióticos, dentre eles compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos (Ander e Marzullo, 1997).

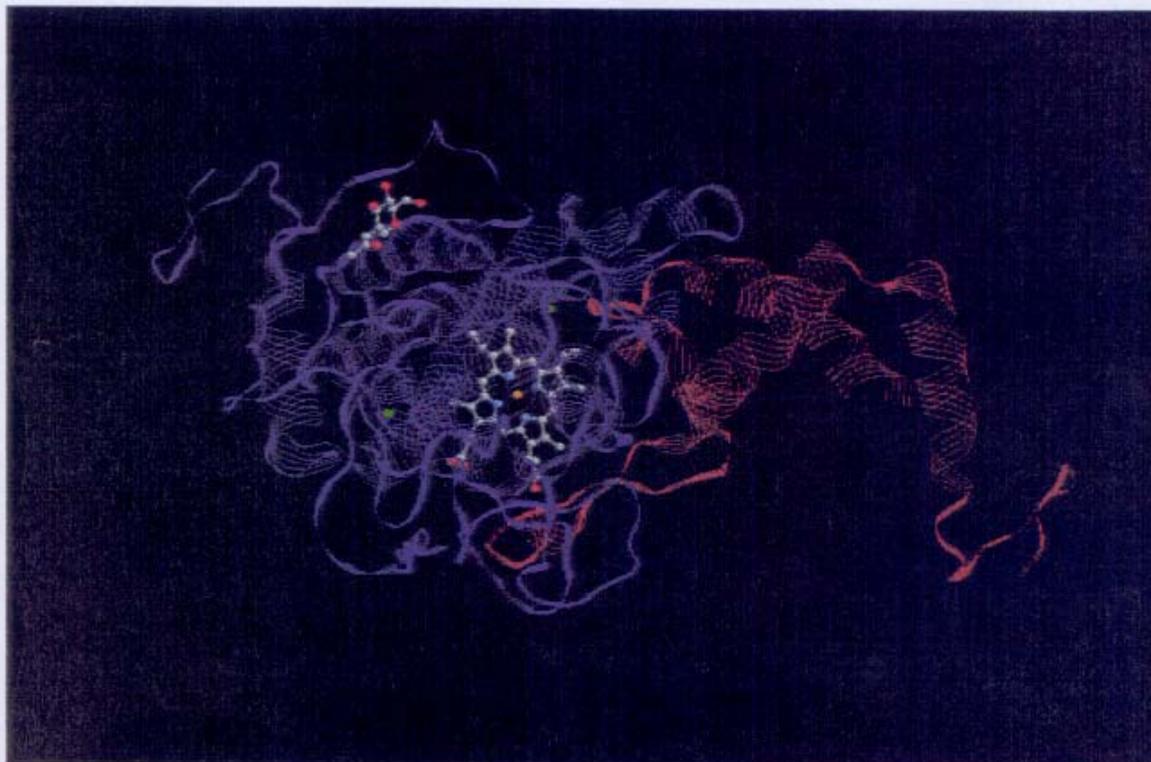


FIGURA 10: Visão estérica da lignina peroxidase, mostrando o grupo ferro protoporfirina (heme) ao centro.

1.4.1.2 Manganês Peroxidase (MnP)

A manganês peroxidase (FIGURA 11), também uma peroxidase extracelular foi identificada pela primeira vez em culturas de *P. chrysosporium* no ano de 1984. Possui massa molecular entre 45 e 47 KDa e ponto isoelétrico entre 4,2 e 4,9. Esta enzima é dependente do íon Mn^{2+} , responsável pela transferência de elétron para enzima durante seu ciclo catalítico normal (Barr e Aust, 1994).

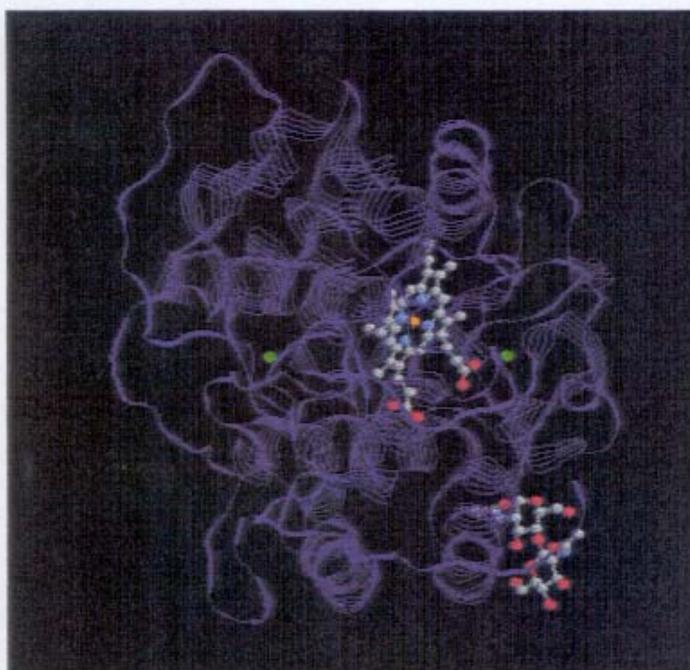


FIGURA 11: Visão estérica da manganês peroxidase, com o grupo heme ao centro.

Trabalhos especificamente relacionados com a degradação fúngica de efluentes têxteis são pouco frequentes na literatura recente. No entanto, vários estudos que demonstram a descoloração e mineralização de corantes isolados, especialmente utilizando-se o fungo de decomposição branca *P. chrysosporium* tem sido reportados. Spadaro *e col* (1992) demonstraram a capacidade de mineralização pelo fungo de uma

variedade de azo corantes, sendo que a capacidade de degradação deste dependeu da natureza dos grupos substituintes dos anéis aromáticos dos corantes. Kirby *e col* (1995), também estudando uma mistura de corantes sintéticos, observaram uma lenta cinética para redução de cor do substrato, sendo necessário um tempo de sete dias para sua redução completa.

Ollikka *e col* (1993) estudou a descoloração de corantes azo, trifenilmetano, heterocíclico e polimérico por isoenzimas da lignina peroxidase (LiP) do *P. chrysosporium*. Dez diferentes tipos de corantes foram testados pela enzima bruta com a redução na cor variando entre 50 e aproximadamente 75 %. A habilidade das isoenzimas para descolorir os corantes na presença de álcool veratrílico, um metabólito secundário encontrado em culturas lignolíticas que pode aumentar a atividade de ligninina peroxidase *in vitro*, também foi estudada sugerindo que a lignina peroxidase possui um papel importante na descoloração dos corantes apresentados acima. Segundo Paszczyński e Crawford (1991), vários azo corantes poliaromáticos podem ser decoloridos pelo *P. chrysosporium* em culturas lignolíticas, com as taxas de degradação individuais dependendo de suas estruturas, sendo sua degradação aumentada com álcool veratrílico. Banat *e col* (1996) também reportaram uma eficiente capacidade de descoloração de corantes pelo fungo *Phanaerochaete chrysosporium*, principalmente quando álcool veratrílico se encontrou presente no meio. Zhang *e col.* (1998) utilizando um bioreator de leiteo fluidizado observaram uma alta eficiência de descoloração para o corante têxtil laranja II, com o bioreator mantendo-se eficiente após dois meses de trabalho contínuo.

1.5 - A Integração de Processos Químicos e Biológicos:

Atualmente, estão a disposição uma grande variedade de processos físicos, químicos e biológicos, passíveis de utilização em rotinas de tratamento de águas e efluentes. Por serem de natureza diversa, cada um destes processos apresenta um conjunto particular de vantagens e desvantagens, principalmente associado a importantes parâmetros práticos como por exemplo eficiência, versatilidade e custo.

Os processos físicos, principalmente representados por operações envolvendo precipitação, adsorção, “air stripping” e filtração por membranas, podem ser bastante eficientes em relação à remoção dos contaminantes de interesse. Estes processos no entanto não envolvem a destruição dos substratos em questão, apenas uma transferência de fase.

A oxidação química apresenta-se geralmente muito eficiente, contudo, o custo dos reagentes ou o dimensionamento de reatores torna muitas vezes o processo desinteressante sob o ponto de vista econômico.

Os processos biológicos são limitados pela presença de compostos recalcitrantes a biodegradação, inibitórios ou tóxicos aos microrganismos e pela lenta cinética de degradação (Scott e Ollis, 1995).

Portanto, o tratamento de um dado efluente, levando-se em conta as limitações mencionadas acima, pode requerer a combinação de processos para obter-se resultados satisfatórios a um custo também não muito elevado. A combinação de processos químicos e biológicos é especialmente atrativa pois o primeiro pode ser usado na degradação de compostos recalcitrantes ao segundo, aumentando a biodegradabilidade do efluente, o que é muito útil haja visto que os processos biológicos normalmente apresentam um custo mais baixo que os processos químicos (Esplugas *e col.*, 1996).

A combinação de processos químicos e biológicos para o tratamento de efluentes têxteis é de especial interesse, pois os corantes presentes neste efluente geralmente são recalcitrantes ao tratamento biológico convencional.

Dentre os processos combinados utilizados para o tratamento de efluentes têxteis os que têm sido mais utilizados são aqueles envolvendo a adição de um floculante com um posterior tratamento biológico (Vandevivere *e col.* 1998). Altinkas *e col.* (1995) observaram uma eficiência de remoção de 94 % na DQO, utilizando-se uma coagulação do efluente com alumina seguido de um tratamento com lodo ativado. No entanto, esta alta eficiência de remoção muitas vezes torna-se desinteressante, pois implica na geração de grandes volumes de lodo de difícil disposição.

O pré-tratamento com ozônio apresenta-se como uma alternativa mais viável que o tratamento físico-químico, pois não apresenta o problema de acúmulo de lodo, apresentando-se igualmente eficiente especialmente na redução de cor do efluente têxtil (Churchley, 1994 e Tzitzis *et al*, 1994).

A existência de poucos trabalhos combinando ozonização com tratamento biológico (Roy-Arcand *et al*, 1996) e praticamente a inexistência de processos envolvendo fungos torna este trabalho altamente interessante e com perspectivas muito promissoras para o próximo século. Haja visto que as duas tecnologias não envolvem a geração de grandes quantidades de biomassa sendo portanto tecnologias limpas não envolvendo a produção de altas quantidades de resíduos, de difícil disposição e muitas vezes ainda com um potencial altamente tóxicos oferecendo um grande perigo ao meio ambiente.

2 - OBJETIVOS DO TRABALHO

O presente trabalho de doutorado apresentou como objetivos principais:

- Otimização das condições experimentais para remediação do efluente têxtil de cada um dos processos (químico e biológico) isoladamente.

- Sequenciamento dos processos:

- químico X biológico
- biológico X químico.

- Avaliação da eficiência dos processos, isolados e combinados, principalmente através de:

- Carbono orgânico total (COT).
- Descoloração.
- Toxicidade.
- Fenóis totais.
- Análise de intermediários (principalmente CPG).
- Consumo de ozônio.
- Atividade enzimática (principalmente LiP).

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Coleta do efluente têxtil:

O efluente têxtil utilizado para os estudos preliminares foi coletado junto a uma empresa têxtil situada no município de Americana - SP. Foram coletadas amostras do efluente bruto e tratado. A amostra correspondente ao efluente bruto foi compostada pela coleta diária de amostras durante uma semana, enquanto que a amostra do efluente tratado foi coletada pontualmente (sem compostagem) na saída da estação de tratamento de efluentes. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a aproximadamente 4 °C.

3.2 – Amostras de corantes utilizados:

Os corantes utilizados para este estudo foram obtidos junto a uma empresa têxtil situada na região de Campinas, não sendo realizado nenhum tratamento prévio de purificação.

3.3 – Estudos preliminares no tratamento de efluente têxtil com o *P. chrysosporium*:

3.3.1 - Cultivo do fungo em meio sólido:

Prepararam-se três meios de cultura distintos, conforme mencionado na TABELA 2. Os meios de cultura foram autoclavados a 1 atm por 15 minutos e transferidos para placas de petri (em triplicata). O fungo liofilizado (ATCC 24725), inicialmente reidratado, foi repicado nestes meios (em triplicata) e incubado em estufa a 37 °C por 5 dias.

TABELA 2: Meios de cultura utilizados para cultivo do fungo em meio sólido.

meio	composição
mc a	extrato de malte (1,5 %) e agar (2%)
mc b	efluente bruto ajustado a pH 5 e agar (2%)
mc c	efluente tratado ajustado a pH 5 e agar (2%)

3.3.2 - Cultivo do fungo em meio líquido:

3.3.2.1 - *Preparação da suspensão de esporos:*

Preparou-se 250 mL de meio de cultura contendo extrato de malte (1,5 %) e agar (2,0 %). O fungo liofilizado (ATCC 24725) foi reidratado e repicado em placas de Petri, incubado em estufa a 37 °C por 5 dias.

Após o quinto dia, as placas de Petri contendo o meio citado acima foram lavadas com água esterilizada e a suspensão resultante foi filtrada em funil contendo lã de vidro previamente esterilizada. Retirou-se 1 mL da suspensão filtrada e completou-se a 5 mL, medindo-se sua absorvância a 650 nm para determinação de sua concentração conforme descrito pela relação abaixo (Linko, 1986):

$$n^{\circ} \text{esporos} / \text{mL} = \frac{\text{abs} \times 5 \times 10^6}{0,1843}$$

3.3.2.2 - *Inoculação da suspensão de esporos no efluente:*

A suspensão de esporos obtida conforme descrito acima foi inoculada a aliquotas de 75 mL de efluente bruto e tratado, sendo todas ajustadas a pH 5,0. A suspensão de esporos foi adicionada à concentração final de $2,2 \times 10^5$ esporos mL⁻¹, conforme procedimento adaptado de Linko e Zhong (1987). Todas as amostras foram previamente esterilizadas e inoculadas em duplicata com amostras controle (amostras originais sem inoculação de esporos) para o efluente bruto e tratado. As

amostras foram mantidas sob agitação a 120 rpm, a 37 °C, por 5 dias e posteriormente submetidas a determinação de açúcares redutores e cor.

3.4 - Experimentos realizados no Laboratório de Recursos Naturais Renovables – LRR (Universidade de Concepcion - Chile)

3.4.1 - Ozonização das soluções de corantes:

3.4.1.1 - *Produção e medida de ozônio:*

O ozônio foi gerado a partir de oxigênio puro, utilizando-se um ozonizador marca OZOCAV ZT-2 (Inter Ozone Ingenieria Ecologica, Santiago-Chile). O ozônio produzido foi determinado espectrofotometricamente fazendo-se passar a corrente gasosa que contém a mescla de oxigênio e ozônio por uma célula de fluxo a 258 nm ($\epsilon = 3000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Chiou *e col.*, 1995).

3.4.1.2 - *Ozonização:*

As soluções de corantes foram submetidas a ozonização em pH 7 e 11, temperatura ambiente, num reator tubular de 500 mL com dispersor de vidro sinterizado liberando o gás da base do reator. O volume de amostra ozonizado foi de 400 mL, a vazão de entrada do gás foi ajustada a $15 (\pm 1) \text{ L de O}_2 \text{ h}^{-1}$, obtendo-se concentração de O_3 no gás de $13 (\pm 1) \text{ mg L}^{-1}$, observando-se um tempo de 10 minutos antes do início da ozonização para que o equipamento atingisse o estado estacionário (Kunz *e col.*, 1999). Os intermediários de reação formados foram submetidos a análises por CLAE, toxicidade (microtox[®]), DQO, cor e COT.

3.4.2 - Testes de toxicidade dos intermediários formados:

A toxicidade aguda do efluente antes e após a ozonização foi avaliada utilizando-se bactérias bioluminescentes, método este conhecido como microtox[®]. Este bioensaio utiliza como organismo teste a bactéria marinha *Vibrio fisheri*. Essas bactérias emitem luz como mecanismo de liberação de energia durante seu

metabolismo normal. A intensidade de luz emitida é, portanto, uma medida da atividade metabólica destas bactérias. Quando estas bactérias são expostas a uma amostra tóxica a atividade enzimática da enzima luciferina (responsável pela luminescência) é inibida (Ronco, 1992). Os resultados são expressos em termos de EC50, que significa a concentração que causa uma redução de luz de 50 % na emissão de luz. Depende do tempo de exposição, da temperatura e logicamente da natureza química dos contaminantes presentes na amostra.

Os valores de EC50 foram obtidos utilizando-se regressão linear mediante incubação da solução de bactérias a temperatura de 15 °C e tempo de 15 minutos. Uma solução de fenol foi utilizada como padrão positivo para o controle de toxicidade.

3.4.3 – Métodos analíticos utilizados nos experimentos realizados no LRR:

3.4.3.1 - *Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO):*

As determinações de DQO foram realizadas segundo o método da digestão em meio ácido e sob aquecimento com uma concentração conhecida de dicromato de potássio e posterior titulação do dicromato remanescente com sulfato ferroso amoniacal utilizando-se ortofenantrolina como indicador (APHA, 1989).

3.4.3.2 - *Análises por CLAE:*

As análises de CLAE foram realizadas num cromatógrafo Shimadzu modelo D - 6000. A fase móvel foi composta de Metanol:H₂O (50:50) contendo 1 mol L⁻¹ de ácido acético, todos os reagentes utilizados foram grau CLAE, todas amostras submetidas a análise tiveram seu pH pré ajustado a 7. Utilizou-se uma coluna Lichrospher 100 RP-18 (5 µm), com temperatura mantida a 40 °C durante a eluição a 0,8 mL min⁻¹. O volume injetado foi de 20 µL e a detecção realizada a 254 nm (Shu e Huang, 1995).

3.4.3.3 - *Determinação de sulfato (SO_4^{2-}):*

O sulfato foi determinado utilizando-se o método turbidimétrico que se baseia na precipitação de $BaSO_4$ e na medida da turbidez resultante a 450 nm e posterior comparação com uma curva de calibração de sulfato (Hatch, 1991).

Um pré-tratamento na amostra inicial fez-se necessário (extração líquido-líquido) para retirar o corante da matriz, haja visto que este estava adsorvendo-se no precipitado de $BaSO_4$ formado, fazendo que a amostra apresentasse uma absorção menor que o branco. Vários solventes foram testados tendo o acetato de etila se mostrado mais eficaz para o sistema em questão.

3.4.3.4 - *Determinação de cobre total por espectrometria de absorção atômica (EAA):*

A determinação de cobre foi realizada utilizando-se um espectrômetro GBC 908 AA em chama ar-acetileno utilizando-se uma lâmpada de cobre de cátodo oco para detecção. Todas amostras foram analisadas em triplicata.

3.5 – Tratamento do efluente têxtil com o fungo *P. chrysosporim*:

3.5.1- Preparação da suspensão de esporos:

De acordo com o procedimento descrito no item 3.3.2.1

3.5.2 - Inoculação da suspensão de esporos no efluente:

A suspensão de esporos obtida conforme descrito no item 3.3.2.1 foi inoculada em Erlenmeyers contendo 75 mL de efluente (com pH previamente ajustado a 4,5) e 1,7 g de nylon (marca 3M), como suporte, cortado em pedaços de 0,5 x 1,0 x 1,0 cm. A suspensão de esporos inoculado foi a correspondente a $2,2 \times 10^5$ esporos mL^{-1} . Os Erlenmeyers foram posteriormente incubados sob agitação (150 rpm), a 37 °C, em duplicata, mais uma amostra controle nas mesmas condições, mas sem a adição do fungo.

Após redução e estabilização dos açúcares redutores, álcool veratrílico (para ativar a enzima LiP) e Tween-80 (detergente usado para facilitar a difusão da enzima do miscélio para a solução) foram adicionados para obter-se uma concentração final de $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ e 0,13 % respectivamente, com a agitação reduzida a 60 rpm.

Pulsos diários de oxigênio (vazão entre 10 e 15 L h^{-1}) de 2 minutos foram dados às amostras contendo o efluente e o fungo inoculado, nos dias seguintes a ativação com álcool veratrílico.

A amostra controle constituiu-se de efluente a pH 4,5 e suporte sem inoculação da suspensão de esporos. Em alguns Erlenmeyers, onde a suspensão de esporos foi inoculada, não foi adicionado álcool veratrílico para verificar a influência na atividade enzimática.

3.5.3 - Meio sintético para crescimento do fungo:

Este meio sintético para crescimento do fungo *P. chrysosporium*, limitado em nitrogênio, foi preparado conforme descrito por Linko e Zhong (1987) com algumas modificações.

Para a preparação de 1000 mL de meio sintético final adicionou-se

- 500 mL da solução tampão tartarato ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$).
- 20 mL de solução de glicose 10 %.
- 1 mL de solução de vitaminas (não deve ser esterilizada em autoclave!!!)
- completou-se a 1 Litro com água destilada.

3.5.3.1 - *Preparação da solução de elementos traço:*

A solução de elementos traços foi preparada contendo os elementos mencionados na tabela abaixo.

TABELA 3: Composição da solução de elementos traço empregada na formulação do meio de cultura sintético:

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g L ⁻¹)
sulfato de manganês monohidratado	1,00
sulfato de zinco heptahidratado	3,00
sulfato de cobre pentahidratado	0,01
cloreto de cálcio hexahidratado	1,00
sulfato de alumínio e potássio dodecahidratado	0,01
ácido bórico	0,01
molibdato de sódio	0,01
nitriloacetato de sódio	1,50

3.5.3.2 - Preparação da solução de vitaminas:

Para preparar-se 100 mL desta solução, dissolveu-se a biotina em água a 60 – 70 °C (~15 mL) e adicionou-se 3 a 4 gotas de NaOH 5 mol L⁻¹. Dissolveram-se os demais reagentes (TABELA 4) com água destilada. Esterilizou-se a solução de vitaminas por filtração (0,22 µm), completou-se o volume a 100 mL e estocou-se a 4 °C. Para utilizar-se esta solução na composição do meio, diluiu-se esta solução 10 vezes, utilizando-se desta solução diluída 1 mL para 1000 mL de meio de cultura sintético.

TABELA 4: Composição da solução de vitaminas empregada na formulação do meio de cultura sintético:

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (mg L ⁻¹)
biotina	40
ácido fólico	40
riboflavina	100
ácido p-aminobenzóico	100
ácido tióctico	100
cianocobalamina	2
piridoxina	200
ácido nicotínico	100
dicloreto de tiamina	1000
DL pantotenato de cálcio	100

3.5.3.3 - Preparação do tampão

Dissolveu-se os reagentes apresentados na TABELA 5 com aproximadamente 800 mL de água destilada e adicionou-se a esta solução 21,8 mL de H₃PO₄ (1 mol L⁻¹) e 2 mL da solução de elementos traços (TABELA 3). Ajustou-se o pH desta solução a 4,5 com NaOH (5 mol L⁻¹), o volume foi completado a 1000 mL com água destilada.

Para esterilização, dividiu-se o volume em 2 Erlenmeyers de 1000 mL. Também esteriliza-se 500 mL de água destilada e aproximadamente 50 mL de glicose 10 %, este material foi esterilizado em autoclave a 1 atm e 121 °C por aproximadamente 15 minutos.

TABELA 5: Composição do tampão tartarato ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) empregado na formulação do meio de cultura sintético.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g L^{-1})
ácido (L+) tartárico	6,00
sulfato de magnésio heptahidratado	1,00
cloreto de cálcio hexahidratado	0,20
sulfato de ferro heptahidratado	0,04
tartarato de amônio	1,32

3.5.4 - Ensaio de adsorção do efluente no miscélio do fungo:

Ao miscélio do fungo, crescido no meio de cultura conforme descrito no item 3.5.3, foram adicionados 75 mL de efluente têxtil bruto compostado em duplicata. A outro erlenmeyer foram adicionados apenas 75 mL de efluente. As amostras foram esterilizadas em autoclave e submetidas à agitação por 5 dias. Posteriormente determinou-se a absorvância de ambos efluentes em 400, 500, 550 e 600 nm.

3.6 - Tratamento com ozônio:

3.6.1- Geração e medida de ozônio:

Conforme descrito no ítem 3.4.1.1.

3.6.2 - Ozonização:

Os efluentes submetidos a ozonização tiveram seu pH previamente ajustado ao valor desejado, sendo ozonizados a temperatura ambiente, num reator tubular de 500 mL com dispensor de vidro sinterizado liberando o gás da base para o topo do reator. O volume das amostras ozonizadas foi de 400 mL, a vazão de

entrada do gás foi ajustada a 10 (± 1) e 15 (± 1) L de O_2 h^{-1} obtendo-se concentrações de O_3 no gás de 11 (± 1) e 10 (± 1) $mg \cdot L^{-1}$ respectivamente, observando-se um tempo de 10 minutos para que o equipamento atingisse o estado estacionário. A FIGURA 12 apresenta um diagrama esquemático completo do equipamento utilizado nos experimentos com ozônio.

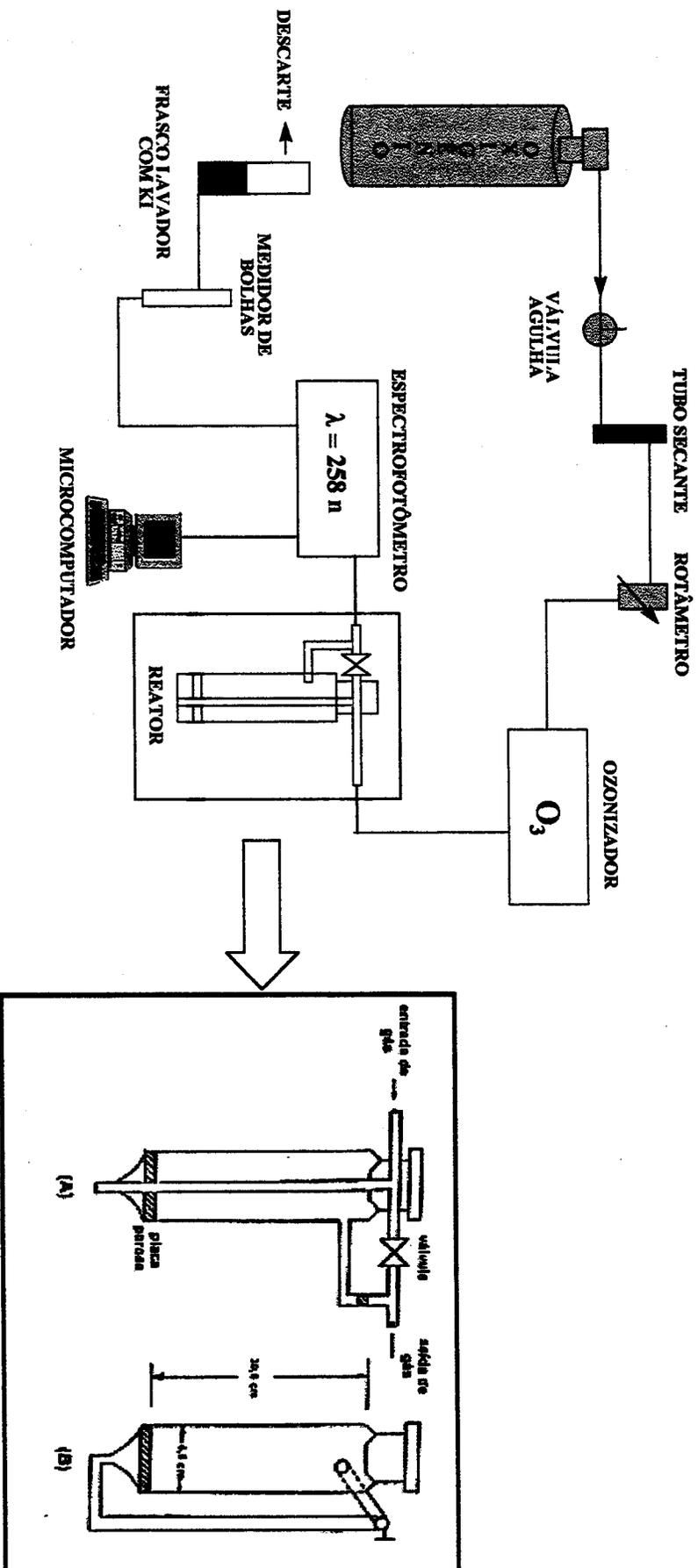


FIGURA 12 : Diagrama esquemático do sistema de ozonização, com vista frontal (A) e lateral (B) do reator.

3.7 - Métodos analíticos utilizados nos itens 3.3; 3.5 e 3.6:

3.7.1 - Determinação de açúcares redutores (método do DNS (Miller, 1959)):

Para a determinação de açúcares redutores foram adicionados a 1,5 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), 0,75 mL de amostra (previamente centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos). A mistura foi incubada num banho térmico a 100 °C por 5 minutos. Após este período a amostra foi resfriada a temperatura ambiente e a absorvância medida a 540 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão de glicose.

O reagente DNS foi preparado dissolvendo-se em 1,4 L de água os seguintes reagentes:

Ácido 3,5-dinitrosalicílico	10,6 g
Hidróxido de Sódio	19,8 g
Tartarato de Sódio e Potássio	300,0 g
Fenol	7,5 mL
Bissulfito de Sódio	8,3 g

3.7.2 - Determinação da atividade da enzima lignina peroxidase:

A atividade da enzima foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico, segundo metodologia modificada de Tien e Kirk (1984). Foram adicionados 250 µL de caldo de cultivo filtrado, 450 µL de água destilada, 375 µL de tampão tartarato de sódio 0,33 mol L⁻¹ (pH 3), 125 µL de uma solução de álcool veratrílico 4,0 mmol L⁻¹ e a 50 µL de H₂O₂ 10 mmol L⁻¹. O aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado medindo-se a absorvância a 310 nm ($\epsilon = 9300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de lignina peroxidase corresponde a quantidade de enzima que oxida 1,0 µmol de álcool veratrílico por minuto por mL.

3.7.3 - Determinação da atividade da enzima manganês peroxidase:

A atividade de manganês peroxidase foi determinada segundo metodologia modificada de Kuwahara *e col* (1984). A 500 μL de meio filtrado foram adicionados 100 μL de uma solução estoque (0,1 %) de vermelho de fenol, 100 μL de lactato de sódio (250 mmol L^{-1}), 200 μL de albumina bovina (0,5 %), 50 μL de sulfato de manganês (2 mmol L^{-1}) e 50 μL de H_2O_2 (2 mmol L^{-1}) em tampão succinato (20 mmol L^{-1}) a pH 4,5. A solução resultante foi incubada por 5 minutos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e a reação interrompida pela adição de 40 μL de NaOH (2 mol L^{-1}). A absorvância medida a 610 nm. Uma unidade de manganês peroxidase é definida como a quantidade de enzima que oxida 1,0 μmol de vermelho de fenol por mililitro por minuto, utilizando-se um coeficiente de extinção molar de $4460 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Michel *e col.* 1991).

3.7.4 - Determinação de fenóis totais:

A determinação de fenóis totais foi realizada segundo o método padrão APHA (1992). O método baseia-se na reação entre o reagente Folin-Ciocalteu, uma mistura dos heteropoliácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico e fenóis, com subsequente oxidação dos fenóis e formação de um complexo azul com molibdênio e tungstênio.

A 1 mL de amostra adicionou-se 250 μL da solução carbonato-tartarato (200 g de carbonato de sódio, 12 g de tartarato de sódio dihidratado, diluído a 1000 mL), 25 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (marca Sigma). A solução permaneceu em repouso por 30 minutos a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, e posteriormente a absorvância lida a 700 nm. As absorvâncias foram comparadas a uma curva padrão de fenol.

3.7.5 - Determinação de metais totais por espectrometria de absorção atômica (EAA):

Amostras contendo 100 mL de amostra foram previamente digeridas com 10 mL de HNO₃ concentrado (marca Nuclear) em duplicata. Todas as determinações foram realizadas em duplicata, utilizando-se um ensaio em branco.

As amostras brutas constituíram-se do efluente "in natura", as amostras centrifugadas constituíram-se de efluente centrifugado (a pH 11) por 5 minutos a 3500 rpm. Após digestão o volume das amostras foi completado a 25 mL (concentradas 4 vezes em relação a inicial). Posteriormente foram submetidas as determinações de metais totais conforme condições descritas abaixo:

TABELA 6: Condições experimentais utilizadas para determinações de metais totais por espectrometria de absorção atômica.

	Cu	Cr	Fe	Mn
λ lâmpada(nm)	324,8	357,9	248,3	279,5
fenda (nm)	0,7	0,7	0,2	0,2
Vazão (mL min ⁻¹) ar/acet.	20/20	25/25	20/20	1,8/9,0
t leitura (min)	1	1	1	1
I	12	22	55	20
lâmpada(mA)				

3.7.6 - Determinação de proteína solúvel:

Proteína solúvel foi determinada pelo método de Bradford (1976) submetido a algumas modificações. O método baseia-se na formação de um complexo solúvel entre as proteínas da solução e o corante Comassie Brilliant Blue G-250 (CBB) (C.I. 42660) (Diezel *e col.*, 1972).

Adicionou-se 200 μL da solução a determinar a 4 mL de reagente CBB diluído, aguardando-se um intervalo de 2 minutos e efetuou-se a leitura a 595 nm, os valores de absorvância foram comparados a uma curva padrão de albumina bovina.

O reagente CBB 0,01% foi preparado por adição de 100 mg de CBB em 50 mL de etanol 95 %. A esta solução foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85 % (p/v), completando o volume a 1000 mL com água destilada. Para o micrométodo esta solução foi diluída 10 vezes.

3.7.7 - Determinação de cor:

A determinação de cor nas amostras de efluente foi realizada conforme método padrão descrito por Livernoche *e col.* (1983), submetido a algumas modificações. O efluente foi previamente ajustado a pH 11, centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos e posteriormente ajustado a pH 7,6 com tampão fosfato (1 mol L^{-1}). Os comprimentos de onda fixados foram determinados pelas absorções máximas das misturas dos corantes utilizados pela indústria têxtil na região do visível.

3.7.8 - Determinação de cloretos:

As amostras foram previamente centrifugadas e ajustadas a pH 7. A determinação de íons cloreto foi realizada potenciométricamente, utilizando-se um potenciômetro marca Orion, modelo EA 940, mediante determinação de seu potencial frente a um eletrodo combinado para íons cloreto marca Orion, modelo 96-17B. O potencial determinado foi comparado a uma curva padrão de cloreto de potássio.

3.7.9 – Distribuição da massa molecular do efluente têxtil:

O estudo de distribuição da massa molecular do efluente foi realizado através de cromatografia de permeação em gel (CPG). Um volume de 3 mL de efluente têxtil previamente centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos foram aplicados

a uma coluna de 60 x 1,5 cm contendo Sephadex G-50. A coluna foi previamente estabilizada com NaOH-LiCl (0,1 mol L⁻¹), que também serviu de fase móvel para o sistema. A vazão foi ajustada a 0,66 mL min⁻¹. As frações foram coletadas utilizando-se um coletor de frações LKB Bromma modelo Ultrorac II sendo posteriormente determinadas espectrofotometricamente a 280 nm (Ferrer *e col*, 1991 e Santiago *e col*, 1997). O volume vazio (V₀) da coluna foi determinado pela eluição de azul dextrano (2.000.000 Da).

3.7.10 - Determinação de carbono orgânico total:

As determinações de carbono orgânico total foram realizadas através do método da oxidação catalisada a alta temperatura, empregando-se um analisador de carbono total, marca Shimadzu, modelo TOC 5000A. Através deste método a amostra é homogeneizada, e uma microporção é injetada numa câmara de reação aquecida, contendo platina adsorvida sobre óxido de alumínio. A água é vaporizada e o carbono da amostra é oxidado a CO₂, sendo quantificado por meio de um analisador de infravermelho não dispersivo. O carbono inorgânico é medido injetando-se a amostra numa câmara de reação que contém ácido fosfórico, sob estas condições o carbono inorgânico é convertido a CO₂ e quantificado de maneira semelhante a descrita acima. O carbono orgânico total é então obtido por diferença (Fadini, 1995).

3.8 – Estudos de transferência de massa no reator de ozônio:

Estes experimentos foram realizados utilizando-se 400 mL de água deionizada, ajustada a pH 2 com ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹ e temperatura de 26 °C. A vazão do sistema durante a ozonização foi de 14,89 (±0,05) L h⁻¹ sendo a produção de ozônio de 0,14 g h⁻¹. A concentração de ozônio dissolvido no reator foi determinada em intervalos previamente selecionados durante a ozonização desta solução utilizando-se o método colorimétrico de índigo (APHA, 1988). Foram coletadas 2 mL de amostra durante intervalos sucessivos de ozonização em tubos de ensaio contendo 3 mL do reagente índigo II (vide item 3.8.1). A concentração de ozônio dissolvido foi determinada pela seguinte relação:

$$\text{mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1} = \frac{100 \times \Delta A}{f \times b \times V}$$

Onde: ΔA = diferença entre a absorvância do branco e da amostra a 600 nm.

$f = 0,42$ (coeficiente de absorção para ozônio aquoso a 600 nm)

b = caminho ótico na cubeta em cm

V = volume da amostra em mL

A concentração de saturação de ozônio no líquido foi determinada após 30 minutos de ozonização (para garantir que a fase líquida estivesse saturada com o gás).

3.8.1 – Preparação da solução do reagente índigo:

3.8.1.1 - *Solução mãe:*

A solução mãe foi preparada adicionando-se a aproximadamente 500 mL de água destilada 1 mL de H₃PO₄ concentrado, 170 mg do reagente índigo trissulfonato de potássio (FIGURA 13) completando-se o volume a 1 L.

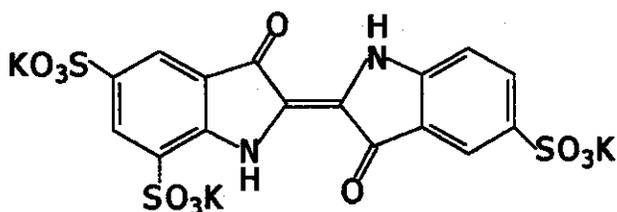


FIGURA 13: Estrutura química do reagente índigo trissulfonato de potássio.

3.8.1.2 Solução Índigo I:

A solução índigo I foi composta de 20 mL da solução mãe, 10 g de fosfato diácido de sódio, 7 mL de H_3PO_4 concentrado e o volume final completado a 1 L.

3.8.1.3 Solução Índigo II:

Esta solução foi composta de 100 mL da solução mãe, 10 g de fosfato diácido de sódio, 7 mL de H_3PO_4 concentrado e o volume final completado a 1 L.

Obs: As soluções *índigo I e II* tem validade de 1 semana sob abrigo da luz.

3.9 – Ensaio de toxicidade:

3.9.1 - Ensaio de toxicidade com a alga *S. subspicatus*: (ISO 8692)

3.9.1.1 - *Cultura da alga*:

Como organismo indicador foi utilizada a alga verde de água doce, *Scenedesmus subspicatus* (cepa número 8681 SAG) adquirida na coleção de culturas de algas do "Pflanzenphysiologisches Institut" localizado em Göttingen na Alemanha.

A cultura da alga, recebida em meio sólido (Agar 2% + meio A), foi transferida com auxílio de alça de platina, sob condições estéreis, para um Erlenmeyer de 125 mL contendo o meio A (TABELA 7). Esta pré-cultura foi deixada sob agitação a 100 rpm e 23 °C por 14 dias sob intensidade luminosa, entre

6000 e 8000 Lux. Após este período, retirou-se 1 mL da pré-cultura em condições estéreis e transferiu-se novamente para um Erlenmeyer de 125 ml contendo 30 mL do meio A para servir de inóculo para uma nova cultura. O período de crescimento foi de 2 a 4 dias sob as mesmas condições da pré-cultura e esta foi utilizada como inóculo para a realização do ensaio de toxicidade. A suspensão de algas foi diluída, quando necessário, para obter a concentração de alga desejada para o inóculo das amostras (absorvância de 0,160 a 680 nm).

3.9.1.2 Preparação do meio A:

A constituição da solução de nutrientes é mostrada na TABELA 7, as soluções estoques foram autoclavadas a 120 °C por 15 min e estocadas no escuro a 4 °C. A preparação da solução de nutrientes foi realizada através da adição de 100 mL da solução estoque 1, 10 mL da solução estoque 2, 10 mL da solução estoque 3 e 10 mL da solução estoque 4 e o volume final foi completado a 1000 mL.

TABELA 7: Constituição da solução de nutrientes utilizado para o cultivo da alga *S. supspicatus*.

nutriente	Concentração na solução estoque	Concentração final na solução teste
<i>Solução estoque 1: macro-nutrientes</i>		
NH ₄ Cl	1,50 g L ⁻¹	15,00 mg L ⁻¹
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,20 g L ⁻¹	12,00 mg L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,16 g L ⁻¹	1,60 mg L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,80 g L ⁻¹	18,00 mg L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,50 g L ⁻¹	15,00 mg L ⁻¹
<i>Solução estoque 2: Fe-EDTA</i>		
FeCl ₃ .6H ₂ O	80,00 mg L ⁻¹	80,00 µg L ⁻¹
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100,00 mg L ⁻¹	100,00 µg L ⁻¹
<i>Solução estoque 3: elementos traço</i>		
H ₃ BO ₃	185,00 mg L ⁻¹	185,00 µg L ⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O	415,00 mg L ⁻¹	415,00 µg L ⁻¹
ZnCl ₂	3,00 mg L ⁻¹	3,00 µg L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,50 mg L ⁻¹	1,50 µg L ⁻¹
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01 mg L ⁻¹	0,01 µg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7,00 mg L ⁻¹	7,00 µg L ⁻¹
<i>Solução estoque 4: NaHCO₃</i>		
NaHCO ₃	50,00 g L ⁻¹	50,00 mg L ⁻¹

3.9.1.3 Condições do ensaio:

As vidrarias necessárias para a realização deste ensaio foram previamente lavadas com HCl 10 % para a remoção total de traços de nutrientes.

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL aos quais foram adicionados, amostra em diferentes diluições, meio A e uma quantidade definida de alga (10⁶ cel mL⁻¹), que corresponde a uma absorvância de 0,160 a 680 nm (máximo de absorção da clorofila a). Os ensaios foram realizados em duplicata para cada diluição da amostra, sendo que o volume final em todos os erlenmeyers foi

de 30,0 mL, conforme o esquema apresentado na TABELA 8. Para cada diluição amostras controle também foram incubadas com a mesma constituição das amostras, no entanto sem adição da alga. Um controle para a comparação do crescimento da alga nas diluições demonstradas na TABELA 8 também foi incubado em triplicata sendo este constituído de 26 mL de água destilada, 3 ml de meio A e 1 mL de inóculo da alga. A prova positiva do teste foi realizada frente a ao íon Cu^{2+} (a partir de uma solução de CuCl), conforme descrito por Reginatto *et al.* (1998).

TABELA 8: Esquema para a realização do ensaio de toxicidade com a alga *S. subspicatus*.

Diluição (%)	Amostra problema (mL)	Água destilada para diluição (mL)	Meio de cultura (meio A) (mL)	Inóculo 10^6 células/mL (mL)	Volume final do teste (mL)
86,0	26,00	0	3,00	1,00	30,00
50,0	15,00	11,00	3,00	1,00	30,00
25,0	7,50	18,50	3,00	1,00	30,00
12,5	3,75	22,25	3,00	1,00	30,00

As concentrações iniciais de alga em cada Erlenmeyer foram determinadas logo após a preparação do inóculo. Os Erlenmeyers foram posteriormente incubados à temperatura de 23°C e sob agitação constante (100 rpm).

A fonte luminosa (luz tipo branca universal) necessária ao crescimento da alga encontrava-se a aproximadamente 50 cm acima dos banhos termostatizados (FIGURA 14). As intensidades luminosas (aproximadamente $70 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de cada lugar do banho termostatizado foram medidas com auxílio de um luxímetro na altura da lâmina d'água onde os erlenmeyers permaneceram pelo período de realização do teste. Após 72 horas foi realizada novamente uma medida da concentração da alga no controle e nas diferentes diluições da amostra.



FIGURA 14: Sistema utilizado no teste de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus*.

3.9.1.4 Medida da concentração da alga:

As medidas da concentração da alga em solução foram determinadas através da medida da fluorescência da **clorofila a** das culturas de alga tanto controle quanto nas amostras. O comprimento de onda de excitação foi a 465 nm e a emissão determinada em 685 nm utilizando-se um fluorímetro marca Aminco modelo SPF-500 CTM.

3.9.1.5 Expressão dos resultado do ensaio:

A taxa de crescimento diário das algas (μ) foi determinada conforme equação abaixo:

$$\mu/\text{dia} = \frac{[(\ln E_{72}) - (\ln E_0)] \times 24}{72}$$

onde:

μ/dia = taxa de crescimento diário da alga

E_0 = medida da concentração da alga no tempo zero

E_{72} = medida da concentração da alga após 72 horas

No caso de amostras tóxicas, a taxa de crescimento diário (μ /dia) da amostra deve ser menor que o μ diário do controle. A toxicidade das amostras foi representada em termos de porcentagem de inibição do crescimento das algas em relação ao controle, calculada conforme descrito a seguir.

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{(\mu_a + 100)}{\mu_c}$$

onde:

μ_a = taxa de crescimento diário da alga na amostra

μ_c = taxa de crescimento diário da alga no controle

3.9.2 – Ensaio de toxicidade com a bactéria *Escherichia coli*:

3.9.2.1 – *Cultura da bactéria*

Como organismo indicador foi utilizado a bactéria *E. coli* (ATCC 25922) adquirida junto a coleção de culturas da Fundação Tropical André Tosello, localizada em Campinas-SP. A cultura liofilizada da bactéria foi transferida, sob condições estéreis, para um tubo de ensaio contendo o meio de cultura (TABELA 9). Esta cultura foi mantida a 37 °C por 24 horas. Após este período repicou-se a bactéria em placas com meio sólido (ágar-sangue) mantendo-se a 37 °C por 48 horas. Posteriormente estas placas foram armazenadas em refrigerador (tempo de meia vida de 15 dias). Para a realização de cada experimento foi retirado do meio sólido, em condições estéreis, com a ajuda de uma alça de platina uma quantidade de bactéria suficiente para ser inoculada em tubo de ensaio contendo meio de cultura a 37 °C por 24 horas. Após este período o meio de cultura apresentou-se turvo e foi então utilizado como inóculo para o teste de toxicidade.

3.9.2.2 – *Preparação do meio de cultura:*

A constituição do meio de cultura está mencionada na tabela abaixo. Todos os reagentes (com exceção da glicose) foram diluídos a aproximadamente 800 mL com água deionizada e o pH ajustado a 7 com KOH (2 lentilhas). O meio de cultura foi então levado a ebulição por 10 minutos. Posteriormente o meio foi resfriado a 90 °C e adicionado a este 200 mL de uma solução de glicose 10 % (p v⁻¹), que também foi previamente levada a ebulição por 5 minutos separadamente.

TABELA 9: Composição do meio de cultura para o cultivo da bactéria *E. coli*:

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	7,0
KH ₂ PO ₄	3,0
citrato de sódio	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄	0,2
glicose	4,0

3.9.2.3 – *Monitoramento de CO₂ pelo sistema FIA condutométrico:* (Guimarães, 1990).

Primeiramente preparou-se 100 mL de uma solução estoque de Na₂CO₃ (previamente seco em estufa a 120 °C por 1 hora) a 100 mmol L⁻¹. Em seguida foram preparadas, a partir da solução estoque, 100 mL das seguintes soluções: 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 e 3,00 mmol L⁻¹. Aliquotas destas soluções foram injetadas no sistema FIA condutométrico (FIGURA 15) para obtenção de uma curva de calibração.

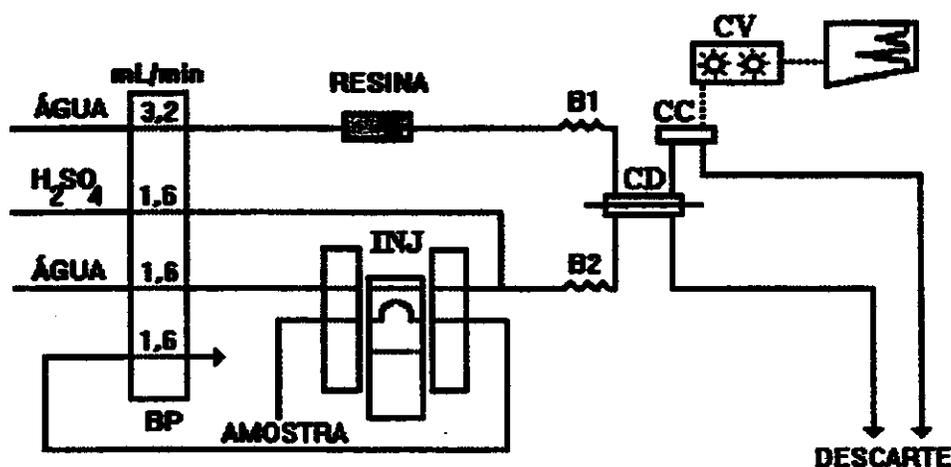


FIGURA 15: Esquema de funcionamento do sistema FIA-conducométrico. CD – célula de difusão; CC – célula de condutividade; CV – condutímetro; BP – bomba peristáltica.

Neste procedimento um volume determinado de amostra (135 μL) contendo as espécies carbônicas (CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-}) é injetado num fluxo carregador (água deionizada) o qual conflui com outro fluxo de ácido sulfúrico diluído (0,5 %). O meio ácido desloca o equilíbrio no sentido da formação do CO_2 conforme equação abaixo:



O CO_2 formado no meio ácido ao passar pela cela de difusão permeia por uma membrana de teflon[®] e atinge um fluxo de água deionizada, deslocando o equilíbrio para a formação dos íons bicarbonato e carbonato. A condutividade deste fluido é então alterada devido ao CO_2 presente na amostra. A mudança na condutância é proporcional à concentração total de CO_2 presente na amostra.

3.9.2.4 – Realização do ensaio:

Bactérias tem um ciclo de vida relativamente curto e respondem rapidamente à mudanças no ambiente. O CO₂ que participa ativamente do metabolismo microbiano, principalmente como produto de respiração e pode ser utilizado como parâmetro no monitoramento da atividade metabólica de microorganismos (Guimarães, 1990; Moraes, 1995).

O meio de cultura foi contaminado com *E. coli* (inóculo descrito no item 3.9.2.1) e a concentração de CO₂, produzido pela respiração microbiana, monitorada pelo sistema FIA condutométrico até atingir 0,5 mmol L⁻¹. O frasco foi mantido em banho termostaticado à 37 °C. A seguir o meio foi transferido para os erlenmeyers de 125 mL contendo as amostras, conforme mostrado na TABELA 10, e mantido a 37 °C. O pH das aliquotas teste foi previamente ajustado a 7.

TABELA 10: Esquema para realização do ensaio de toxicidade com a bactéria *E. coli*:

	Meio de Cult. (mL)	Amostra teste (mL)	Tetraciclina (µL)*
controle	50	-	-
Amostra teste	47	3	-
tetraciclina	50	-	25

* solução estoque a 0,5 mg mL⁻¹

A tetraciclina é utilizada como um padrão positivo do teste e deve apresentar uma inibição de aproximadamente 40 % na respiração da bactéria em relação ao controle (Durán e col, 1998).

A concentração de CO₂ nos diversos frascos foi obtida pela interpolação dos dados na curva de calibração. As determinações foram feitas em intervalos de 20 minutos finalizando-se o experimento após 2 horas (Moraes, 1995).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES:

4.1 - Cultivo do fungo em meio sólido:

Os ensaios envolvendo o cultivo do fungo *Phanerochaete chrysosporium* em meio sólido tiveram a finalidade, além da produção da suspensão de esporos, de verificar um possível efeito inibidor do efluente sobre o crescimento do fungo.

A TABELA 11 apresenta o crescimento da cultura do fungo nos diferentes meios. Observa-se que os meios contendo efluente apresentaram uma predominância de crescimento vegetativo, indicando que o meio de cultura é rico em nutrientes para o crescimento do fungo. Isto se deve ao fato da alta concentração de matéria orgânica na matriz (efluente bruto COT = 958 mg L⁻¹, efluente tratado COT = 408,75 mg L⁻¹) onde a grande parte desta é facilmente biodegradável constituindo-se de amido e seus subprodutos provenientes da etapa de desengomagem no processamento têxtil (Alcantara e Daltin, 1996)

TABELA 11: Crescimento da cultura de fungo *P. chrysosporium* em meio sólido, incubado a 37 °C durante 5 dias:

meio	crescimento	Observações
mc a	Muito Bom	Predominância da forma esporulada
mc b	Bom	Predominância da forma vegetativa
mc c	Regular	Predominância da forma vegetativa

Em nenhuma das amostras contendo efluente foi verificado a inibição do crescimento do fungo, indicando que a matriz não se apresenta tóxica a este. Outra observação importante foi o fato de que em nenhuma das placas contendo efluente foi possível verificar, pelo menos aparentemente, uma redução de cor das amostras, possivelmente pelo fato do fungo não estar utilizando os corantes presentes no meio como fonte de carbono.

4.2 - Cultivo do fungo com efluente em meio líquido:

Após terem sido realizados os estudos preliminares com o efluente em meio sólido, partiu-se para uma segunda etapa que foi o seu cultivo em meio líquido.

As amostras de efluente bruto e tratado inoculadas com suspensão de esporos foram analisadas após 5 dias. As FIGURAS 16 e 17 representam, respectivamente, os dados de redução de cor e açúcares redutores para o efluente bruto e tratado. O controle refere-se a amostra do efluente (tanto bruto quanto tratado), sem a inoculação da suspensão de esporos e mantido nas mesmas condições de cultura das amostras inoculadas.

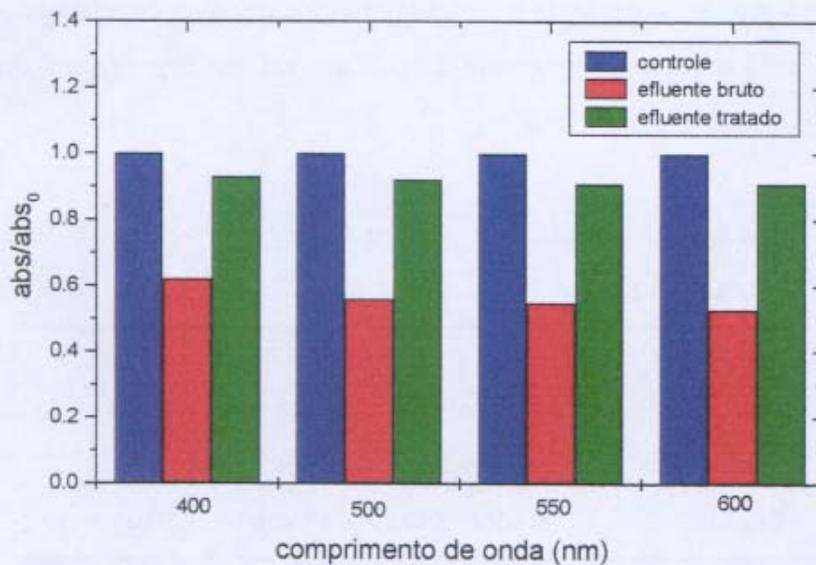


FIGURA 16: Redução de cor para efluente bruto (coletada antes da estação de tratamento de lodo ativado) e tratado (coletado após a estação de tratamento de lodo ativado) cultivado em meio líquido de *P. chrysosporium* a 37⁰C por 5 dias.

No que diz respeito aos dados de determinação de cor vale a pena salientar que estes comprimentos de onda foram escolhidos por serem os máximos de absorção do espectro da mistura de todos corantes atualmente utilizados pela indústria têxtil objeto do presente estudo.

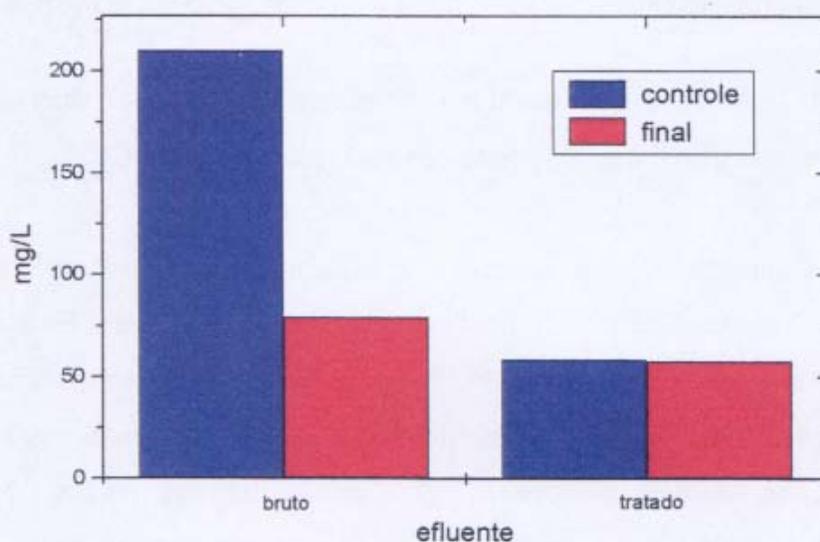


FIGURA 17: Diminuição de açúcares redutores no efluente bruto e tratado após 5 dias de inoculação em meio líquido com o fungo *P. chrysosporium*.

Em meio líquido obteve-se um crescimento muito bom do fungo nas alíquotas contendo o efluente bruto onde sugere-se que o fungo utilizou o material particulado presente no efluente como suporte para crescimento (FIGURA 18).

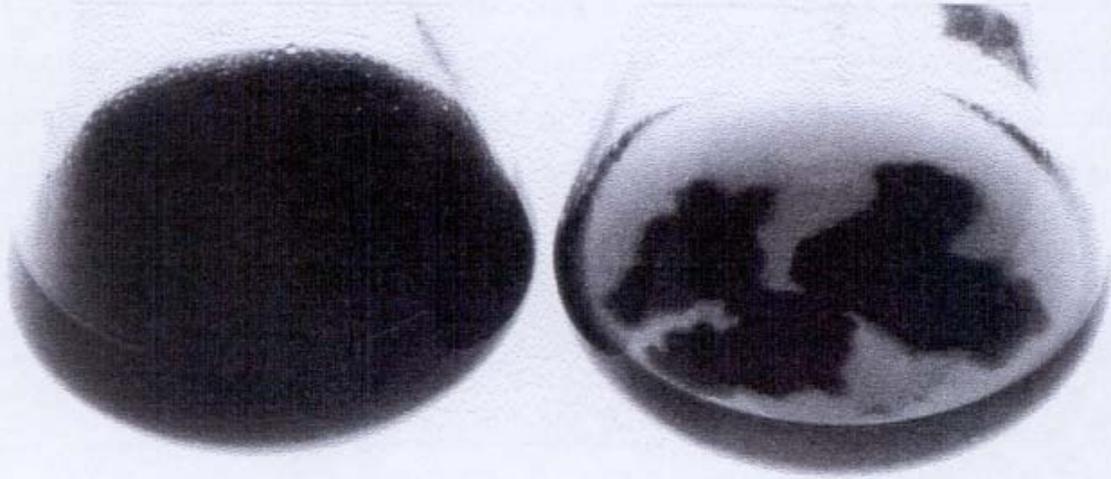


FIGURA 18: Crescimento do fungo no efluente têxtil após 5 dias (direita), comparado a um controle (esquerda), onde não foi inoculado o fungo.

Na amostra correspondente ao efluente bruto, o fungo cresceu facilmente devido à abundância de fonte de carbono presente no meio. Esta amostra apresentou uma descoloração de cerca de 40 %. No entanto, não poderia afirmar-se se o fungo estava degradando os corantes presentes no efluente ou somente encapsulando estes no micélio crescido. A segunda hipótese pareceu bastante razoável devido ao fato das amostras inoculadas com o efluente tratado, onde não houve crescimento significativo do micélio, praticamente não haver redução de cor. Outro indício foi o fato do micélio crescido no fungo correspondente ao efluente bruto apresentar uma coloração bem intensa indicando apenas uma adsorção.

O procedimento adotado foi a destruição do micélio na tentativa de liberar novamente estes compostos para a solução e determinar a cor nas amostras. As alíquotas foram então submetidas a forte agitação por cerca de 10 minutos, após este período as amostras se tornaram novamente fortemente coloridas, semelhante a que se apresentava inicialmente. As amostras foram filtradas e submetidas a determinação de cor (FIGURA 19).

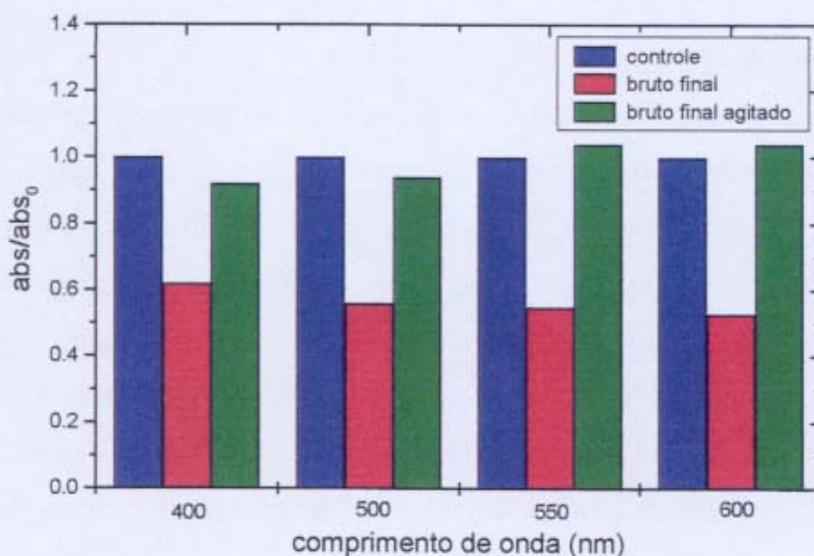


FIGURA 19: Efeito da agitação na resuspensão dos corantes após a inoculação do efluente bruto por 5 dias com o fungo *P. chrysosporium*

Pode-se observar pela figura acima que as amostras quando submetidas a forte agitação, com consequente destruição do micélio apresentam absorvâncias muito próximos aos valores iniciais. Isto mostra que o fungo nestas condições de cultura não degrada os corantes, devido ao fato do meio apresentar-se muito rico em nutrientes.

Determinações da atividade da enzima lignina peroxidase foram realizadas no meio de cultura mencionado nos 3 dias subsequentes. O meio não apresentou nenhuma atividade enzimática, esta inatividade está relacionada com a alta concentração de cloreto no meio (707 mg L^{-1}), o qual se liga a lignina peroxidase no mesmo sítio no qual se liga o H_2O_2 inativando desta forma a enzima (Cai e Tien, 1991).

4.3 - Resultados obtidos no Laboratório de Recursos Renovables (Chile):

4.3.1 - Ozonização dos corantes:

O estágio realizados no Laboratório de Recursos Renovables (Chile) compreendeu, primeiramente a familiarização com a técnica de ozonização, objetivo que foi total e rapidamente alcançado. Após a familiarização com o equipamento realizaram-se estudos com alguns dos corantes reativos utilizados no processamento têxtil da indústria objeto de nosso estudo. Para tanto foram escolhidos um azo corante (preto reativo 5 (R-5)), um corante antraquinona (azul reativo 19 (R-19)) e um corante ftalocianina (azul reativo 21 (R-21)) (FIGURA 20).

Estes três corantes foram escolhidos por serem representativos dos 3 principais tipos de grupos cromóforos constituintes dos corantes reativos.

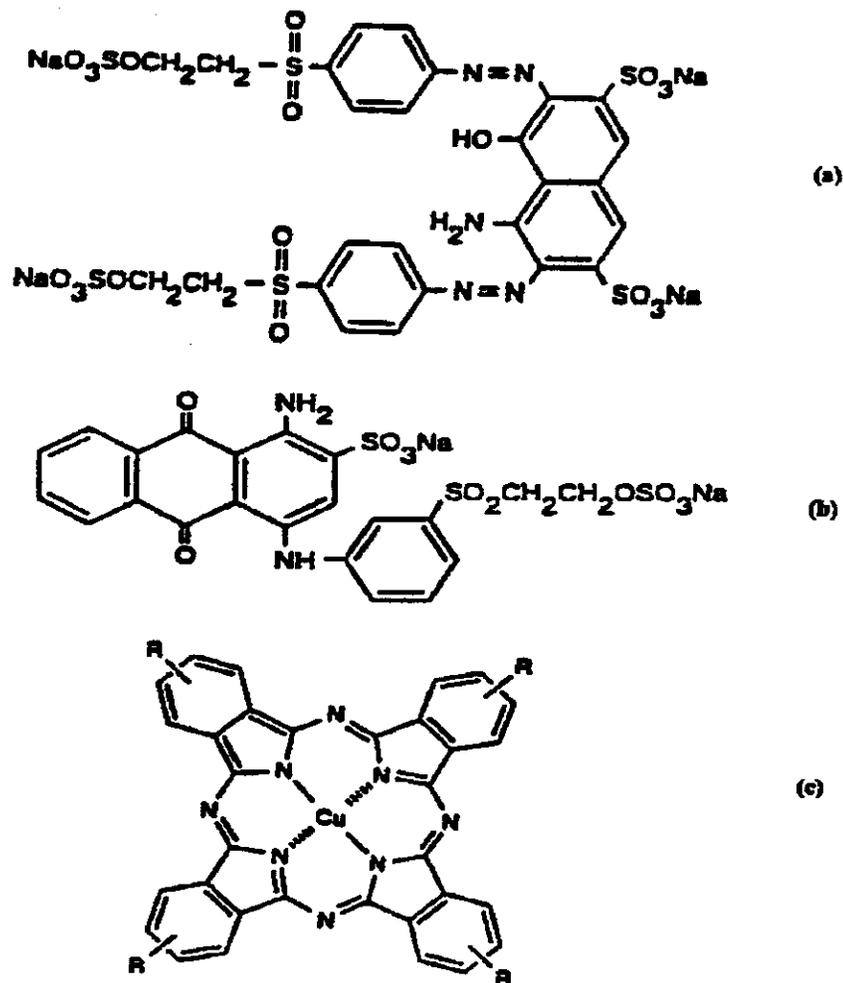


FIGURA 20: Estrutura dos corantes preto reativo-5 (a), azul reativo-19 (b) e azul reativo-21 (c), utilizados nos experimentos realizados no laboratório de recursos renovables (Chile).

A FIGURA 21 apresenta a diminuição da cor dos 3 corantes estudados em função do tempo de ozonização a 2 diferentes pHs. Para os corantes R-19 e R-21 observa-se uma rápida cinética de degradação com a eliminação total da cor em tempos inferiores a 8 minutos. No entanto para o corante R-5, observa-se uma cinética de degradação mais lenta que a apresentada pelos outros corantes citados

acima, indicando uma maior dificuldade de degradação de corantes azo. Shu e Huang (1995) estudando a degradação de vários corantes azo também verificaram que a sua velocidade de degradação diminuía conforme aumentava o número de ligações azo à molécula, isto pode ajudar a explicar a cinética de degradação do R-5 já que este se constitui num diazo corante.

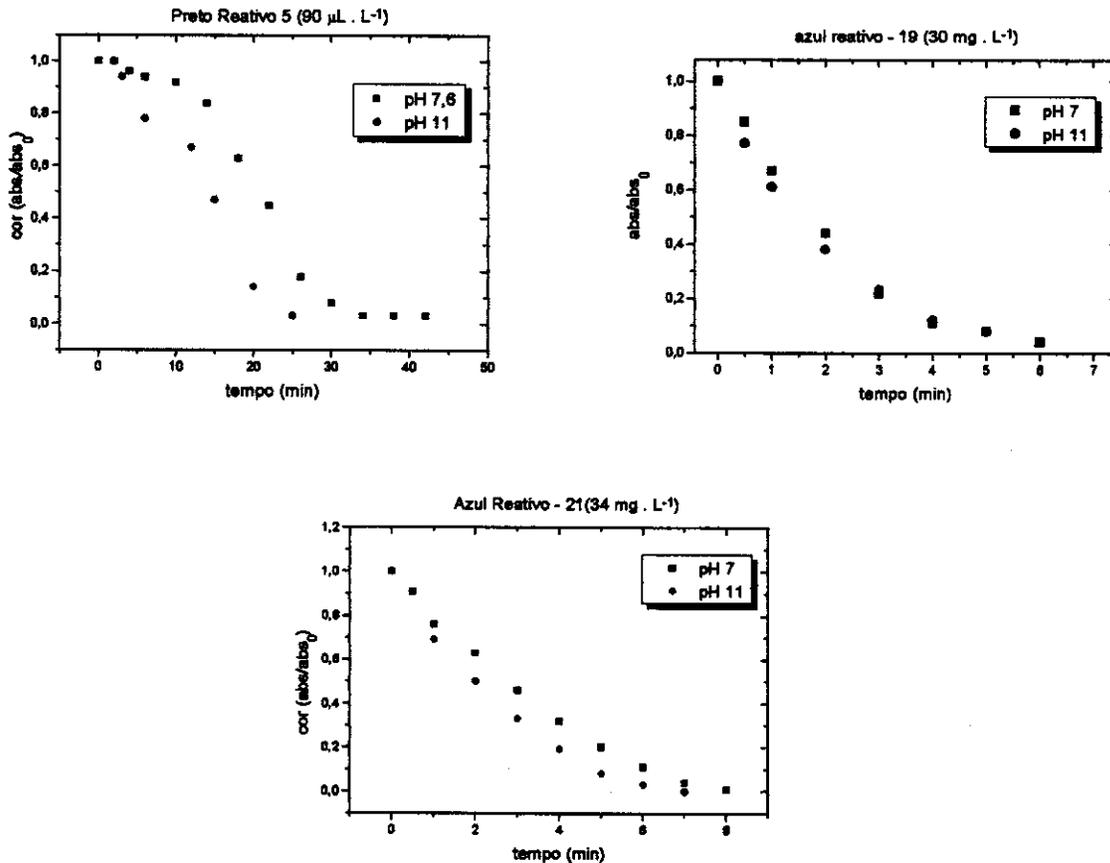


FIGURA 21: Diminuição de cor para os corantes ozonizados a dois diferentes pH.

O corante R-5 também apresentou um comportamento distinto nos dois pH estudados sendo degradado mais rapidamente a pH 11. Isto se deve ao fato da relação existente entre o potencial de oxidação e a decomposição do ozônio com

o pH. O potencial de oxidação do O_3 varia de aproximadamente 2,08 Volts em pH muito ácidos para somente 1,04 Volts em pH alcalinos. Embora o potencial de oxidação seja menor em pH alcalino, produtos de reação altamente reativos, como o radical hidroxila são formados, além disso o tempo de meia vida do O_3 é inversamente proporcional ao pH, isto leva a diferentes mecanismos de reação do ozônio com o substrato a diferentes pH (Hoigné e Bader, 1976). Portanto, o corante R-5 sofre uma influência mais significativa da reação via radical $\cdot OH$ do que os demais corantes.

Outra característica interessante é a variação do pH com o tempo de ozonização (FIGURA 22). As amostras ozonizadas a pH 7 apresentaram uma diminuição do pH com o tempo de ozonização. Isto se deve a formação de ácidos orgânicos e inorgânicos pela reação do ozônio com centros nucleofílicos via reação de ozonólise (Rice, 1981; Kuczkowski, 1992).

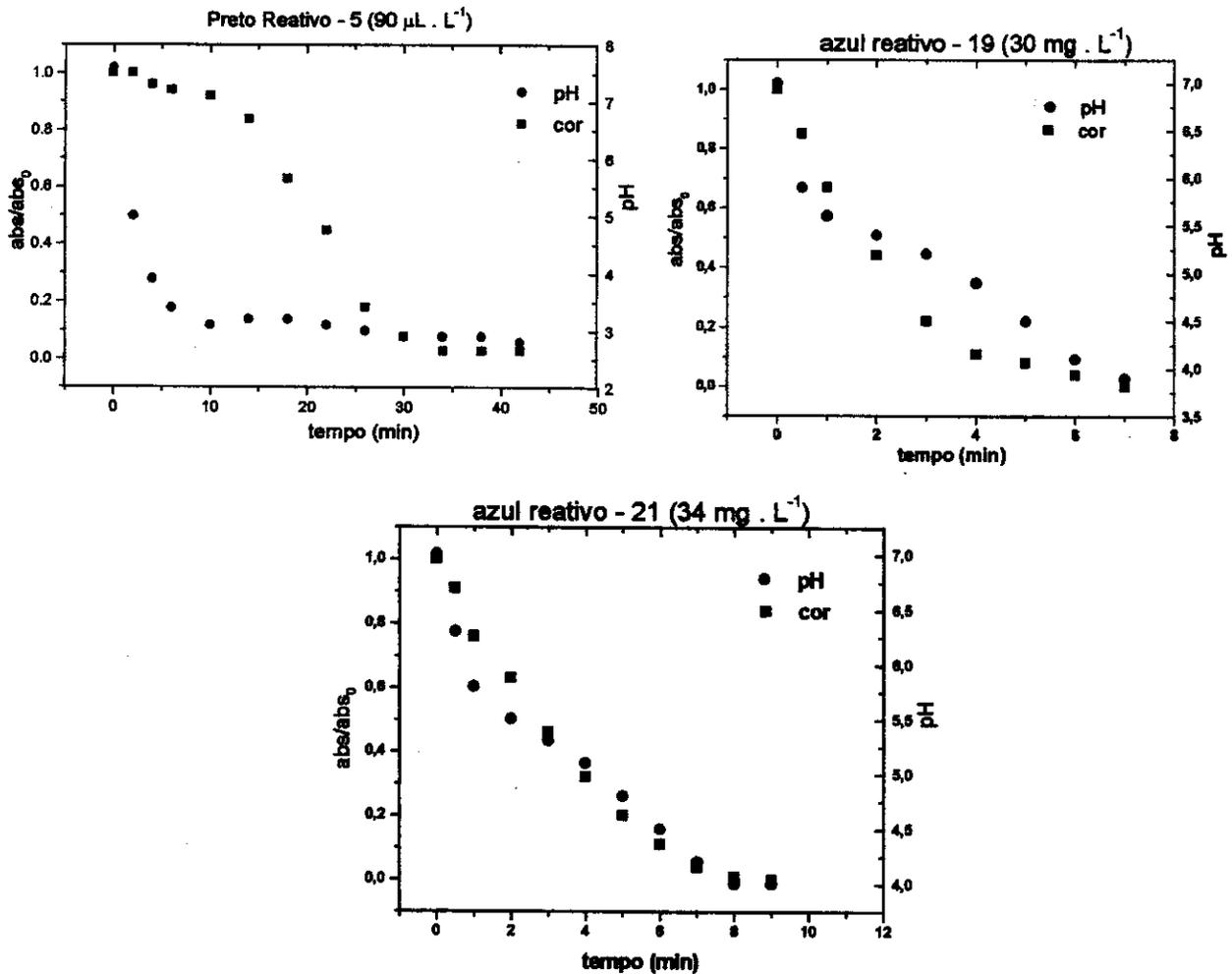


FIGURA 22: Diminuição de cor com a variação de pH dos corantes ozonizados a pH 7.

Novamente o corante R - 5 mostrou um comportamento distinto, apresentando uma rápida diminuição de pH nos primeiros minutos de ozonização chegando a unidades de pH inferiores a 3. Este fato possivelmente se deve a contribuição predominante de ácidos inorgânicos, está hipótese parece bastante razoável haja visto que o corante R-5 é um diazo corante constituindo-se de duas terminações de grupos sulfonatos. Quando submetido a ozonização estes grupos podem ser liberados para a solução formando H_2SO_4 .

A TABELA 12 apresenta os resultados obtidos na determinação de sulfato. Observa-se um significativo aumento na concentração do ânion no meio após 32 minutos de ozonização, indicando que este era o principal responsável pela diminuição do pH a valores inferiores a 3.

TABELA 12: Determinação de sulfato na solução de corante antes e após a ozonização.

	inicial	final	
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	7*	74*	71**

*com extração líquido-líquido

**sem extração líquido-líquido

As amostras ozonizadas a pH 11 não apresentaram variações significativas de pH, apresentando um decréscimo máximo de 0,5 ordens de magnitude entre a amostra inicial e final. Isto também indica os diferentes mecanismos de reação com a variação de pH conforme já discutido anteriormente.

4.3.2 - Toxicidade dos intermediários formados:

A toxicidade dos produtos pré e pós ozonizados foi avaliada com o teste microtox[®]. Este estudo foi realizado com o intuito de verificar se a ozonização estava gerando produtos mais ou menos tóxicos do que os produtos de partida. Vários estudos envolvendo toxicidade de produtos de ozonização têm sido desenvolvidos, principalmente no campo do tratamento de água potável, observando-se, em muitos casos, produtos de reação mais tóxicos que os produtos de partida (Jacangelo *e col*, 1989; Langlais, 1992).

A FIGURA 23 apresenta a toxicidade dos corantes sem ozonizar e ozonizadas a pH 7 e 11. Uma amostra é considerada com toxicidade aguda quando apresenta unidade de toxicidade (TU) maior ou igual a 1 (USEPA, 1991). O corante R-5 não apresentou toxicidade aguda tanto para a forma pré quanto pós ozonizada, o

mesmo não aconteceu com o R-19, que apresentou uma remoção da toxicidade aguda com a ozonização.

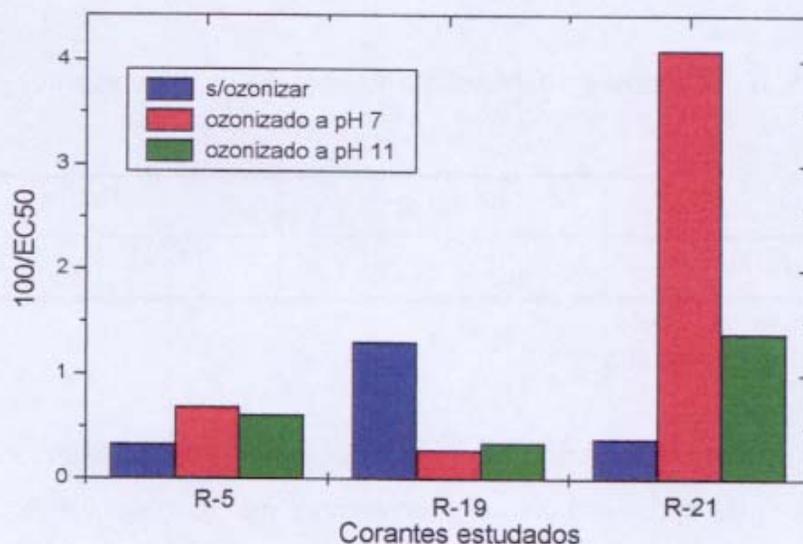


FIGURA 23: Toxicidade dos corantes pré e pós ozonizados a pH 7 e 11 iniciais (sem ozonizar) e finais (após desaparecimento da cor).

O caso mais interessante é, sem dúvida, do corante R-21 que apresentou um comportamento bem distinto com relação aos demais corantes estudados. Quando submetido a ozonização sua toxicidade cresceu sensivelmente, principalmente a pH 7. Suspeitou-se então que esta toxicidade fosse devido ao cobre que estaria sendo liberado da estrutura do corante com a oxidação deste.

O metal inicialmente complexado ao corante não estaria biodisponível, ou seja, não estaria presente num estado livre em condições de ser assimilado pela bactéria *V. fisheria*, ao passo que após a ozonização sua biodisponibilidade seria aumentada. A diferença apresentada entre a toxicidade do produto ozonizado a pH 7 e 11 pode ser atribuída a uma contribuição da hidrólise do metal o que causa uma diminuição em sua biodisponibilidade (Kunz, 1996).

Adams *et al* (1995) estudando a degradação do corante azul direto-80 (um complexo tridentado de cobre) demonstraram que ozônio e ozônio em combinação com peróxido de hidrogênio efetivamente liberam cobre para a solução com a destruição do complexo.

Para comprovar-se a hipótese de que o aumento da toxicidade com a ozonização do R-21 era devido principalmente ao cobre, determinou-se através de espectrometria de absorção atômica a concentração do metal na matriz em estudo (TABELA 13) e em seguida preparou-se uma solução de Cu^{2+} nesta mesma concentração e determinou-se sua toxicidade (FIGURA 24).

TABELA 13: Determinação de cobre por espectrometria de absorção atômica no corante pré e pós-ozonizado.

amostra	Concentração (mg L^{-1})
inicial	0,60 ($\pm 1\%$)
ozonizada a pH 7	0,59 ($\pm 1,2\%$)
ozonizada a pH 11	0,56 ($\pm 0,9\%$)

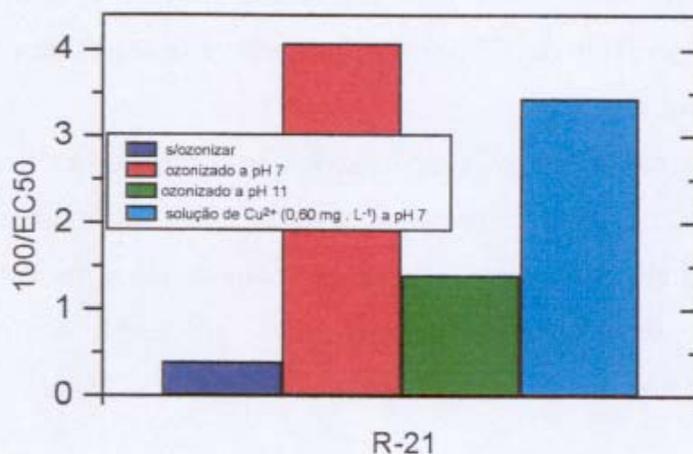


FIGURA 24: Toxicidade do corante R-21 pré e pós ozonizado a pH 7 e 11(inicial e finais) comparado a uma solução de Cu²⁺ a pH 7.

Observa-se pela figura acima que a toxicidade do corante ozonizado e a solução de Cu²⁺ são muito similares frente ao organismo teste, demonstrando que a contribuição para a toxicidade na matriz se deve pelo menos na maior parte, ao cobre liberado pelo complexo após sua oxidação pelo ozônio.

4.3.3 - Determinação de DQO e COT:

As determinações da demanda química de oxigênio (DQO) e do carbono orgânico total (COT) foram realizadas com o intuito de verificar a eficiência da ozonização na mineralização da matéria orgânica.

Embora a ozonização apresente uma rápida descoloração dos corantes, obtiveram-se resultados satisfatórios com relação a DQO e COT (FIGURA 25 e 26). Os corantes R-19 e R-21 apenas apresentaram uma redução de DQO em torno de 30 % e COT 50 % não apresentando diferença significativa entre os dois pH. Estes dados vão ao encontro com aqueles apresentados na literatura que demonstram que o ozônio não se apresenta muito eficiente na remoção de DQO e COT sendo necessário sua combinação com outros processos (Perkowski, 1996; Mansilla *e col*, 1997).

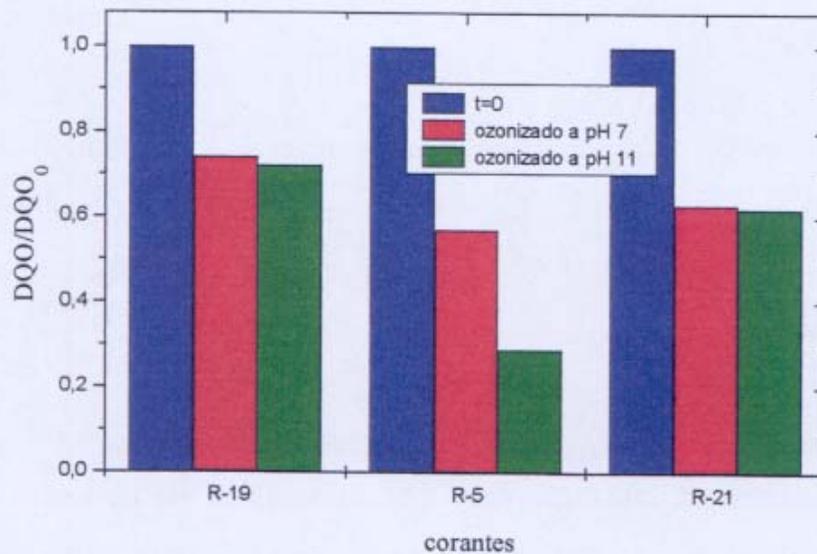


FIGURA 25: Determinação de DQO para os corantes estudados, sem ozonizar (iniciais) e ozonizados (após o desaparecimento da cor) a pH 7 e 11.

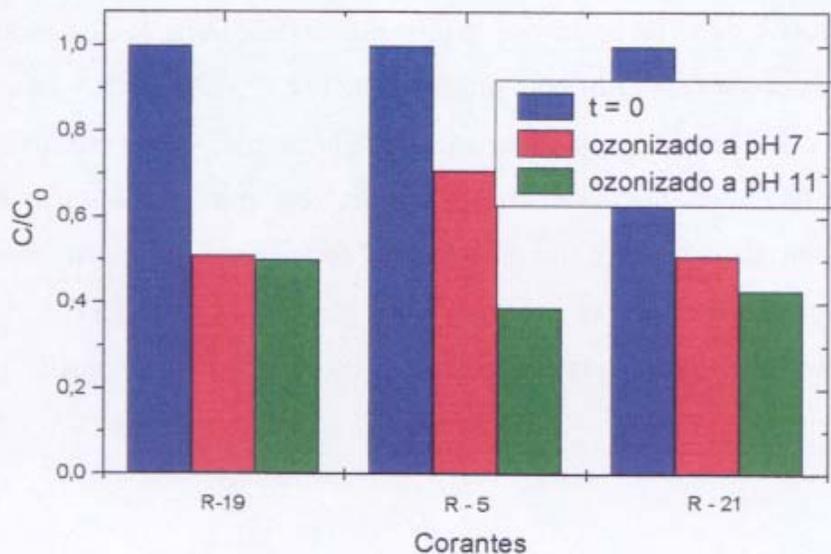


FIGURA 26: Determinação de COT para os corantes estudados, iniciais e finais, ozonizados a pH 7 e 11.

O corante R-5 apresentou mais uma vez diferenças significativas entre o pH 7 e 11, evidenciando a influência da reação via radical $\cdot\text{OH}$ também para redução de COT e DQO, fato que já foi comprovado nos experimentos anteriores para a redução de cor.

4.3.4 - Análise por CLAE dos compostos formados com a ozonização:

O objetivo da utilização desta técnica analítica foi de verificar a formação de intermediários durante o curso da ozonização. Neste sentido foram retiradas amostras dos corantes em vários tempos de ozonização.

O corante que apresentou resultados mais satisfatórios foi o corante R-19, apresentando um cromatograma com alguns picos relativamente bem resolvidos. A FIGURA 27 apresenta este corante ozonizado a pH 7, observa-se que com a ozonização obtem-se uma rápida diminuição dos picos de número 2, 4, 5 e 6 com o aparecimento do pico 1 que não se encontra bem resolvido, sendo constituído por vários subprodutos de reação.

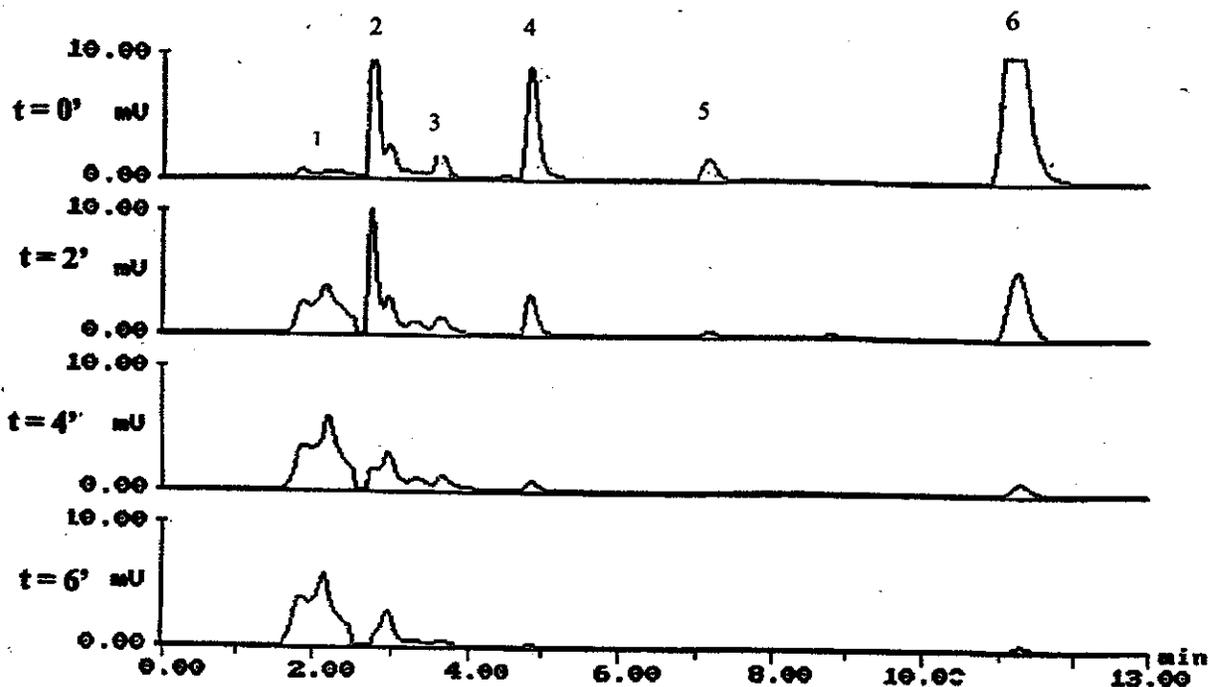


FIGURA 27: Cromatogramas obtidos para o corante R-19 inicial e de alguns intervalos de tempo de ozonização a pH 7 (condições de análise conforme descrito no item 3.4.3.2).

O cromatograma referente a amostra ozonizada a pH 11 (FIGURA 28), apresenta um perfil um pouco distinto daquele apresentado a pH 7, principalmente dos intermediários referentes aos tempos de 2 e 4 minutos de ozonização. Suspeitou-se então que este comportamento distinto poderia ser devido a hidrólise do corante (e ou de subprodutos presentes neste) que poderia estar ocorrendo simultaneamente com a ozonização.

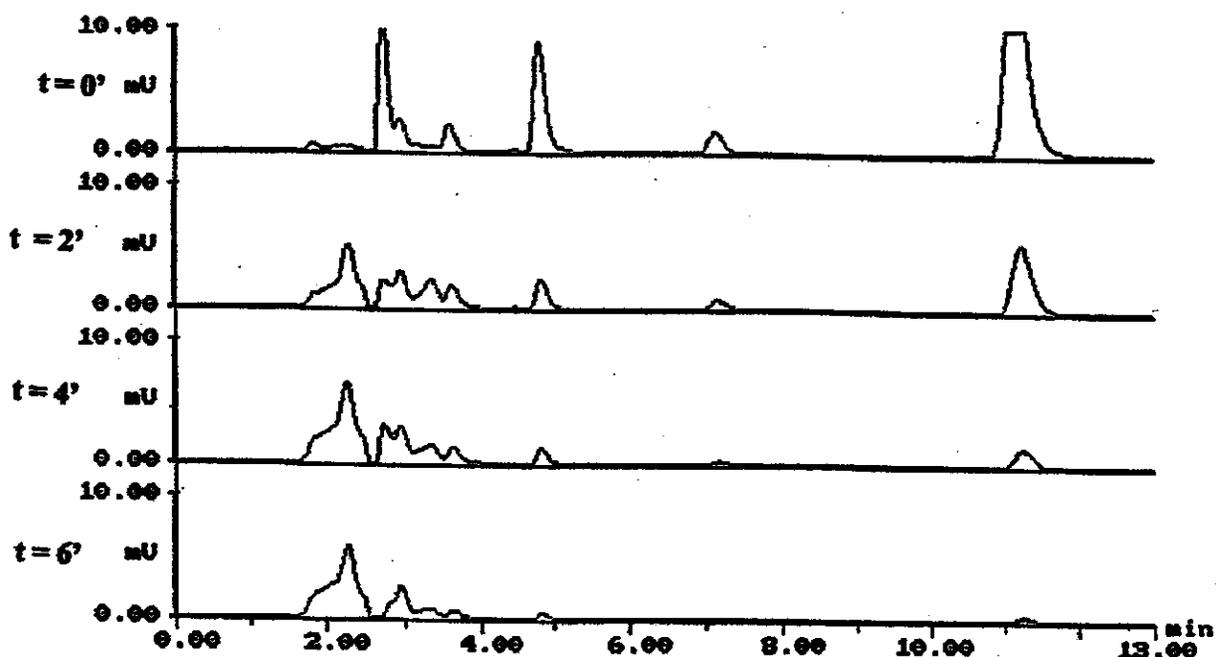


FIGURA 28: Cromatogramas obtidos para o corante R-19 inicial e após alguns intervalos de tempo de ozonização a pH 11 (condições de análise conforme descrito no item 3.4.3.2).

Para estudar-se um pouco mais detalhadamente o efeito do pH na hidrólise do corante, preparou-se uma solução do corante, ajustou-se o seu pH em 11 e deixou-se a amostra em repouso submetendo-se a análise em dois tempos distintos (FIGURA 29).

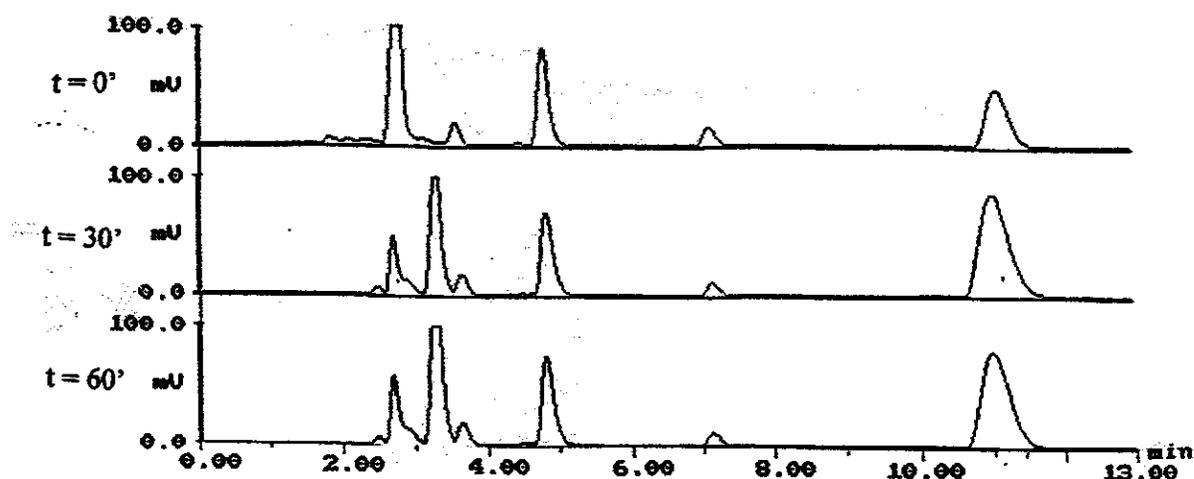


FIGURA 29: Cromatogramas obtidos para o corante R-19 deixada em repouso a pH 11 (condições de análise conforme descrito no item 3.4.3.2).

Pode-se observar pelo cromatograma acima que os intermediários formados no tempo 30 e 60 minutos possuem tempos de retenção muito semelhantes a aqueles encontrados na FIGURA 28, confirmando a presença de produtos de hidrólise que são inicialmente formados e posteriormente degradados pela ozonização.

Nos estudos realizados com os corantes R-5 e R-21 não obtiveram-se cromatogramas bem resolvidos (FIGURA 30 e 31), apresentando um número muito pequeno de picos, embora se tivesse tentado várias condições, como variação na mistura de solventes e vazão, demonstrando que esta técnica analítica não é muito recomendável para a separação destes compostos.

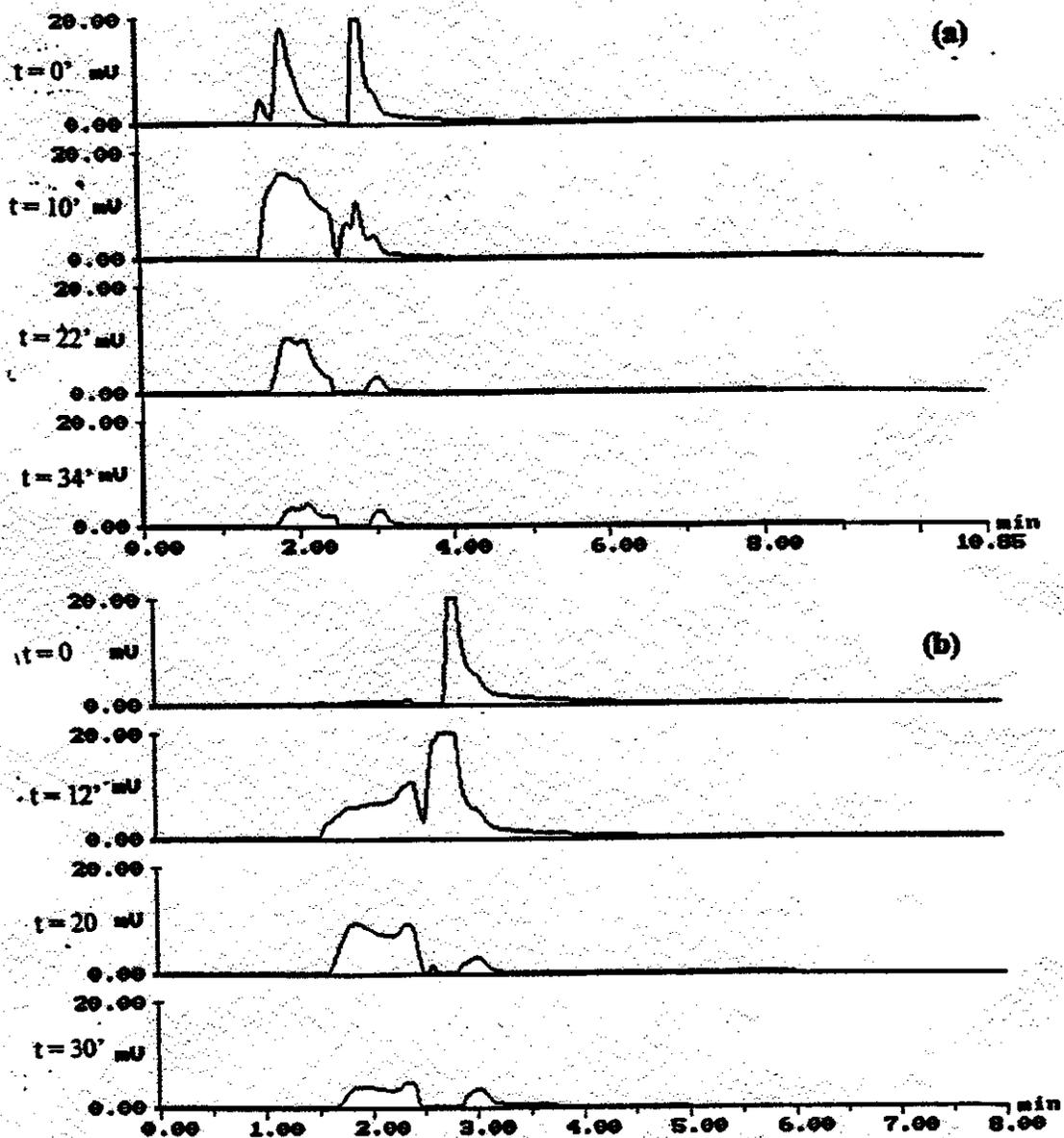


FIGURA 30: Cromatogramas obtidos para o corante R-5 inicial e de alguns intervalos de tempo de ozonização a pH 7,6 (a) e 11 (b). (condições de análise conforme descrito no item 3.4.3.2).

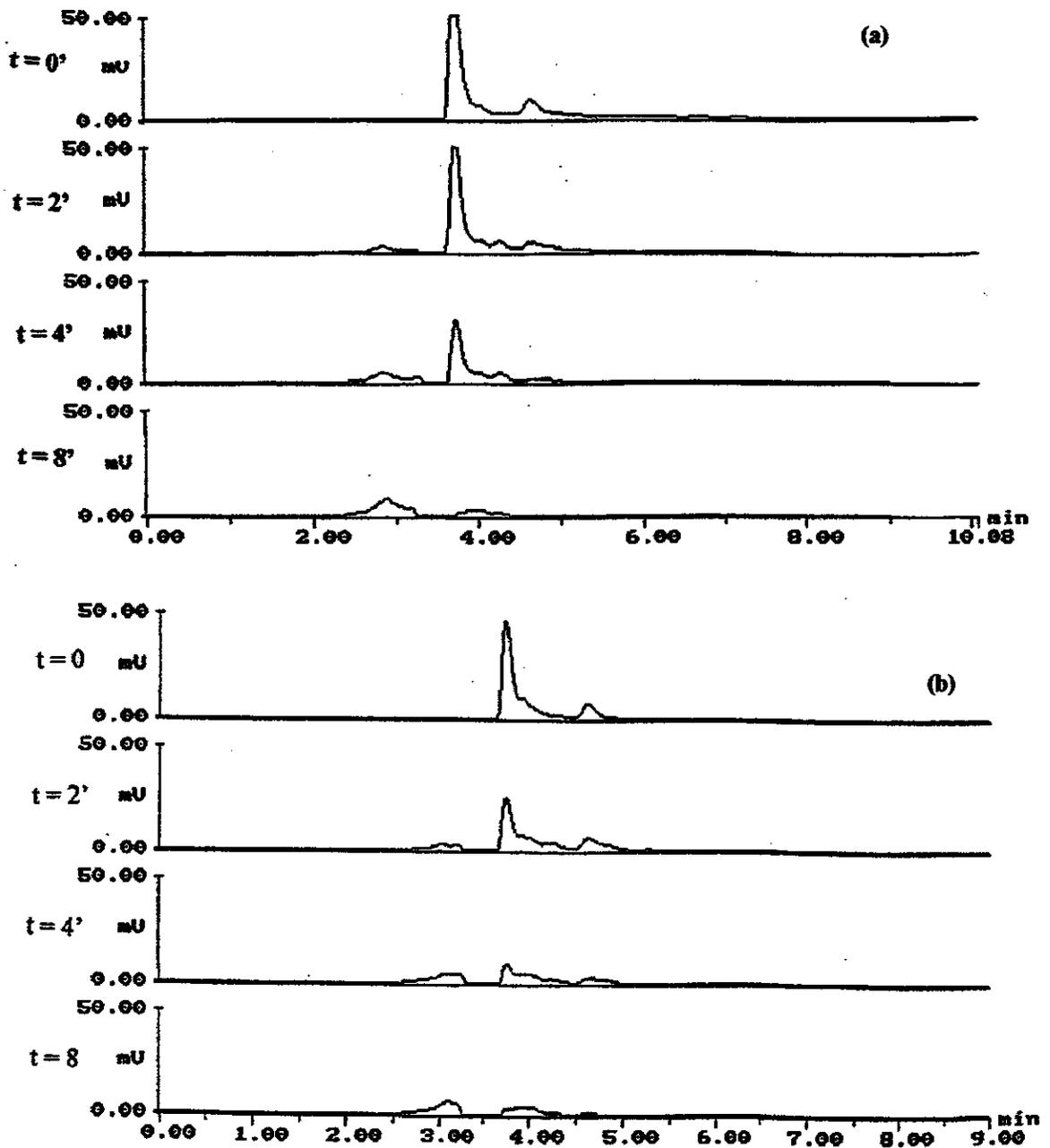


FIGURA 31: Cromatogramas obtidos para o corante R-21 inicial e de alguns intervalos de tempo de ozonização a pH 7 (a) e 11 (b) (condições de análise conforme descrito no item 3.4.3.2).

Estudos recentes mostram a dificuldade de analisar corantes reativos por CLAE, sugerindo-se a utilização de outras técnicas analíticas como eletroforese capilar, uma técnica cromatográfica emergente, que aparentemente apresenta um potencial de aplicação muito promissor para a separação deste tipo de compostos (Tavares, 1997). Tapley (1995) estudou a utilização de eletroforese capilar para a separação de vários corantes reativos, dentre eles o corante R-5 e um corante derivado de ftalocianina, obtendo cromatogramas bem definidos. Resultados semelhantes foram obtidos por Lord *e col* (1995) e Oxpring *e col* (1995) que obtiveram resultados bastante promissores na separação de misturas de corantes têxteis, com uma boa resolução dos cromatogramas.

4.4 – Montagem e otimização do equipamento para ozonização:

Para a utilização do ozônio neste trabalho de tese foi necessário primeiramente a montagem e otimização do equipamento de ozonização no laboratório.

4.4.1 – Interfaceamento:

O espectrofotômetro utilizado para a determinação da concentração de ozônio produzido pelo sistema, foi interfaceado a um microcomputador Pentium 200 MHz, compatível com a linha PC-IBM, através de uma interface paralela de 8 bits. A interface, construída no próprio laboratório, utiliza uma porta do usuário de comunicação bidirecional programável, modelo 8255 operando de modo assíncrona (Malcome-Lowes, 1988). Esta porta foi empregada para gerar os sinais de controle necessários para aquisição e transferência de dados do espectrofotômetro para o computador através de um conversor analógico/digital (A/D) 8 bits (ADC 0808).

O processo de conversão dos dados analógicos para digitais é comandado por um sinal enviado pelo microcomputador ao A/D, sendo que o número de dados adquiridos é pré-selecionado pelo usuário, assim como o tempo total de monitoramento do sistema de ozonização.

O programa de gerenciamento da interface e aquisição dos dados foi escrito em linguagem Visual Basic 3.0, tendo como ambiente de trabalho o Windows 95. O programa foi construído nesta linguagem para oferecer uma interface gráfica de fácil manuseio pelo usuário, buscando obter o máximo de proveito do circuito eletrônico, controlando a função de leitura de absorvância em função do tempo.

Além de fazer a aquisição e armazenamento dos dados, o programa permite o tratamento das curvas que indicam a variação da concentração de ozônio proveniente do reator por unidade de tempo (FIGURA 32). Após atingir o estado estacionário de produção de ozônio, o programa permite calcular a concentração inicial do gás através da Lei de Beer. A intervalos de tempo previamente

selecionados pelo usuário, os dados da curva são integrados e a quantidade de ozônio consumido é então determinada para cada faixa, como exemplificado na FIGURA 32.

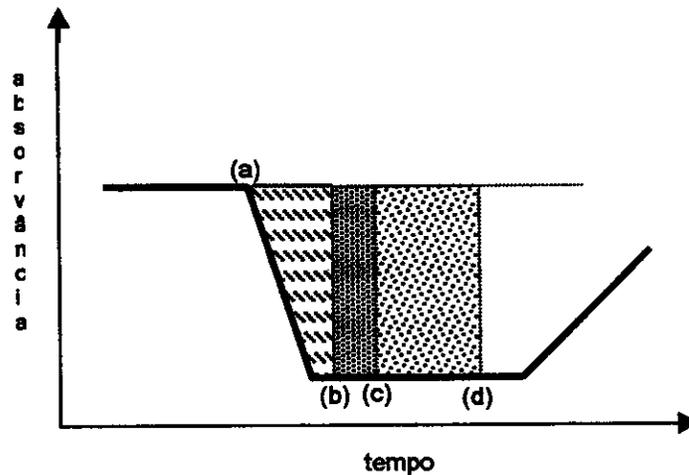


FIGURA 32: Curva de ozônio residual durante ozonização. O ponto (a) é utilizado para cálculo da concentração inicial do gás, os pontos (b), (c) e (d) são os intervalos selecionados para cálculo do consumo de ozônio.

4.4.2 – Medida da produção de ozônio:

Este estudo teve como finalidade avaliar a produção mássica de ozônio nos três níveis de produção permitidos pelo ozonizador. Além disso, foi avaliado o intervalo de tempo necessário para que a produção de ozônio alcançasse o estado estacionário. Para tanto, a vazão de entrada do oxigênio foi ajustada a 15 L h^{-1} , devido ao fato que vazões mais baixas apresentam problemas de perda de carga, o que afeta diretamente a transferência do ozônio da fase gasosa para a fase líquida. Este fato está relacionado com a resistência à passagem de gás pela placa porosa diminuindo sensivelmente a sua vazão na saída do reator.

Pode-se observar pela FIGURA 33 que o estado estacionário é alcançado após aproximadamente 5 minutos do início de operação do sistema,

quando o ozonizador opera nos níveis 1 e 2. Para o nível 3, no entanto, o estado estacionário é atingido após 8 minutos. As taxas de produção de ozônio pelo sistema, após um período de 10 minutos, foram de 0,08; 0,14 e 0,35 g h⁻¹ para os níveis 1, 2 e 3, respectivamente.

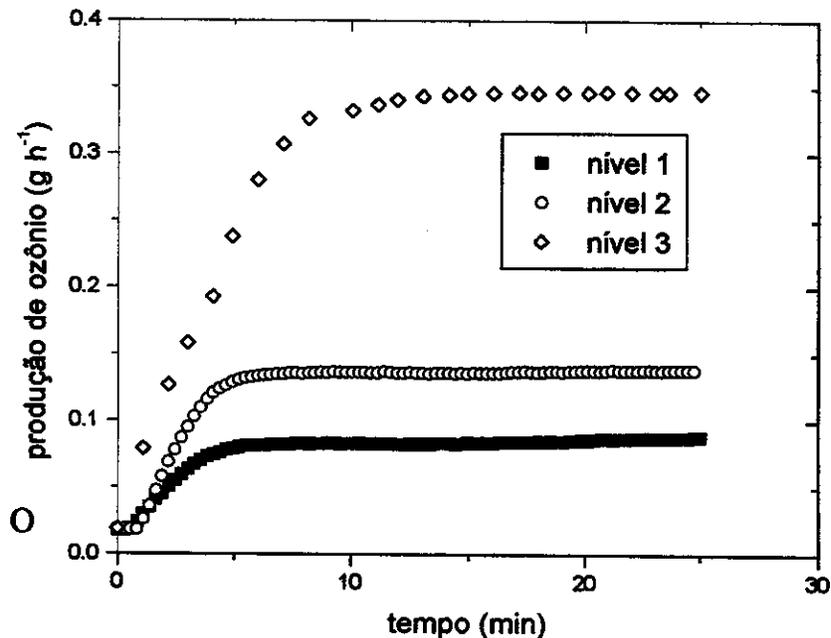


FIGURA 33: Variação na produção de ozônio para os 3 níveis em função do tempo de ozonização (vazão de entrada de oxigênio: 14,96 (\pm 0,01) L h⁻¹).

4.4.3 - Transferência de massa no reator:

A transferência de ozônio da fase gasosa para a fase líquida é um processo limitante na utilização deste gás como agente oxidante. Vários modelos têm sido propostos para descrever a transferência do ozônio da fase gasosa para a fase líquida (Treybal, 1991). Geralmente estes modelos postulam que a concentração em ambas as fases é homogênea, com exceção de uma delgada zona em torno da interface gás líquido.

Para determinar-se o coeficiente de transferência de massa ($K_L a$) é necessário calcular-se o balanço de massa na fase limitante (líquida). O balanço de massa nesta fase pode ser calculada através da seguinte equação (Treybal, 1991):

$$dC_L/dt = K_L a (C_L^{sat} - C_L) - K_d C_L \quad (1)$$

Onde:

$K_L a$ = coeficiente de transferência de massa para a fase líquida em min^{-1} .

C_L^{sat} = Concentração de saturação de ozônio no líquido em mg L^{-1} , nas condições de operação (temperatura (T), pressão parcial de ozônio (p_{O_3})).

C_L = Concentração de ozônio na solução em mg L^{-1} .

K_d = Constante de decomposição de ozônio (min^{-1}).

t = tempo de ozonização (min).

Sob condições hidrodinâmicas, a pH e temperatura constantes, K_d e $K_L a$ são constantes e a equação (1) pode ser integrada, resultando em:

$$C_L = \frac{K_L a}{K_L a + K_d} C_L^{sat} + [C_{L0} - \frac{K_L a}{K_L a + K_d} C_L^{sat}] \exp^{-(K_L a + K_d) t} \quad (2)$$

Esta equação mostra a relação da concentração de ozônio dissolvido em função do tempo, tendo como parâmetros a constante cinética de autodecomposição (K_d) e o coeficiente de transferência de massa ($K_L a$) e a concentração de saturação no líquido (C_L^{sat}).

Neste trabalho, para determinar-se a constante de decomposição de ozônio (K_d) utilizou-se a relação obtida por Sullivan e *col.* (1979):

$$-dC_L/dt = 9,811 \times 10^7 \exp(-5606/T) [\text{OH}]^{0,123} (C_L) \quad (3)$$

Esta relação considera a velocidade de autodecomposição como sendo de primeira ordem em relação a concentração de ozônio no líquido e dependente da concentração de íons hidroxila e da temperatura.

Durante todos experimentos realizados, a solução contida no reator foi mantida a uma temperatura de 26 °C e pH 2. O pH ácido foi utilizado devido ao fato do ozônio apresentar uma menor velocidade de autodecomposição (Melo *et al.*, 1997). Da equação (3) obtem-se um valor de $K_d = 0,024 \text{ min}^{-1}$.

A concentração de saturação do ozônio no líquido, que era constituído de água deionizada a pH 2, o que elimina as interferências de autodecomposição e reações do ozônio com algum substrato, foi determinada após 30 minutos de ozonização, para garantir que a fase líquida estivesse saturada com o gás. A concentração de saturação encontrada foi de $5,75 (\pm 0,21) \text{ mg L}^{-1}$.

A concentração de ozônio dissolvido no líquido em função dos diversos tempos de ozonização (FIGURA 34) apresenta um comportamento exponencial, sendo descrito pela equação (4).

$$C_{O_3} = 6,19 + (-5,45) \cdot e^{(-t/5,23)} \quad (4)$$

Onde: C_{O_3} = concentração de ozônio em mg L^{-1}

t = tempo em minutos.

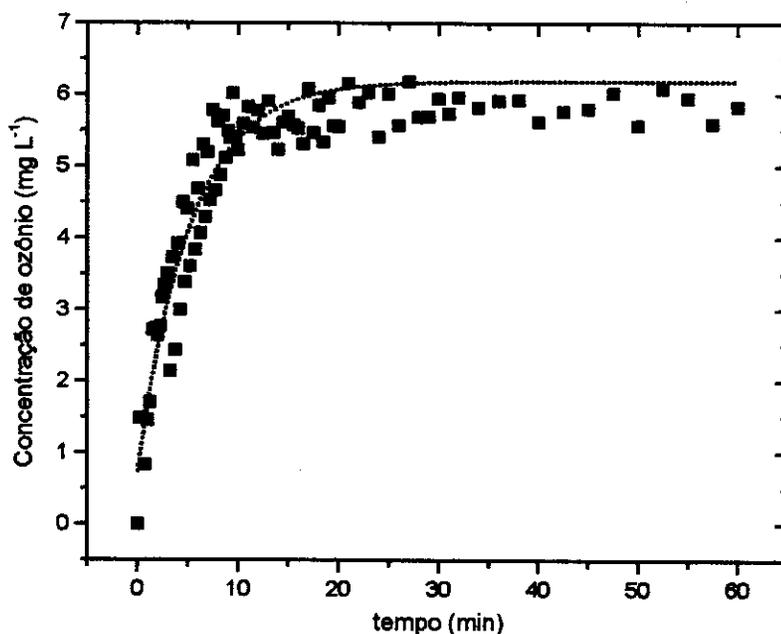


FIGURA 34: Ozônio dissolvido na solução contida no reator (água deionizada a pH 2) em função do tempo de ozonização (vazão = $14,96 (\pm 0,001) \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, $T = 26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 2$).

A FIGURA 34 mostra também que os dados experimentais apresentam uma dispersão aleatória, sendo que a curva ajustada a estes dados apresenta um comportamento que se afasta do valor médio, na região que define o estado estacionário. Mesmo empregando diferentes algoritmos matemáticos para o ajuste da curva, esta tendência sempre foi observada. Desta forma, antes de se realizar o ajuste da curva, os dados experimentais foram tratados com filtro digital, empregando o algoritmo de Savitsky-Golay (Savitzky e Golay, 1964).

A FIGURA 35 mostra os dados já tratados, bem como a curva que foi ajustada a estes valores. Após este tratamento a equação que descreve a concentração de ozônio dissolvido na fase líquida em função do tempo é descrita por:

$$C_{O_3} = 5,90 - 5,23 \cdot e^{(-t/4,52)} \quad (5)$$

onde os termos da equação já foram definidos anteriormente.

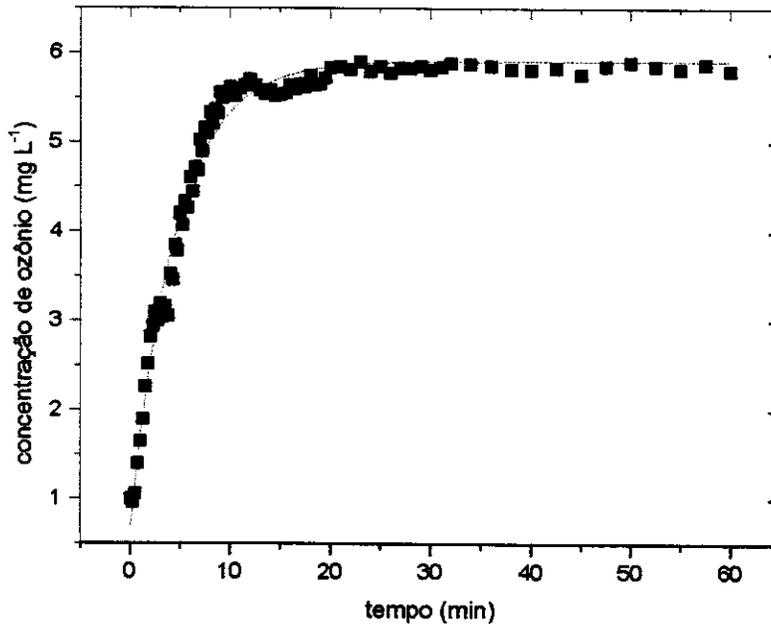


FIGURA 35: Curva ajustada a partir dos dados experimentais após tratamento com filtro digital.

Quando a curva obtida através da equação 5 é sobreposta aos dados experimentais sem qualquer tipo de tratamento, observa-se que esta se ajusta melhor que a curva descrita pela equação 4. Desta forma, para calcular-se o valor de K_{La} , foram substituídos os dados da equação (5) na equação (2), obtendo-se um valor de K_{La} de $0,197 \text{ min}^{-1}$. Este valor representa uma melhor transferência de massa do reator proposto, quando comparada a reatores com diferentes arquiteturas (Mendez *et al*, 1996).

4.5 - Tratamento com ozônio:

Inicialmente estudou-se o efeito que o pH e a vazão de entrada de gás (O_2) no sistema teriam sobre a descoloração do efluente em estudo. Este estudo foi realizado lançando-se mão de ferramentas quimiométricas (Barros Neto *e col.*, 1995), através de dois planejamentos fatoriais completos, 2^2 , conforme demonstrado abaixo (TABELA 13 e 14). Os níveis da variável pH foram escolhidos tentando-se estudar a região alcalina, neutra e ácida. A variável vazão de O_2 foi escolhida levando-se em conta as limitações experimentais do equipamento. O tempo de ozonização foi correspondente a dez minutos.

TABELA 13: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para estudar o efeito do pH (ácido e neutro) e da vazão de O_2 na descoloração do efluente têxtil.

Ensaio	pH	vazão de gás (L h ⁻¹)	cor (Abs/Abs ₀ a 400 nm)		média
1	3	10	0,86	-	0,86
2	7	10	0,83	0,83	0,83
3	3	15	0,57	-	0,57
4	7	15	0,58	0,59	0,58

TABELA 14: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para estudar o efeito do pH (neutro e alcalino) e da vazão de O_2 na descoloração do efluente têxtil.

Ensaio	pH	vazão de gás (L h ⁻¹)	cor (Abs/Abs ₀ a 400 nm)		média
1	7	10	0,83	0,83	0,83
2	11	10	0,82	-	0,82
3	7	15	0,59	0,58	0,58
4	11	15	0,57	-	0,57

As TABELAS 15 e 16 demonstram os efeitos calculados (principal e de interação para os planejamentos fatoriais das TABELAS 14 e 15 respectivamente.

TABELA 15: Efeitos calculados para o planejamento fatorial da TABELA 13.

	Estimativa \pm erro padrão
Média global	0,71 ($\pm 0,01$)
Efeitos principais	
pH	-0,01 ($\pm 0,02$)
vazão	0,26 ($\pm 0,02$)
Efeito de interação	
pH x vazão	-0,06 ($\pm 0,02$)

TABELA 16: Efeitos calculados para o planejamento fatorial da TABELA 14.

	Estimativa \pm erro padrão
Média global	0,70 ($\pm 0,01$)
Efeitos principais	
pH	-0,01 ($\pm 0,02$)
vazão	0,25 ($\pm 0,02$)
Efeito de interação	
pH x vazão	0,08 ($\pm 0,02$)

Pelos dados apresentados nas tabelas acima, pode-se concluir facilmente que o efeito mais significativo na descoloração do efluente é o da vazão do gás, não exercendo o pH um efeito significativo em ambas as faixas consideradas no estudo.

As figuras abaixo representam a interpretação geométrica dos resultados de descoloração do efluente têxtil nos pH e vazões estudadas. Podemos observar também aí que o efeito mais significativo na descoloração do efluente é a vazão de gás no reator.

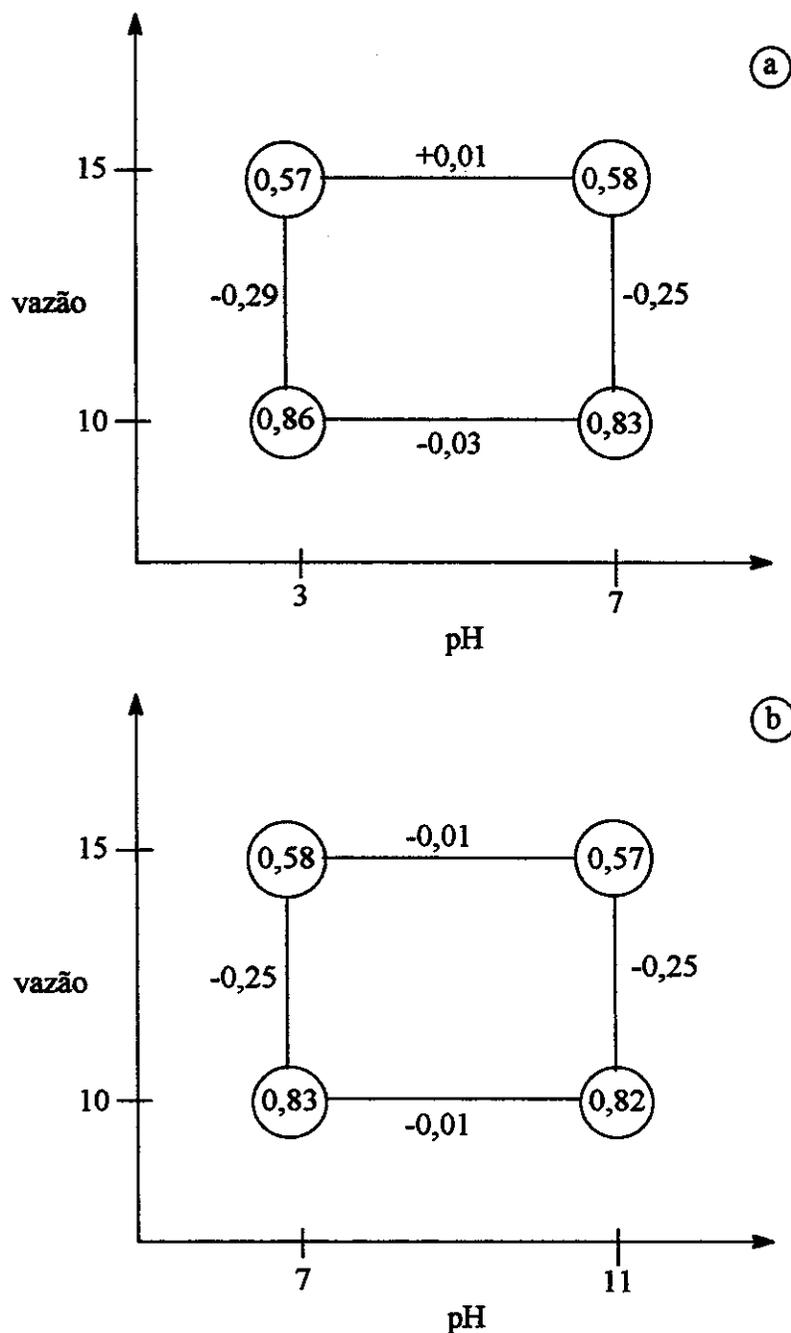


FIGURA 36: Diagrama dos resultados do planejamento fatorial 2^2 para o fatorial da TABELA 13 (a) e 14 (b).

A importância da vazão na descoloração, pode ser explicada por uma maior transferência de ozônio para a solução, conseqüente de uma maior produção deste nestas condições.

O pH, por sua vez, não apresentou um efeito significativo tanto a valores ácidos, quanto neutros ou alcalinos. A princípio era de se esperar que o pH pudesse contribuir significativamente na degradação do efluente em estudo através da decomposição do ozônio (formando radicais hidroxila) pelo mecanismo indireto de reação do ozônio (Masten e Davis, 1994; Kunz e col, 1997).

No entanto, a reação do radical hidroxila pode ser inibida pela presença de sequestradores de radicais (do inglês “scavengers”), que reagem com o radical hidroxila formando espécies com potencial de oxidação bem menores que este (Sonntag e col., 1997; Hoigné, 1997). Além disso, a reação de ozônio via direta com alguns compostos do efluente, também podem dar origem a compostos que são sequestradores de radicais, como por exemplo produtos de degradação de açúcares presentes neste efluente dando origem a espécies como formiato (que caracterizam-se por serem bons sequestradores de radicais hidroxila), impedindo assim a reação do substrato desejado com este radical (Laat e col., 1995).

Após estudar-se os efeitos mencionados acima e verificado que o pH não se mostrou como uma variável significativa na ozonização do efluente, resolveu-se fixar o pH a 11, o qual é muito próximo daquele de saída do efluente têxtil.

A FIGURA 37 mostra a descoloração do efluente têxtil a pH 11, monitorada em 4 comprimentos de onda. Estes comprimentos de onda foram escolhidos por serem representativos das absorvâncias máximas das misturas dos corantes utilizados pela indústria em questão. Pode-se observar uma rápida descoloração inicial, estabilizando-se em aproximadamente 70 % de remoção de cor para o λ de 400 nm e de aproximadamente 85 % para os demais comprimentos de onda, após 40 minutos de ozonização.

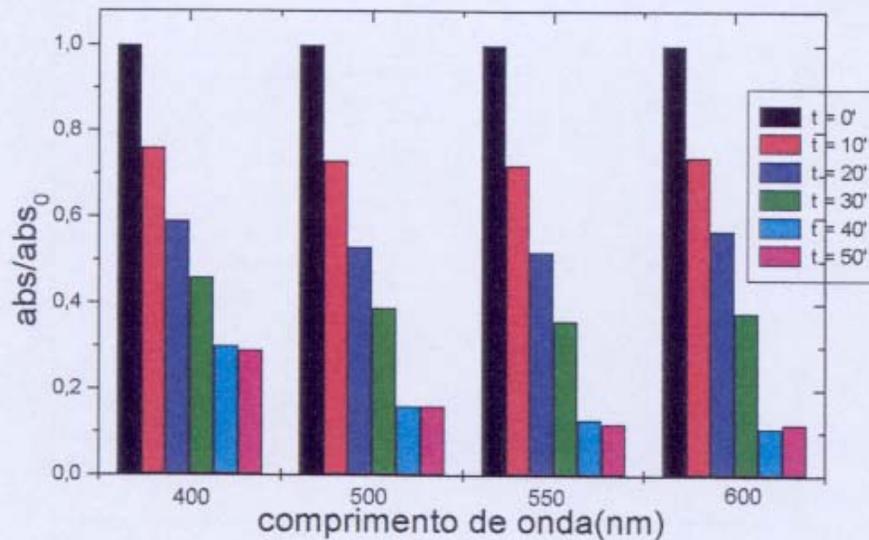


FIGURA 37: Descoloração do efluente têxtil ozonizado a pH 11.

A diminuição de carbono orgânico total (COT) e de cloretos, mostrada na FIGURA 38 não se apresentaram nada significativos, mostrando mais uma vez, como também já demonstrado na literatura (Lin e Liu, 1994; Zhou e Smith, 1997 e Hostachy *et al.* 1997) que o ozônio, através do mecanismo direto, não é um bom agente para mineralização de matéria orgânica.

No entanto, os fenóis totais apresentaram uma diminuição de aproximadamente 45 % após 80 minutos de ozonização, demonstrando que o ozônio é eficaz na redução destes compostos, que podem estar envolvidos com a toxicidade de efluentes industriais. O ozônio reage com fenóis levando a abertura do anel aromático e subsequente formação de diácidos orgânicos de cadeia aberta (Snider e Porter, 1974; Rice, 1981).

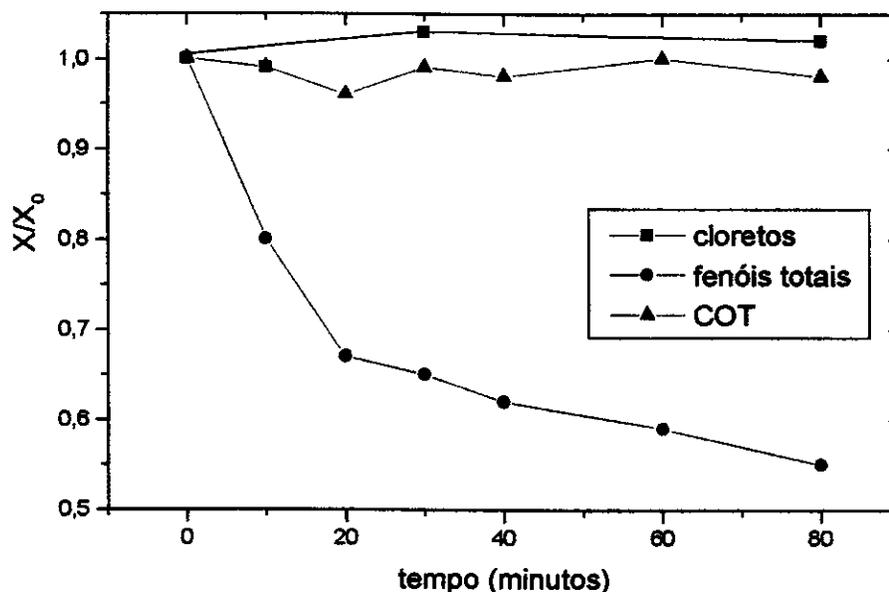


FIGURA 38: Variação na concentração de cloretos ($X_0 = 635 \text{ mg L}^{-1}$); fenóis totais ($X_0 = 7,18 \text{ mg L}^{-1}$) e COT ($X_0 = 879 \text{ mg L}^{-1}$) do efluente têxtil estudado ozonizado a pH 11.

4.6 - Tratamento biológico com o fungo *P. chrysosporium*:

Estes experimentos tiveram como finalidade dar continuidade aos experimentos iniciais (item 4.1 e 4.2), os quais objetivaram um estudo exploratório a respeito do cultivo do fungo no efluente têxtil. Nestes experimentos observou-se o crescimento do fungo no efluente, porém não foram detectadas enzimas relevantes associadas a degradação de compostos recalcitrantes presentes no efluente têxtil. A ausência destas enzimas foi atribuída, dentre outros fatores, a uma alta concentração dos íons cloreto no efluente em questão. Os íons cloreto, quando apresentam uma alta atividade em solução, inibem a atividade da enzima lignina peroxidase, devido a este íon se ligar ao mesmo sítio da enzima onde se liga o H_2O_2 , produzindo desta forma uma inativação enzimática (Cai e Tien, 1991).

Para tentar minimizar-se este problema, o primeiro passo adotado foi a busca de uma técnica eficaz para remoção destes íons da solução, sem contudo alterar significativamente as características físico-químicas da matriz. Após revisar-se a literatura uma técnica que pareceu bastante razoável foi a utilização de ultrafiltração, a qual tem aplicações principalmente no tratamento de água e em biotecnologia (Nobrega, 1995; Harsfst, 1997) e que poderia satisfazer as condições mencionadas acima. Para tanto, utilizou-se um sistema de ultrafiltração a pressão de 60 kPa com uma membrana de acetato de celulose e massa molecular de corte (do inglês “cut off”) de 100 Daltons. Este sistema não se mostrou eficiente, apresentando-se muito lento com uma rápida queda na vazão de filtração e entupimento da membrana, este fenômeno se deve ao envenenamento da membrana, que é conhecido como “fouling”, o qual se caracteriza pela acumulação de incrustantes na superfície desta (Harsfast, 1997).

Esta técnica foi então abandonada e partiu-se para a utilização de um sistema de diálise utilizando-se uma membrana com “cut-off” de 100 Daltons, que por sua vez também não apresentou resultados positivos devido ao aparecimento de uma turvação da amostra devido ao ataque químico de algum componente do efluente à membrana.

Deve-se ressaltar aqui que o efluente, nas duas técnicas utilizadas acima, foi previamente centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos para remoção de todo material particulado, que seria posteriormente resuspenso no efluente após o tratamento, caso algumas das técnicas acima tivesse funcionado a contento.

Como nenhuma das técnicas descritas acima apresentou resultados satisfatórios, buscou-se outra alternativa através da qual fosse possível contornar este problema. Uma alternativa que pareceu bastante viável foi o crescimento do fungo em meio líquido contendo suporte o que também tem efeitos positivos sobre a atividade enzimática do fungo (Haapala e Linko, 1993; Dezotti *e col.*, 1995; Nakamura *e col.*, 1997). Para tanto realizou-se experimentos onde inoculou-se a

suspensão de esporos do fungo no efluente têxtil contendo nylon (marca 3M) como suporte para imobilização do fungo.

A TABELA 17 mostra a atividade da enzima lignina peroxidase nas condições mencionados acima, juntamente com atividade de lignina peroxidase no meio sintético. Os dados foram altamente satisfatórios, sob o ponto de vista da produção da enzima diretamente no efluente, quando comparados as condições de cultura as quais foram submetidas o fungo com as condições padrões para a produção de enzima onde o meio é tamponado e especialmente formulado, com adição de vitaminas e vários elementos traços.

TABELA 17: Atividade da enzima lignina peroxidase ($U L^{-1}$) no efluente e no meio sintético após vários dias^a.

meio \ dia	7	9	10
s/ álcool veratrílico	0,0	0,0	0,0
c/ álcool veratrílico (0,6 mmol L^{-1})	0,0	53,7	47,3
meio sintético	0	40,8	143,4

^aManganês peroxidase não foi detectada nas condições experimentais contendo o efluente têxtil.

A atividade enzimática apresentou uma correlação satisfatória com a descoloração do efluente. Os dados da FIGURA 39 demonstram a descoloração das amostras com adição de álcool veratrílico (a) e sem adição de álcool veratrílico (b). Observa-se que onde houve atividade de lignina peroxidase também ocorreu uma descoloração significativa do efluente. No entanto, onde não houve tal atividade não observou-se significativas diferenças entre a amostra controle e inoculada com o

fungo, o que demonstra, mais uma vez, o importante papel desta enzima nos processos de degradação de compostos deste tipo.

Para verificar-se se as diferenças, embora pequenas, entre o controle e as amostras coletadas no quinto e no sétimo dia (FIGURA 39a) e para o quinto e décimo dia (FIGURA 39b), seriam devidas a adsorção ou a degradação, determinou-se a adsorção do efluente sobre o micélio morto. A TABELA 18 comprova que nas amostras onde não observou-se atividade enzimática a redução de cor foi devida a adsorção ao micélio morto e não a degradação.

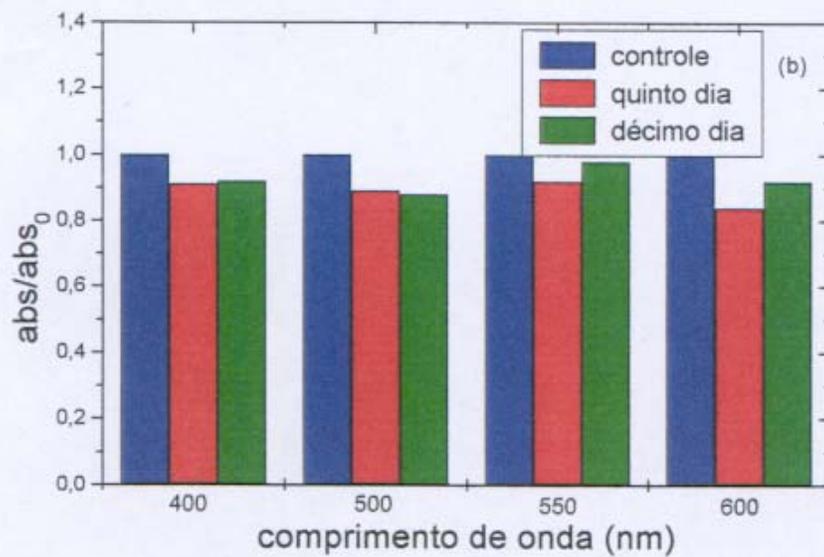
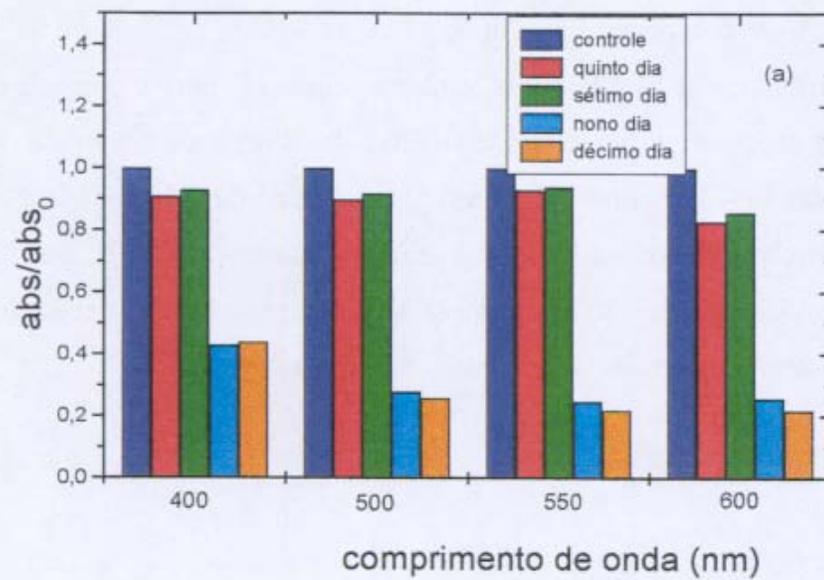


FIGURA 39: Descoloração do efluente têxtil após vários dias de tratamento com o fungo *P. chrysosporium* com ativação com álcool veratrílico (a) e sem ativação com álcool veratrílico (b).

TABELA 18: Descoloração do efluente têxtil pela adsorção no micélio morto.

amostra	Comprimento de onda (nm)			
	400	500	550	600
SM* (abs)	0,730	0,380	0,300	0,240
CM** (abs)	0,639	0,330	0,273	0,194
adsorção (%)	12	13	9	19

* efluente sem miscélio

** efluente com o miscélio morto

Os dados da FIGURA 39 demonstram claramente o importante papel que o álcool veratrílico desempenha na expressão da enzima lignina peroxidase. O álcool veratrílico, que é um metabólito secundário do fungo, tem um papel importante no ciclo catalítico desta enzima mediante a transferência de um elétron para a enzima restaurando sua forma inicial. Além disso a espécie radicalar do álcool veratrílico formado pela transferência de um elétron à enzima também pode participar da oxidação de espécies que não são atingidas (ex: impedimento estérico) pelo sítio catalítico desta enzima (Barr e Aust, 1994 e Zapanta e Tien, 1997).

Na tentativa de visualizar-se o crescimento do fungo no efluente têxtil, bem como a forma como este se suportou às fibras, submeteu-se amostras dos experimentos acima à microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A FIGURA 40 mostra o nylon, com o efluente entre as suas fibras. Já na FIGURA 41(a) pode-se observar as mudanças nas características do sólido presente entre as fibras do nylon na presença do fungo, apresentando uma maior translucidez, inclusive com várias cavidades, o que não pode ser observado na FIGURA 40. Quando tomou-se uma imagem mais aproximada (FIGURA 41b), pode-se observar com uma maior aproximação o micélio do fungo suportado ao nylon.

Uma curiosidade observada foi a presença de cristais em algumas regiões fotografadas (FIGURA 42a e 42b). A análise de metais por MEV (FIGURA 43) apresenta a presença predominante de cálcio (a presença de nióbio e alumínio são interferências do porta amostras). Estes cristais muito provavelmente são constituídos de oxalato de cálcio.

Embora a produção de cristais por fungos já seja conhecida a várias décadas, pouco ainda se sabe sobre seu verdadeiro papel. Alguns estudos sugerem que estes cristais podem estar envolvidos na regulação de cálcio e no fortalecimento de certas estruturas, atuando num mecanismo de proteção das hifas (Alexopoulos *et al*, 1996).

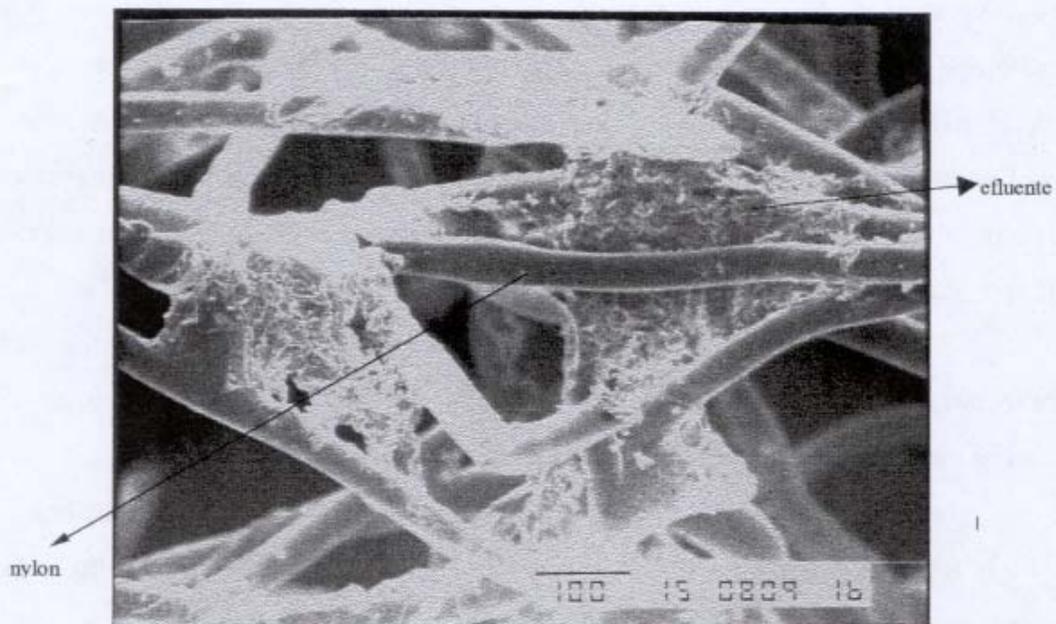


FIGURA 40: MEV (aumento de 150 x) da amostra controle do efluente têxtil.

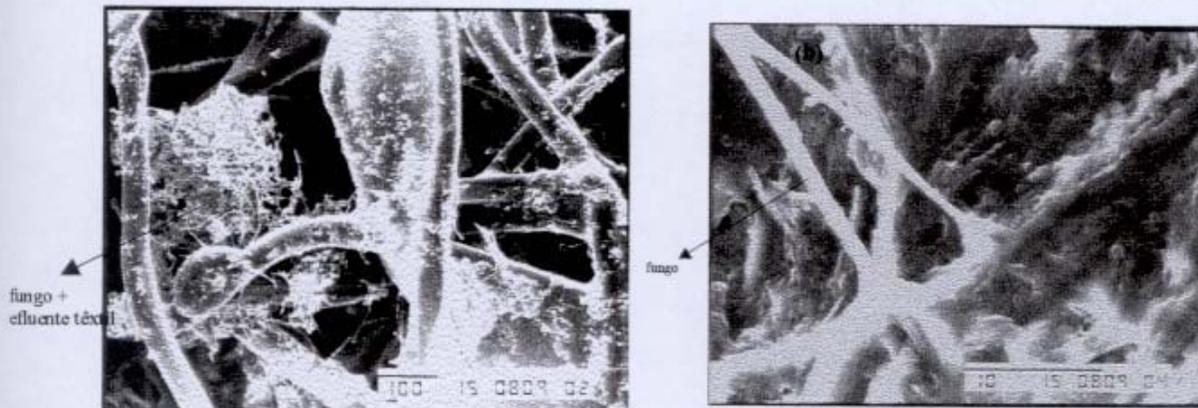


FIGURA 41: MEV com aumento de 150 x (a) e de 1500 x (b) da amostra tratada com o fungo *P. chrysosporium* com indução com álcool veratrílico.

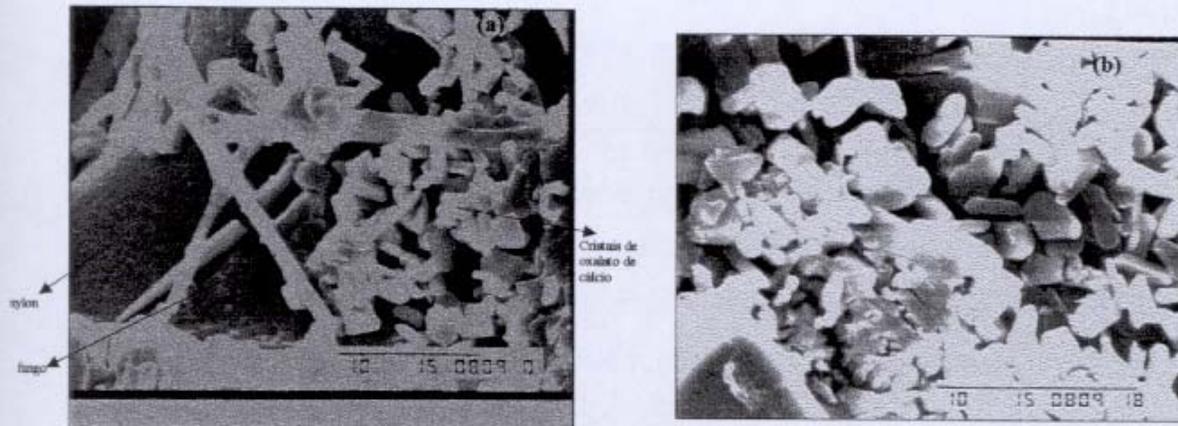


FIGURA 42: MEV com aumento de 3500 x (a) e 5000 x(b) amostra tratada com o fungo *P. chrysosporium* evidenciando a presença de cristais de oxalato de cálcio.

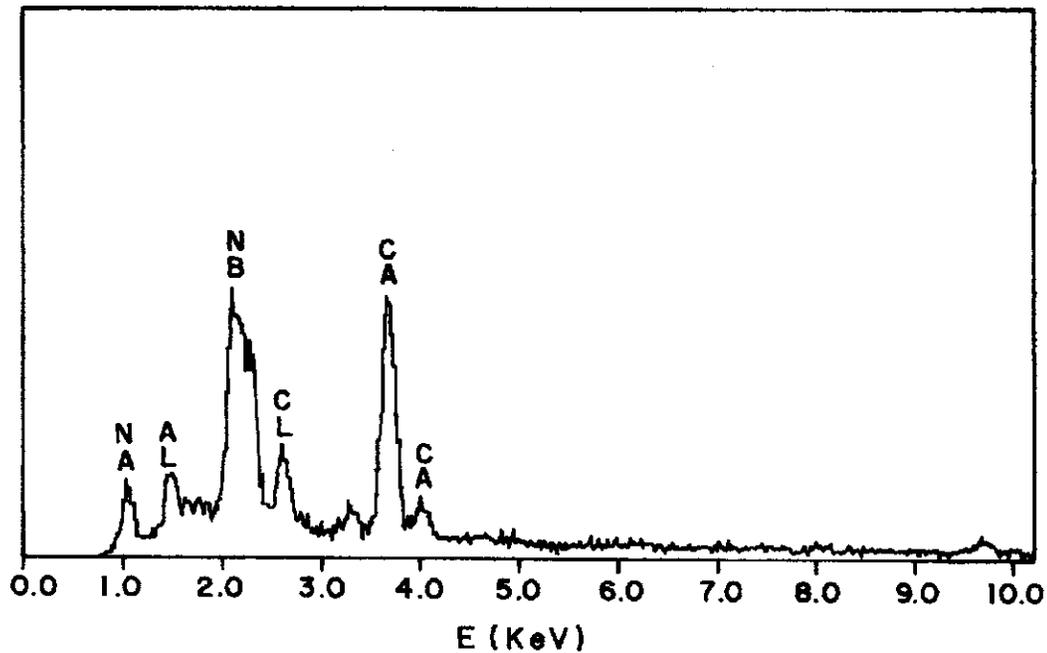


FIGURA 43: Metais determinados por MEV referente aos cristais da FIGURA 42.

4.6.1 - Determinação de metais totais por espectrometria de absorção atômica:

Este experimento teve como finalidade verificar a concentração de alguns metais neste efluente. Os metais cromo e cobre foram analisados pelo fato de estarem presentes nas formulações de alguns corantes reativos, o que pode fazer com que estes liberem estes metais em algumas condições de oxidação, aumentando assim sua biodisponibilidade e geralmente sua toxicidade (Kunz e col, 1996c). Ferro foi analisado por ser um metal geralmente abundante em efluentes industriais e manganês pelo fato de ser um metal importante na atividade da enzima manganês peroxidase. Foram realizadas determinações dos metais acima mencionados em amostras brutas e centrifugadas (TABELA 19) no intuito de verificar a distribuição destes metais entre o material particulado e dissolvido.

TABELA 19: Determinação de metais totais por espectrometria de absorção atômica no efluente têxtil.

	Bruto	Centrifugado
Cobre (mg L ⁻¹)	0,32 (±0,01)	0,29 (±0,02)
Crômio (mg L ⁻¹)	0,03 (±0,01)	0,01 (±0,01)
Ferro (mg L ⁻¹)	3,50 (±0,10)	2,95 (±0,12)
Manganês (mg L ⁻¹)	0,33 (±0,03)	0,33 (±0,01)

Pelas concentrações de metais totais apresentadas na tabela acima, pode-se observar que não existem diferenças significativas entre a fração dos metais bruto e centrifugado. Isto evidencia que a maior parte do metal presente no efluente está em solução.

O ferro presente no efluente apresenta um papel importante para o crescimento do fungo, além de ser importante na formação de grupos heme da lignina peroxidase (Nakamura *e col.*; 1997). O manganês está relacionado principalmente com a expressão da enzima manganês peroxidase, cuja atividade é dependente deste metal. A matriz estudada não apresentou atividade de manganês peroxidase, talvez por uma baixa atividade de manganês em solução ou pela presença de algum outro elemento no efluente que estaria inibindo sua atividade. Esta enzima parece não ter um papel importante na degradação de corantes têxteis, ao contrário do que acontece com a enzima lignina peroxidase (Young e Yu, 1997).

4.7 – Tratamento combinado do efluente têxtil:

Após terem sido realizados os estudos preliminares com os sistemas isolados, onde foram otimizadas as condições de tratamento, partiu-se para o tratamento combinado da matriz em questão. Para tanto a idéia foi estudar as seqüências de tratamento ozônio x biológico e biológico x ozônio para verificar-se a melhor seqüência destes sistemas na remediação do efluente.

No entanto, quando inoculou-se o fungo em uma nova amostra de efluente têxtil, não observou-se o crescimento deste na matriz. O consumo de açúcares redutores também não foi observado, que a propósito estavam numa baixa concentração nesta amostra de efluente ($\sim 45 \text{ mg L}^{-1}$) quando comparada a amostras coletadas anteriormente.

Suspeitou-se também que este efluente além de apresentar uma baixa concentração de açúcares redutores (pouca fonte de carbono para crescimento do fungo), poderia estar apresentando outra substância que estaria inibindo o crescimento do fungo no efluente. A determinação de cloretos na amostra evidenciou que este apresentava-se numa concentração muito alta nesta matriz ($\sim 1500 \text{ mg L}^{-1}$). Esta concentração inibe o crescimento do fungo bem como também sua atividade enzimática (Cai e Tien, 1991).

Para certificar-se de que o problema do não crescimento do fungo estava relacionado ao efluente e não ao fungo realizou-se o cultivo deste em meio sólido (meio ágar extrato de malte) com o efluente. A faixa de diluição foi de 0 a 100 % do efluente têxtil (TABELA 20).

TABELA 20: Composição dos meios de cultura (meio sólido) para estudo de inibição de crescimento do fungo no efluente:

Amostra	Ágar+E.Malte (%)	efluente têxtil (mL)	água dest. (mL)	Crescimento**
A	5	-	75,00	MB
B	-*	75,00	-	SC
C	5	18,75	56,25	B
D	5	37,50	37,50	R
E	5	56,25	18,75	SC
F	5	75,00	-	SC

* apenas agar 2,5 %

** MB = muito bom, B = bom, R = razoável, SC = sem crescimento.

Pode-se observar que em concentrações iguais ou maiores que 75 % do efluente este não apresentou mais crescimento do fungo no meio, mostrando que a fonte de carbono não é o único fator limitante ao crescimento deste na matriz.

Realizou-se também outra bateria de ensaios em meio líquido, com a suplementação de glicose e amido no efluente (fontes de carbono) além da adição de uma solução de vitaminas (composição descrita no item 3.5.3.2) sem contudo também obter-se sucesso no crescimento do fungo no efluente.

Outra alternativa utilizada foi o pré-crescimento do fungo no meio de cultura para produção de enzimas (item 3.5.3) e posterior retirada deste meio e inoculação da biomassa do fungo no efluente após este ter crescido e estar produzindo enzima, foi observado que o efluente inativou completamente a enzima lignina peroxidase do fungo não apresentando qualquer degradação para o efluente em questão.

Os problemas enfrentados nesta etapa do trabalho refletem a dificuldade de estudar-se sistemas reais, como efluentes onde a composição é

constantemente alterada. Este problema é particularmente importante quando se trata de efluentes têxteis onde sua composição é extremamente variável (Babuna *e col.*, 1998).

Após esta etapa do trabalho, em que se empreendeu-se um tempo considerável sem obter-se resultados satisfatórios, coletou-se uma nova amostra de efluente têxtil.

O efluente foi então inoculado em meio sólido contendo o fungo, para verificar-se seu crescimento nestas condições. A concentração de cloretos também foi determinada no efluente obtendo-se concentrações em torno de 900 mg L⁻¹, concentração esta bastante abaixo da encontrada no efluente que havia sido coletado anteriormente.

Tendo esta amostra do efluente apresentado condições mais favoráveis ao crescimento do fungo deu-se início aos estudos de combinação no tratamento do efluente com o ozônio e com o fungo *P. chrysosporium*.

4.7.1 – Sequência ozônio-*P. chrysosporium*:

4.7.1.1 – Pré-tratamento com ozônio:

Para o pré-tratamento do efluente têxtil com ozônio utilizou-se as condições que já haviam sido previamente otimizadas, conforme apresentado no item 4.5.

A FIGURA 44 apresenta a descoloração da matriz após vários tempos de ozonização analisadas a quatro comprimentos de onda. Pode-se observar uma rápida descoloração do efluente nos primeiros 15 minutos atingindo uma descoloração de aproximadamente 50 % após 60 minutos de tratamento.

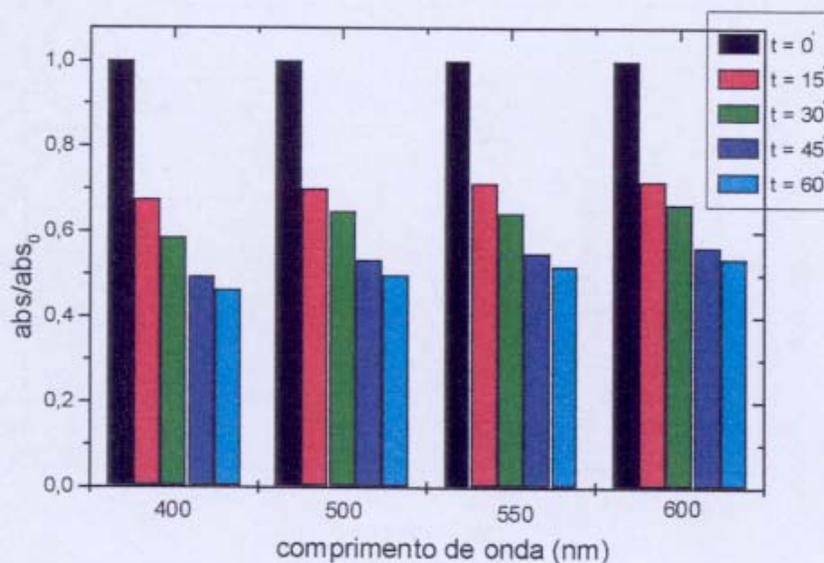


FIGURA 44: Descoloração do efluente têxtil ozonizado a pH 11.

A diminuição da massa molecular do efluente foi significativa com o tratamento com o ozônio (FIGURA 45) após 60 minutos de tratamento. Podemos observar também que após 120 minutos praticamente não são observadas mudanças na distribuição da massa molecular da matriz, demonstrando que o tratamento pode ser interrompido após 60 minutos.

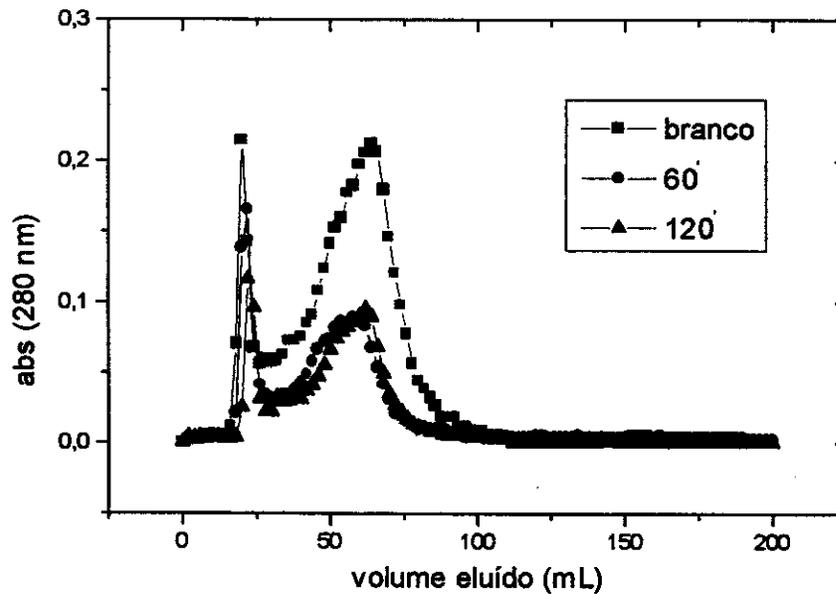


FIGURA 45: Distribuição da massa molecular do efluente têxtil sem ozonizar e ozonizado após 60 e 120 minutos (condições experimentais conforme descritas no item 3.7.9)

Através da FIGURA 46, que mostra o consumo de ozônio durante o tratamento, pode-se observar que após 60 minutos praticamente não há consumo de ozônio o que vai ao encontro com os dados apresentados na FIGURA 45.

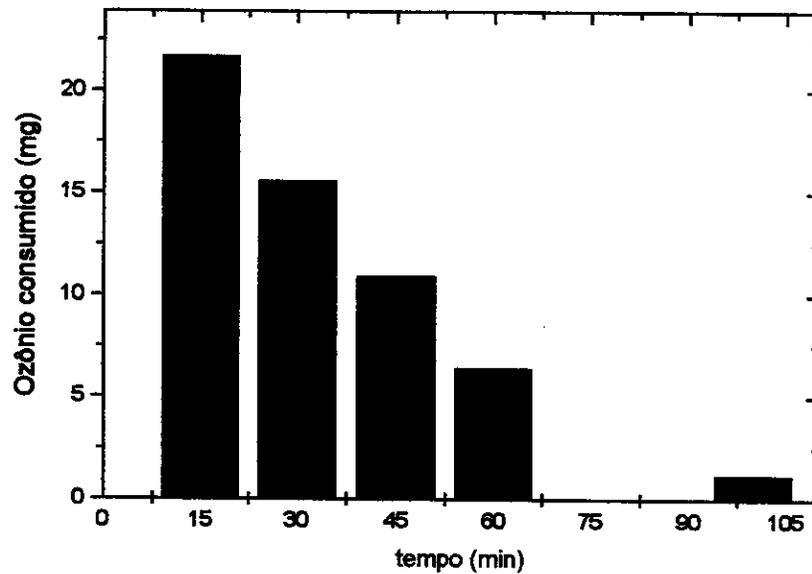


FIGURA 46: Ozônio consumido nos intervalos de tempo de ozonização.

A redução de fenóis totais na amostra ozonizada (FIGURA 47) foi de aproximadamente 50 % após 60 minutos de ozonização. A degradação desta classe de compostos pelo ozônio está reportada na literatura e demonstra a eficiência deste gás no tratamento destes compostos (Rice, 1981; Freire *e col*, 1998).

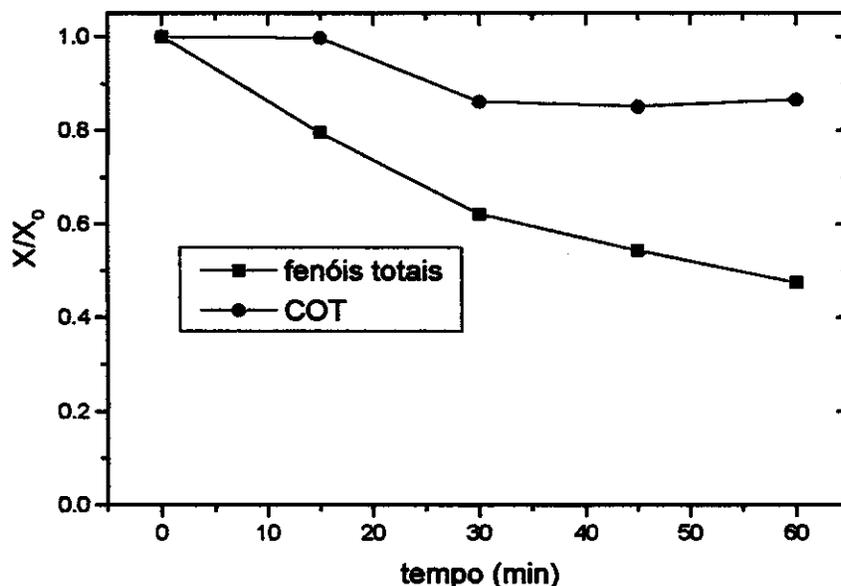


FIGURA 47: Diminuição de fenóis totais ($X_0 = 16 \text{ mg L}^{-1}$) e COT ($X_0 = 770,50 \text{ mg L}^{-1}$) do efluente têxtil após vários tempos de ozonização.

Embora tenha-se observado uma redução apreciável da massa molecular do efluente (FIGURA 45), esta redução não foi acompanhada da diminuição, na mesma ordem de grandeza, do carbono orgânico total (FIGURA 47). Isto demonstra que a matéria orgânica do efluente foi degradada, no entanto uma grande mineralização (oxidação completa) da matriz não foi alcançada.

Os resultados do ensaio de toxicidade frente a alga *S. subspicatus* das amostras pré e pós-ozonizadas são apresentados na FIGURA 48. Pode-se observar que o efluente tem sua toxicidade aumentada com a ozonização, indicando que embora a degradação venha sendo alcançada intermediários de degradação mais tóxicos estão sendo formados em relação aos compostos precursores da matriz.

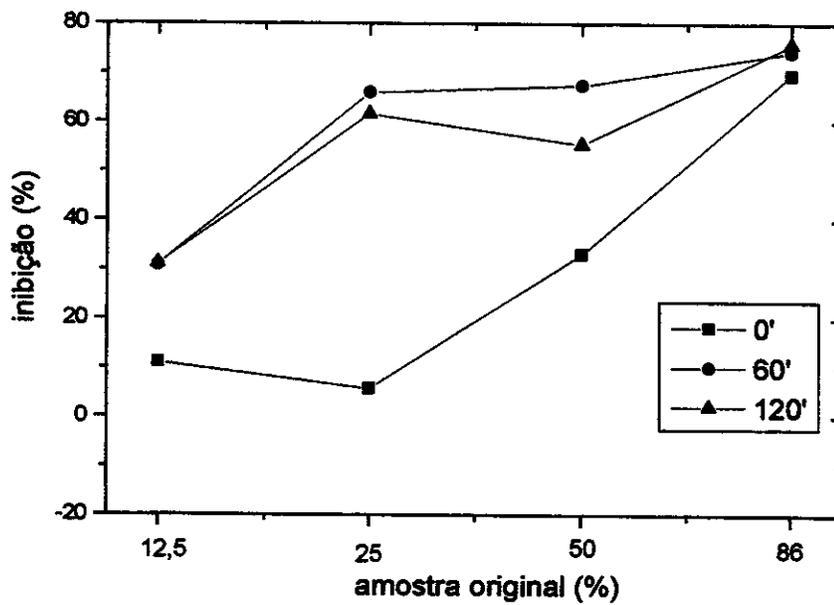


FIGURA 48: Toxicidade do efluente têxtil, sem ozonizar e ozonizado após 60 e 120 minutos, frente a alga *S. subspicatus*.

A toxicidade do efluente pré e pós-ozonizado frente a bactéria *E. coli* (TABELA 20) vai ao encontro com os dados obtidos para toxicidade com a alga *S. subspicatus*, observando-se também um aumento da toxicidade com a ozonização do efluente.

TABELA 20: Toxicidade do efluente têxtil, sem ozonizar e ozonizado após 60 e 120 minutos, frente a bactéria *E. coli*.

tempo (minutos)	inibição (%)[*]
0	10,9
60	61,5
120	45,0

^{*} efluente têxtil a 1,5 % após 120 minutos.

4.7.1.2 – Pós-tratamento com o fungo *P. chrysosporium*:

Para estes experimentos utilizou-se o efluente têxtil pré-ozonizado (item 4.7.1.1). Este estudo teve como finalidade avaliar o efeito do tratamento prévio com ozônio na degradação da matriz em questão.

A FIGURA 49 mostra a variação da cor no efluente têxtil após vários dias de tratamento. Pode-se observar que a uma descoloração do efluente não é verificada no tratamento com o fungo, sendo inclusive detectada um pequeno aumento na cor do efluente.

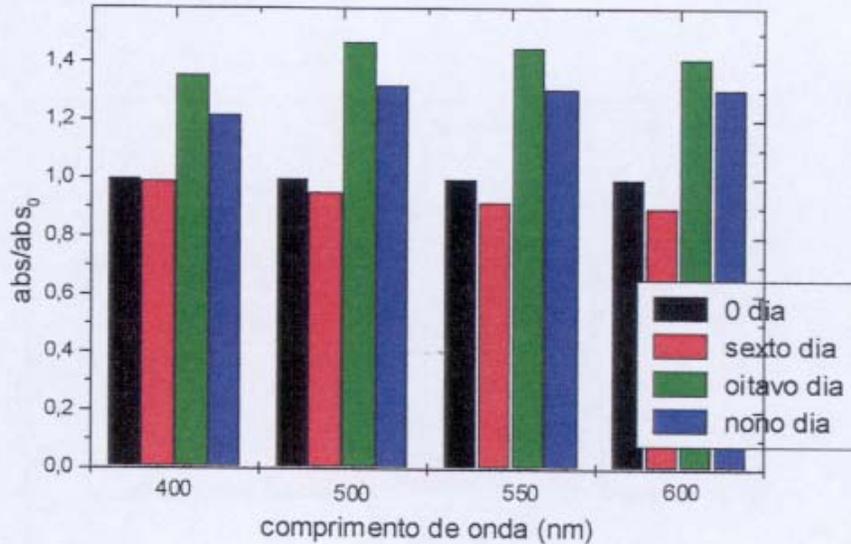


FIGURA 49: Variação na cor do efluente têxtil (pré-ozonizado) após vários dias de tratamento com fungo *P. chrysosporium*

Uma pequena atividade de lignina peroxidase (TABELA 21) foi observada no efluente após a adição (sexto dia) de álcool veratrílico e Tween-80, no entanto isto não se refletiu na descoloração da matriz. A atividade de lacase, e manganês peroxidase não foram observadas nas condições de ensaio.

TABELA 21: Atividade de lignina peroxidase no efluente têxtil (pré-ozonizado), após nove dias de tratamento com o fungo *P. chrysosporium*.

dia	6	8	9
Ativ. LiP (U L ⁻¹)	0	29,4	17,7

O efluente, produto da pré-ozonizado, também não apresentou redução de massa molecular após o tratamento com o fungo (FIGURA 50). O aparecimento

de um terceiro pico se deve ao Tween-80 que é adicionado ao meio após o sexto dia de tratamento.

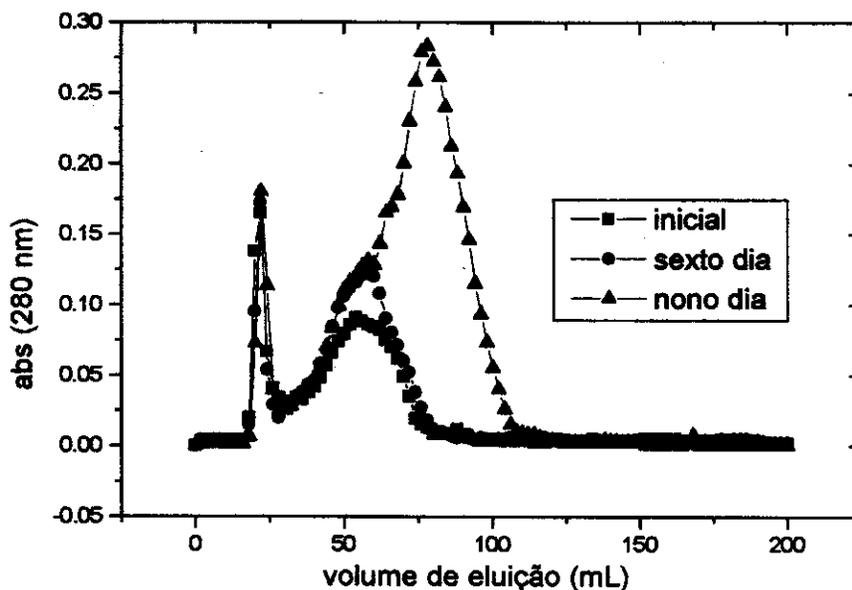


FIGURA 50: Variação da massa molecular no efluente têxtil pré-ozonizado e tratado com o fungo *P. chrysosporium* (condições experimentais conforme descritas no item 3.7.9).

Aparentemente o tratamento do efluente pré-ozonizado com o fungo não apresenta nenhum efeito significativo na degradação da matriz. No entanto a toxicidade do efluente é reduzida tanto frente a alga *S. subspicatus* (FIGURA 51) quanto frente a bactéria *E. coli* (TABELA 22).

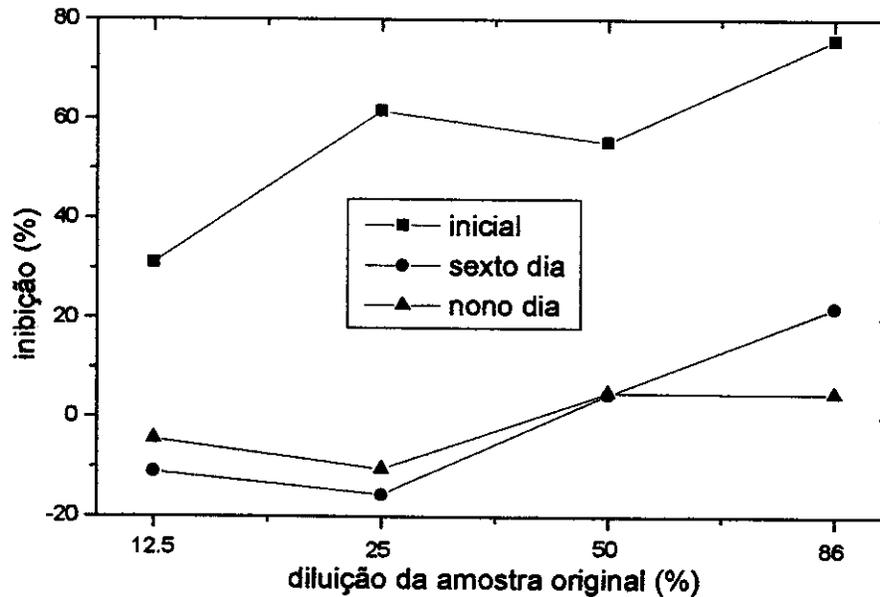


FIGURA 51: Toxicidade do efluente têxtil (pré-ozonizado) antes e após o tratamento com o fungo *P. chrysosporium*, frente a alga *S. subspicatus*.

TABELA 22: Toxicidade do efluente têxtil (pré-ozonizado), antes e após tratamento com o fungo *P. chrysosporium*, frente a bactéria *E. coli*.

Tempo de tratamento	inibição (%) [*]
inicial	42,36
sexto dia	sem inibição
nono dia	sem inibição

^{*} efluente têxtil a 1,5 % após 120 minutos.

4.7.2 – Sequência *P. chrysosporium* – ozônio:

4.7.2.1 – Pré-tratamento com o fungo *P. chrysosporium*:

A FIGURA 52 apresenta a descoloração do efluente após vários dias de tratamento. A descoloração apresentada até o sexto dia deve-se principalmente a

adsorção (conforme já discutido anteriormente). A descoloração que ocorre entre o sexto e o nono dia pode estar relacionada a atividade da enzima lignina peroxidase no meio (TABELA 23) que embora apresente baixa atividade tem papel importante na descoloração da matriz.

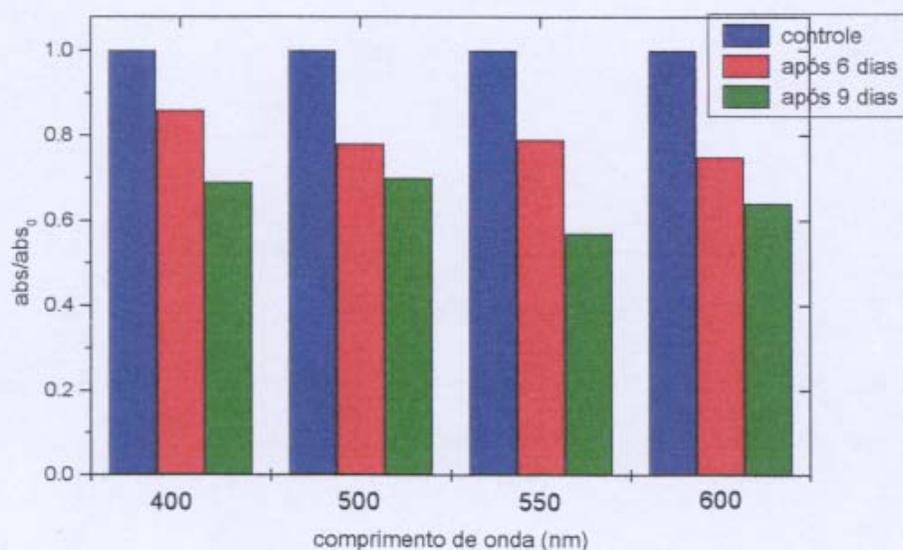


FIGURA 52: Variação na cor do efluente têxtil após vários dias de tratamento com o fungo *P.chrysosporium*.

TABELA 23: Atividade de lignina peroxidase no efluente têxtil após nove dias de tratamento como o fungo *P. chrysosporium*.

dia	6	8	9
ativ. de LiP (U L ⁻¹)	0	3,76	8,59

A distribuição da massa molecular do efluente (FIGURA 53) apresentou alterações, principalmente após o sexto dia, do pico de alta massa molecular. O

terceiro pico que aparece no nono dia de tratamento refere-se ao Tween-80, adicionado ao meio após o sexto dia.

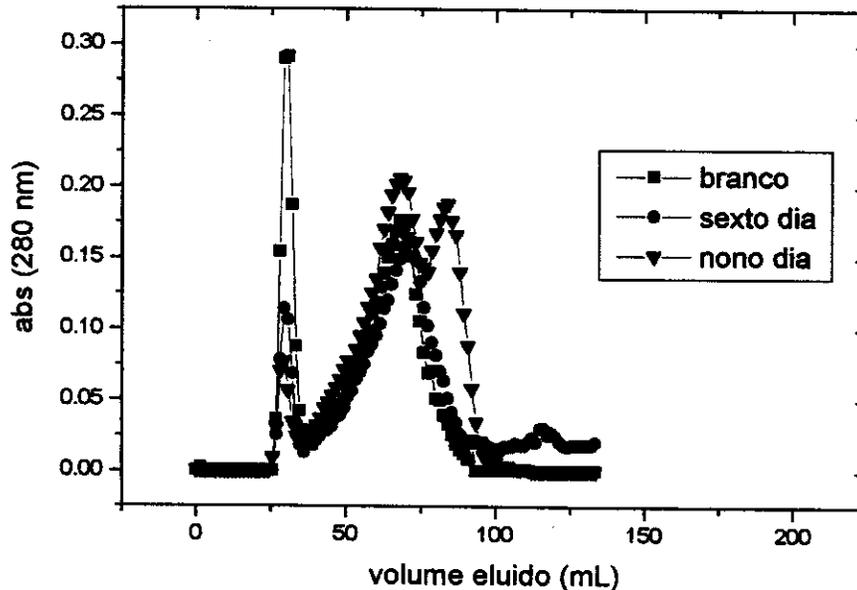


FIGURA 53: Distribuição da massa molecular do efluente têxtil quando submetido ao tratamento com o fungo *P. chrysosporium* (condições experimentais conforme descritas no item 3.7.9)

Embora a diminuição na massa molecular do efluente não tenha sido tão significativa quanto no pré-tratamento com ozônio (FIGURA 45), o tratamento com o fungo causou uma redução na toxicidade do efluente (FIGURA 54) frente a alga *S. subspicatus*.

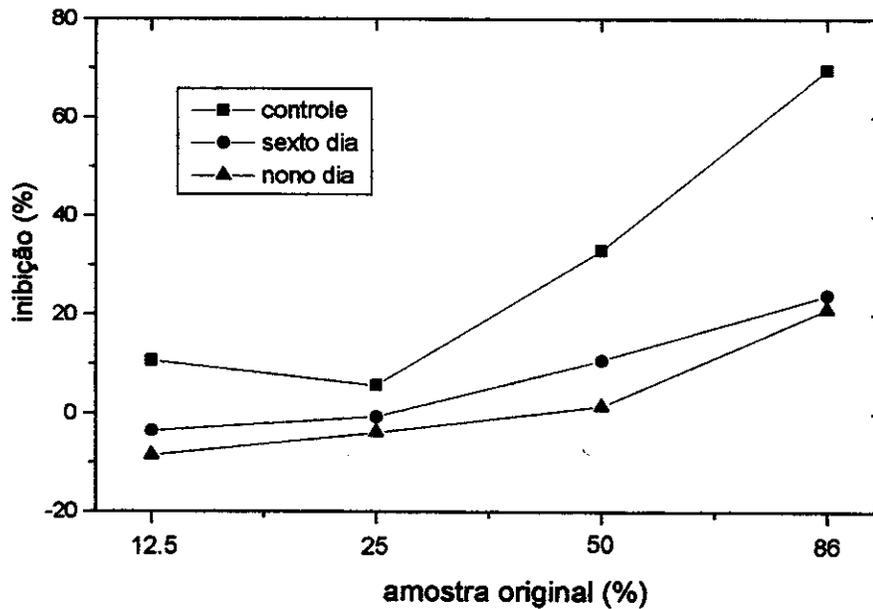


FIGURA 54: Toxicidade do efluente têxtil, antes e após tratamento com o fungo *P. chrysosporium*, frente a alga *S. subspicatus*

4.7.2.2. – Pós-tratamento com ozônio:

O pós-tratamento com ozônio também apresentou uma redução de cor de aproximadamente 40 % após 80 minutos de ozonização (FIGURA 55). Este resultado é satisfatório se for considerado que no pré-tratamento com o fungo já havia ocorrido uma descoloração entre 30 e 40 % (FIGURA 52).

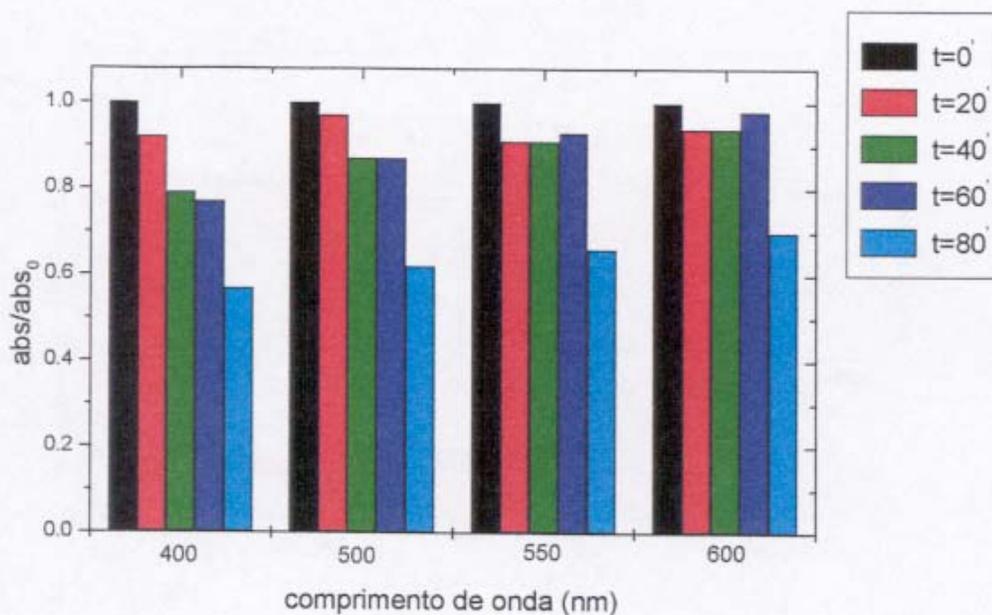


FIGURA 55: Variação na cor do efluente têxtil (pré-tratado com *P. chrysosporium*) durante o tratamento com ozônio.

A distribuição da massa molecular do efluente (FIGURA 56) também apresentou uma pequena diminuição dos picos com a ozonização, no entanto mais uma vez a redução de carbono orgânico total (FIGURA 57) foi pouco significativa no tratamento com ozônio, embora tenha sido possível observar uma redução de fenóis de cerca de 50%.

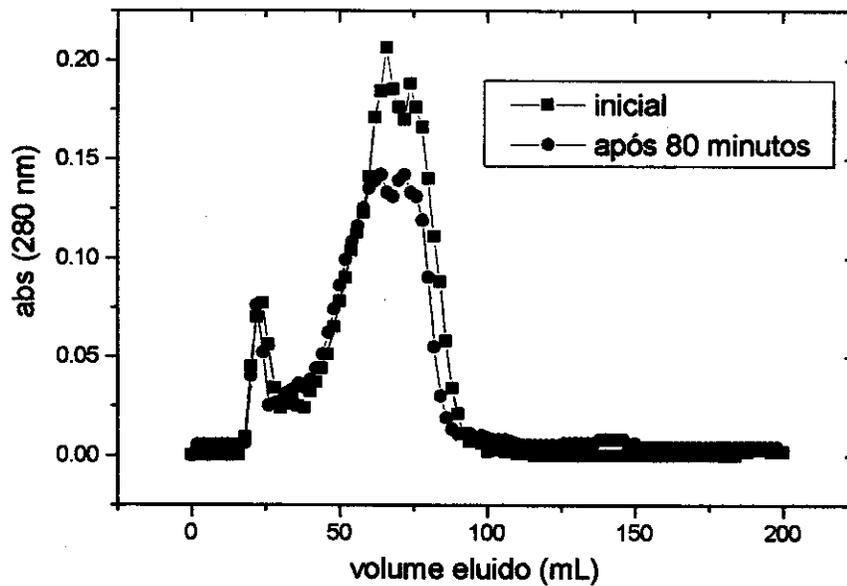


FIGURA 56: Distribuição da massa molecular do efluente têxtil (pré-tratado com o fungo *P. chrysosporium*) antes e após tratamento com ozônio (condições experimentais conforme descritas no item 3.7.9).

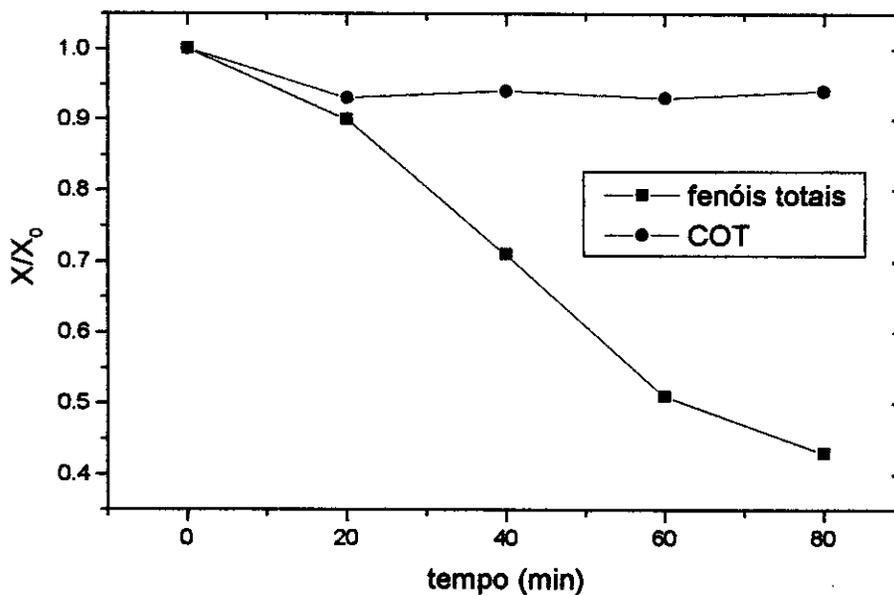


FIGURA 57: Diminuição de fenóis totais ($12,37 \text{ mg L}^{-1}$) e COT ($X_0 = 514,60 \text{ mg L}^{-1}$) durante o tratamento com ozônio.

O consumo de ozônio para a sequência *P.chrysosporium*-ozônio (FIGURA 58) também foi significativamente menor quando comparado a sequência ozônio-*P. chrysosporium* (FIGURA 46), o que é muito interessante quando for levado em consideração os custos do processo.

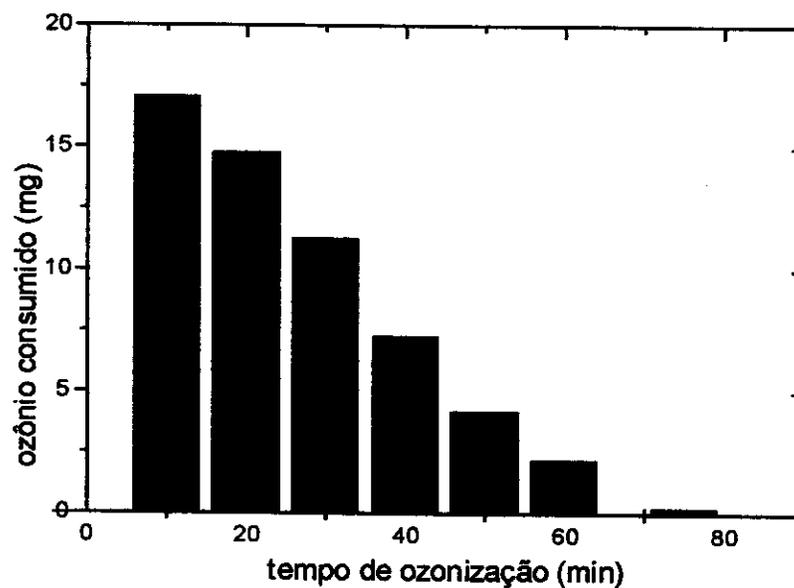


FIGURA 58: Ozônio consumido nos intervalos de tempo de ozonização.

A toxicidade após a ozonização foi reduzida tanto frente a alga *S. subspicatus* (FIGURA 59), quanto frente a bactéria *E. coli* (TABELA 24) o que é altamente positivo, pois durante esta sequência de tratamento não houve um aumento da toxicidade da matriz como a observada na sequência anterior em que o ozônio causou um incremento na toxicidade do efluente.

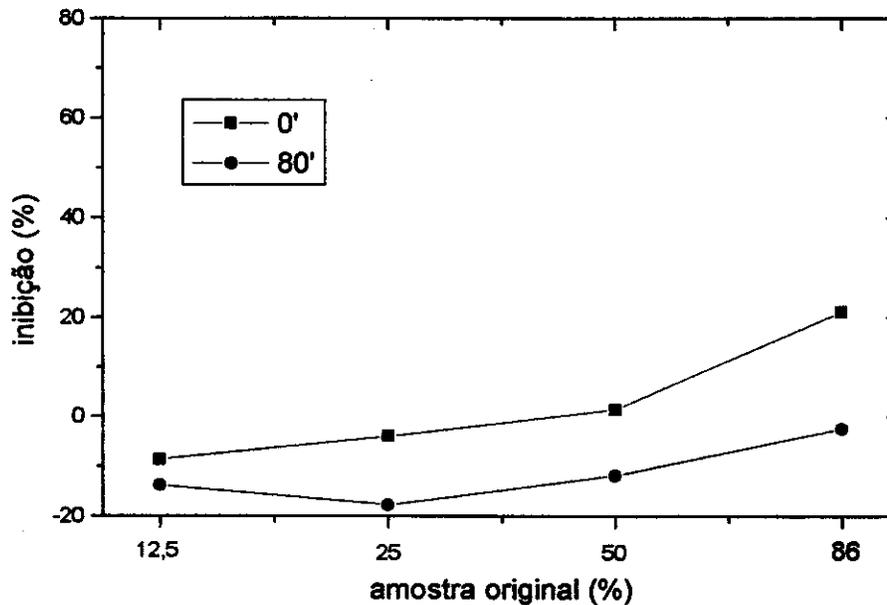


FIGURA 59: Toxicidade do efluente têxtil (pré-tratado com o fungo *P. chrysosporium*).

TABELA 24: Toxicidade do efluente têxtil (pré-tratado com o fungo *P. chrysosporium*) frente a bactéria *E. coli*.

Tempo de tratamento (minutos)	inibição (%) [*]
0	38,54
60	sem inibição

^{*} efluente têxtil a 1,5 % após 120 minutos.

Pelos dados obtidos das sequências ozônio-*P. chrysosporium* e *P. chrysosporium*-ozônio pode-se concluir que a segunda sequência mostra-se mais adequada, principalmente, por ser mais efetiva na descoloração do efluente, consumo de ozônio e toxicidade frente aos organismos teste utilizados. Este aumento da toxicidade com ozônio na primeira sequência pode estar afetando a eficiência do pós-tratamento com o fungo embora este consiga reduzir a toxicidade do efluente após tratamento com ozônio.

A TABELA 25 apresenta um resumo de alguns resultados experimentais obtidos para as duas seqüências de tratamento estudadas ilustrando o exposto acima.

TABELA 25: Comparação entre as seqüências de tratamento do efluente têxtil estudadas.

	O₃ – <i>P. chrysosporium</i>		<i>P. chrysosporium</i> – O₃	
	O₃	<i>P. chrysosp.</i>	<i>P. chrysosp.</i>	O₃
descoloração	~ 50 %	s/ descolor.	~ 30 %	~ 40 %
dist. massa molecular	significativa redução princ. p/ fração de baixa massa molecular	redução pouco significativa	redução da fração de alta massa molecular	redução da fração de baixa massa molecular
toxicidade	aumento	redução	redução	redução

5 – CONCLUSÕES

Os estudos preliminares de degradação dos corantes com ozônio mostraram resultados satisfatórios que permitem afirmar que sua cinética de descoloração é muito rápida. A ozonização não causa um aumento da toxicidade dos intermediários formados, nas concentrações estudadas para os corantes azo (R-5) e antraquinona (R-19). No entanto, quando o corante apresenta metais quelados (R-21), estes metais são liberados para o meio da solução aumentando sensivelmente a toxicidade do meio.

Na degradação do efluente têxtil com ozônio o pH não exerceu um efeito significativo sobre a degradação. O ozônio foi eficaz na descoloração e redução de fenóis totais da matriz, no entanto demonstrou ser ineficaz na redução de carbono orgânico total.

Para o fungo *P. chrysosporium* a descoloração do efluente mostrou ser dependente da enzima lignina peroxidase (com exceção do efluente que é pré-tratado com ozônio), apresentando uma significativa diminuição da cor nos casos em que a enzima apresentou atividade. A atividade enzimática no efluente foi altamente satisfatória quando comparada a condições padrões de cultura para produção da enzima. No entanto, sua atividade é afetada por altas concentrações de íons cloreto no meio que pode inibir a atividade da enzima.

As sequências de tratamento estudadas, ozônio-*P. chrysosporium* e *P. chrysosporium*-ozônio, nos permitem concluir que a segunda sequência mostra-se mais adequada, principalmente por ser mais efetiva na descoloração do efluente, diminuir o consumo de ozônio e também a toxicidade frente aos organismos teste utilizados. Este aumento da toxicidade com ozônio na primeira sequência pode estar afetando a eficiência do pós-tratamento com o fungo embora este consiga reduzir a toxicidade do efluente após tratamento com ozônio.

6 – PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS:

Os resultados obtidos neste trabalho deixam em aberto alguns pontos que podem ser melhor elucidados:

- Estudos envolvendo a concentração limite de cloreto que inibe o crescimento do fungo e sua melhor correlação com a atividade enzimática.
- Caracterização química dos intermediários formados, através de cromatografia líquida-espectrometria de massa, durante a ozonização do efluente tentando correlacioná-los com o aumento da toxicidade no efluente.
- Estudos visando aumentar a eficiência do processo biológico, por exemplo através da passagem do efluente por vários reatores em sequência contendo o fungo.
- Operação do sistema em escala semi-piloto já levando-se em conta os custos do processo.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Adams, C.D., Fusco, W., Kanzelmeyer, T.J. (1995). Ozone, hydrogen peroxide/ozone and UV/ozone treatment of chromium and copper-complex dyes: Decolorization and metal release. *Ozone Sci. Eng.* **17**: 149 - 162.
- Alcantara, M.R.; Daltin, D. (1996). A química do processamento têxtil. *Química Nova* **19**: 320 –330.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. (1996) *Introductory Mycology*. Fourth Edition. John Wiley & Sons, inc. Pg 26 - 60
- Altinkas, H.; Dökmeci, S.; Baristiran, A. (1995). Treability study of wastewater from textile industry. *Environ. Technol.* **16**: 389 - 394
- Ander, P.; Marzullo, L. (1997). Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidases as related to lignin degradation. *J. Biotechnol.* **53**: 115 – 131.
- APHA(1989). Standard methods for examination of water and wastewater, 17th ed. Amer, Publ. Health Ass. N° 5220 p. 5.8 - 5.10
- APHA (1992). Standard methods for examination of water and wastewater, 18th edition. Ed. Amer. Publ. Health Ass. N° 5550 p. 5.41 - 5.42.
- APHA (1988). *Metodos normalizados para el analisis de aguas potables y residuales (II parte)*. New York, Amer. Publ. Health Ass. p. 4-183 a 4-187.
- Babuna, F.G.; Orhon, D.; Çokgör, Insel, G.; Yaprakli, B. (1998). Modelling of activated sludge for textile wastewaters. *Proc. IAWQ 19th Bien. Int. Conf.* Vol. **8**: 9 – 16.
- Banat, I.M.; Nigam, P.; Songh, D.; Marchant, R. (1996). Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: A review. *Biores. Technol.* **58**: 217 – 227.
- Bahorsky, M.S. (1997). Textiles. *Wat. Environ. Res.* **69**: 658 - 664.
- Bahorsky, M.S.; Bryant, D.H. (1995). Textiles. *Wat. Environ. Res.* **67**: 544 - 548.
- Barr, D.P.; Aust, S.D.; (1994). Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutions. *Environ. Sci. Technol.* **28**: 79A – 87A.
- Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R. E. (1995). Planejamento e otimização de experimentos. *Editores da Unicamp, Campinas SP*.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brown, M.A.; DeVito, S.C. (1993) Predicting azo dye toxicity. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **23**: 249 – 324.
- Cai, D.; Tien, M. (1991). Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, evidence for an acidic ionization controlling activity. *J. Biol. Chem.* **266** (22): 14464 - 14469.
- Calvosa, L.; Monteverdi, A.; Rindone, B.; Riva, G. (1991). Ozone oxidation of compounds resistant to biological degradation. *Wat. Res.* **25**: 985 – 993.
- Chamarro, E.; Marco, A.; Prado, J.; Esplugas, S. (1996). Tratamiento de aguas y aguas residuales mediante utilización de procesos de oxidación avanzada. *Quim. Ind.* **1/2**: 28-32.
- Chiou, C.; Mariñas, B.J.; Adams, J.Q. (1995). Modified indigo method for gaseous and aqueous ozone analyses. *Ozone Scie. & Eng.* **17**: 329 - 344.
- Chung, K-T; Cerniglia, C.E. (1992). Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships. *Mut. Res.* **277**: 201 – 220.
- Churchley, J. H. (1994). Removal of dyewaste colour from sewage effluent - The use of a full scale ozone plant. *Wat. Sci Technol.* **30**: 275-284.
- Conchon, J. A. (1995). Indústria têxtil e o meio ambiente. *Calquim*: 12 – 16
- Copper, P. ; Hinchcliffe, C.; Churchley, J. (1994). Treatment methods for textile trade effluents at sewage works and at source. *Proc. International Seminary - Textile industries Trade Effluents*. Rochdale february.
- Costa, R.H.R.; Martins, G.B.H. (1998). Tecnologias Limpas – Modelo conceitual aplicado à indústria têxtil. *Anais do II Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental. 26 a 28 de outubro de 1998. Porto Alegre – RS.*
- Deurzen, M.P.J.V.; Rantwijk, F.V; Sheldon, R.A. (1997). Selective oxidations catalyzed by peroxidases. *Tetrahedron* **53**: 13183 – 13220.

- Dezotti, M.; Innocentini-Mei, L.H.; Duran, N. (1995). Silica immobilized enzyme catalyzed removal of chlorolignins from eucalyptus kraft effluent. *J. Biotechnol.* **43**: 161 - 167.
- Diezel, W.; Kopperschläger, G.; Hofmann, E. (1972). An improved procedure for protein staining in coomassie brilliant blue. *Anal. Biochem.* **48**: 617 - 620.
- Durán, N. Esposito, E (1997). Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. 269 – 292 em “Microbiologia Ambiental” (Melo, I.S.; Azevedo, J.L. – Embrapa – CNPMA; Jaguariuna – SP)
- Durán, N.; Sato, L.M.; Jardim, L.S.A.; Moraes, S.G.; De Conti, R. (1998). Nuevo metodo de synthesis de N-Indol-Glicosidos con actividad Antimicrobiana. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **43**: 091-095.
- Encyclopedia of chemical technology. Vol. 8 (third Ed.) Ed. John Wiley & Sons. Pg 160 – 171; 374 – 392 (1990).
- Esplugas, S. (1995). Aplicaciones del ozono en la depuracion y potabilizacion de aguas. Curso técnico. 8, 9, 10 de noviembre. LRR – Universidad de Concepcion – Chile.
- Esplugas, S.; Marco, A.; Saum, G. (1996). How and why combine chemical and biological processes for water treatment. Proc. International Conference - Oxidation Technologies for Water and Wastewater treatment. May 12 - 15 (1996). Clausthaler Umwelttechnik-Institut GmbH, German.
- Esposito, E. (1992). Processos envolvidos no tratamento biológico de efluentes: aplicação em um bioreator de leito recheado. *Dissertação de mestrado*, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP.
- Fadini, P.S. (1995). Determinação de carbono orgânico dissolvido em amostras naturais através de análise por injeção em fluxo. *Dissertação de mestrado*. Faculdade de Engenharia Civil. Universidade Estadual de Campinas.
- Ferrer, I; Dezotti, M.; Duran, N. (1991). Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. *Biotechnol. Lett.* **11**: 577 – 582.

- Freire, R.S.; Kunz, A.; Reyes, J.; Durán, N. (1998). Tratamento de efluente de indústria papelreira com ozônio: aspectos químicos e toxicológicos. Livro de resumos do *XXXVIII Congresso Brasileiro de Química 21 a 24 de setembro de 1998*. São Luis – MA.
- Furtado, M. R. (1996). Têxtil, beneficiamento lucra com alta tecnologia. *Quím. Der. setembro*: 10 - 17.
- Furtado, M.R. (1997). Efluentes: indústrias investem em técnicas de ponta. *Quim. Der. Março*: 10 - 25.
- Gähr, F.; Hermantz, F.; Oppermann, W. (1994). Ozonation - an important technique to comply with new German laws for textile wastewater treatment. *Wat. Sci. Technol.* **30**: 255 - 263.
- Glaze, W.H. (1987). Drinking-water treatment with ozone. *Environ. Sci. Technol.* **21**: 224 – 230.
- Guimarães, J.R. (1990). Determinação do dióxido de carbono por FLA. Aplicação em testes de toxicidade. *Dissertação de mestrado*, Instituto de Química, UNICAMP.
- Haapala, R.; Linko, S. (1993). Production of *P. chrysosporium* lignin peroxidase under various culture conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 494 - 498.
- Haimann, R.A. (1995). Fungal technologies for the treatment of hazardous waste. *Environ. Progr.* **14**: 201 - 203.
- Hatch (1991). Water analysis handbook, method 8051.
- Harfst, W. F. (1997). Tipos de membranas para tratamento de água. *Quim. Der. Março*: 49 – 52.
- Hoigné, J.; Bader, H. (1976). The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. *Wat. Res.* **10**: 377 - 386.
- Hostachy, J.-C.; Lenon, G.; Pisciocchio, J.-L.; Coste, C.; Legay, C. (1997). Reduction of pulp and paper mill pollution by ozone treatment. *Wat. Sci. Technol.* **35**: 261 - 268.

- ISO 8692 (1989). Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- Jacangelo, J.G. ; Patania, N.L.; Reagan, K.M.; Aieta, E.M.; Krasner, S.W.; McGuire, M.J. (1989). Ozonation: Assessing its role in the formation and control of disinfection by-products. *J. AWWA* august: 74 - 84.
- Knapp, J.S.; Newby, P.S.; Reece, L.P. (1995). Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 664 - 668.
- Kirby, N.; Mullan, G.; Marchant, R. (1995). Decolourization of an artificial textile effluent by *P. Chrysosporium*. *Biotech. Let.* 17: 761 - 764.
- Kuczkowski, R. L. (1992). The structure and mechanism of formation of ozonides. *Chem. Soc. Rev.* 92 :79 - 83.
- Kunz, A. (1996). Competição entre complexação e adsorção de cobre em esgoto sanitário. *Dissertação de mestrado*. Instituto de química. Universidade Estadual de Campinas.
- Kunz, A. (1997). O que é ISO 14000. Do que se trata. *Tecnia* 2: 137 – 141.
- Kunz, A.; Freire, R.S.; Rohwedder, J.J.R; Duran, N.; Mansilla, H.; Rodriguez, J. (1999). Construção e otimização de um sistema para produção e aplicação de ozônio em escala de laboratório. *Química Nova* 22: 425 – 428.
- Kunz, A.; Mansilla, H. Freer, J. Baeza, J.; Duran, N. (1997a). Chemical treatment (ozone) of dyes present in textile effluents: toxicity of intermediate formed in the process. *Proc. of 5th Braz. Symp. on the Chem. Lignins Other Wood Compon.*. 31 de agosto a 05 de setembro. Curitiba. Vol. VI. 92 – 98.
- Kunz, A.; Mansilla, H. Freer, J. Baeza, J.; Duran, N. (1997c). A influência do pH na degradação do corante têxtil preto reativo-5 utilizando ozônio. *Livro de Resumos do XXXVII Congresso Brasileiro de Química, Natal-RN 28/09 a 03/10*: 121
- Kunz, A.; Reyes, J.; Esposito, E.; Duran, N. (1997b). Produção de lignina peroxidase em efluente têxtil. Livro de resumos do 3^o Seminário

Internacional de Tecnologia Enzimática, 29 a 31 de outubro de 1997. Rio de Janeiro – RJ.

- Kunz, A.; Mansilla, H. Freer, J. Baeza, J.; Duran, N. (1997). A influência do pH na degradação do corante têxtil preto reativo-5 utilizando ozônio. *Livro de Resumos do XXXVII Congresso Brasileiro de Química, Natal-RN 28/09 a 03/10*: 121
- Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; Morgan, M.A. e Gold, M.H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from lignolytic cultures of *P. chrysosporium*. *FEBS J.* **169**: 247 - 250.
- Laat, J.L.; Bawa, M.; Dore, M. Ozonation by-products of glucose in water. *Environ. Technol.* **16**: 1035 - 1048.
- Langlais, B.; Legube, B.; Beuffe, H. Doré, M. (1992). Study of the nature of the by-products formed and risks of toxicity when disinfecting a secondary effluent with ozone. *Wat. Sci Technol.* **25**: 135 - 143.
- Liakou, S.; Liberatos, G.. Ozonation of azo dyes. Proceeding of International Conference - Oxidation Technologies for Water and Wastewater treatment. May 12 - 15 (1996). Clausthaler Umwelttechnik-Institut GmbH, German.
- Lin, S.H.; Yeh, K.L. (1993). Looking to treat wastewater? Try ozone. *Chem. Eng. May*: 112 – 116.
- Lin, S.H.; Liu, W.Y. (1994). Treatment of textile wastewater by ozonation in a packed-bed reactor. *Environ. Technol.* **15**: 299 - 311.
- Linko, Y-Y (1986). Continuous production of lignin peroxidase by *P. chrysosporium*. *J. Biotechnol.* **4**: 283 - 291.
- Linko, S.; Zhong, L. (1987). Comparison of different methods of immobilization for lignin peroxidase production by *P. chrysosporium*. *Biotechnol. Tech.* **1**: 251 - 256.
- Livermoche, D.; Jurasek, L.; Desrochers, M. e Dorica, J. (1983). Removal of Color from Kraft mill wastewater with cultures of white-rot fungi and with

- immobilized mycelium of *Colorius versicolor*. *Biotechnol Bioeng.* **25**: 2055-2065.
- Lopez, A.; Ricco, G.; Mascolo, G.; Tiravanti, G.; Di Pinto, A.C.; Passino, R. (1998). Biodegradability enhancement of refractory pollutants by ozonation: a laboratory investigation on an azo-dyes intermediate. *Wat. Sci. Technol.* **38**: 239 – 245.
- Lord, G.A.; Gordon, D.B.; Tetler, L.W.; Carr, C.M. (1995). Electrochromatography-electrospray mass spectrometry of textile dyes. *J. Chromatogr. A* **700**: 27 - 33.
- Malcome-Lowes, D.J. (1988). *Microcomputers and Laboratory Instrumentation*, Plenum Press, 2th ed., London.
- Mangold, J. (1995). Corantes reativos basilen. *Calquim*: 34 - 47.
- Mansilla, H. D.; Yeber, M.C.; Freer, J.; Rodriguez, J.; Baeza, J. (1997). Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of bleaching effluent from the pulp and paper industry. *Wat. Sci. Technol.* **35**: 273 – 278.
- Marco, A.; Esplugas, S.; Saum, G. (1997). How and why combine chemical and biological processes for wastewater treatment. *Wat. Sci. Technol.* **35**: 321-327.
- Mark, D.V.D. (1994). El ozono como oxidante en la depuración de aguas. *Ingin. Quim. Abril*: 87 – 91.
- Masten, S.J.; Davies, S.H.R. (1994). The use of ozonation to degrade organic contaminants in wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* **28**: 181A – 185A.
- Melo, A.A.; Mariani, S.; Zaror, M.C. (1997). Kinetics of oxidation reactions between ozone, and lignin and cellulose. *Celulosa Y Papel* **13**: 12 – 17.
- Michel, Jr., F.R.; Dass, B.; Grulke, E.A. e Reddy, C.A. (1991). Role of manganese peroxidases and Lignin Peroxidases of *P. chrysosporium* in the decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 2368 - 2375.

- Miller, G.L. (1959). Use of dinitralsalicylic Reagent for the Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426 - 428.
- Moraes, S.G. (1995). Fotodegradação de compostos organoclorados aromáticos: caracterização e toxicidade de intermediários. *Dissertação de mestrado*, Instituto de Química, UNICAMP.
- Nakamura, Y; Sawada, T.; Sungusia, M. G.; Kobayashi, F.; Kuwahara, M.; Ito, M. (1997). Lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam. *J. Chem. Eng. Japan* **30**: 1 - 6.
- Nobrega, R.. Processos de separação com membranas e suas aplicações em biotecnologia. *2^o Sem. Intern. Technol. Enzim.* Vol 2. 25 a 27 de outubro de 1995. Rio de Janeiro/RJ
- Ollikka, P.; Alhonmäki, K. ; Leppänen, Veli-M., Glumoff, T. R., e Suominen, I. (1993). Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *P. chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4010 - 4016.
- Oxspring, D.A.; Smith, W.F.; Marchant, R. Comparison of reversed-polarity capillary electrophoresis and adsorptive stripping voltametry for the detection and determination of reactive textile dyes. *Analyst* **120**: 1995 - 2000.
- Paszczynski, A.; Crawford, R.L. (1991). Degradation of azo compounds by ligninase from *P. Chrysosporium* involvement of veratrylic alcohol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 1056 - 1063.
- Peleg, M. (1976). The chemistry of ozone in the treatment of water. *Wat. Res.* **10**: 361 - 365.
- Pelegrini, R.; Peralta-Zamora, P.; Andrade, A. R.; Reyes, J.; Durán, N. (1999). Electrochemically assisted photocatalytic degradation of reactive dyes. *Appl. Catal. B: Environ.* **566**: 1-8.
- Peres, C. S. (1997). Compostos recalcitrantes à degradação biológica. Livro de resumos do *3^o Seminário Internacional de Tecnologia Enzimática*, 29 a 31 de outubro de 1997. Rio de Janeiro - RJ.

- Perkowski, J.; Kos, L.; Ledakowicz, S. (1996). Applications of ozone in textile wastewater treatment. *Ozone Sci Eng.* **18**: 73 - 85.
- Petillo, V.L.S.; Philippi Jr, A. (1998). Gestão ambiental na indústria química brasileira. *Anales de XXVI congreso interamericano de ingenieria sanitaria y ambiental. 1 a 5 de noviembre de 1998. Lima – Peru.*
- Phillipi Jr., A; Pelicioni, M.C.F.; de Barros, R.L.F.; Brand Filho, W.; Tristão, V.T.V.; (1998). Agenda 21 local como instrumento de gestão, educação e participação popular. *Anales de XXVI Congreso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental. 1 a 5 de noviembre de 1998. Lima – Peru.*
- Pierce, J. (1994). Colour in textile effluents - the origins of the problem. *J. Soc. Dyers Colourist* **110**: 131 - 133.
- Reddy, C.A. (1995). The Potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Cur. Oppinium Biotechnol.* **6(3)**: 320 - 328.
- Reginatto, V.; Kunz, A.; Durán, N.C. (1998). Avaliação da toxicidade do cobre pelo uso do ensaio com a alga verde *Scenedesmus subspicatus*. *Anais da II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente. Florianópolis, SC – 12 a 15 de outubro de 1998. (no prelo).*
- Rice, R. G. (1981). Ozone for the treatment of hazardous materials. *AICHE Symp. Series* **209(77)**: 79 - 107.
- Rice, R.G. *Principles and Practices of Chemical Oxidation in Wastewater Treatment*, April 13-14, 1996. Nashville, Tennessee.
- Rice, R.G. (1997). Applications of ozone for industrial wastewater treatment. A review. *Ozone Sci. Eng.* **18**: 477 - 515.
- Ronco, A.E. (1992). Development of Bioassay reagent using *Photobacterium phosphorium* as a test for the detection of aquatic toxicants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 316 - 318.

- Rounsaville, J.; Rice, G.R. (1997). Evaluation of ozone for the bleaching of paper pulps. *Ozone Sci. Eng.* **18**: 549 – 566.
- Roy-Arcand, L.; Methot, M.; Archibald, F.S. (1996). Combining pilot-scale ozone and activated sludge treatments on newsprint mill effluents. *Tappi J.* **79**: 133 - 143.
- Santiago, M.F.; Peralta-Zamora, P.; Duran, N. (1997). Polyhydroxamate/iron (III) complex as a mimetic model of phenoloxidase and its application in bioremediation of pulp and paper residues. *Proc. of 5th Braz. Symp. on the Chemistry of Lignins and Other Wood Compon.* 31 de agosto a 05 de setembro de 1997 Vol VI. Curitiba – Pr. 567-575.
- Savitzky, M.; Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* **36**: 1627 – 1639.
- Scott, J.P.; Ollis, M. (1995). Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: review and recommendations. *Environ. Progress* **14**: 88 - 102.
- Shu, H.; Huang, C. (1995). Degradation of commercial azo dyes in water using ozonation and UV enhanced ozonation processes. *Chemosphere* **31**: 3813 - 3825.
- Silva, M.J. (1997). Fabricantes buscam novas tecnologias para reduzir o consumo de água. *Celulose & Papel* **60**: 6 –10.
- Snider, E.H.; Porter, J.J. (1974). Ozone treatment of dye waste. *J. Wat. Poll. Cont. Fed.* **45**: 886 - 894.
- Sonntag, C.; Dowd, P.; Fang, X.; Mertens, R. Pan, X.; Schuchmann, M.N.; Schuchmann, H.P. (1997). The fate of peroxy radicals in aqueous solution. *Wat. Sci. Technol.* **35**: 9 - 15.
- Spadaro, J.T.; Gold, M.H.; Renganathan, V. (1992). Degradation of azo dyes by the lignin-degradation fungus *P. chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2397 - 2401.

- Sullivan, B.E., Roth, J.A. (1979). Kinetics of ozone self-decomposition in aqueous solution. *AICHE Symp. Series 76*: 142 – 148.
- Swamy, J.; Ramsay, J. A. (1999). The evaluation of the white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enz. Microb. Technol.* **24**: 130 – 137.
- Tapley, K.N. (1995). Capillary electrophoretic analysis of the reactions of bifunctional reactive dyes under various conditions including a study of the analysis of the traditionally difficult to analyse phthalocyanine dyes. *J. Chromatogr. A* **706**: 555 - 562.
- Tavares, M.F.M. (1997). Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Química Nova* **20**: 493 – 511.
- Tien, M.; Kirk, T.K. (1984). Lignin-degradation enzyme from *P. Chrysosporium* : purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-required oxygenase. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA*, **81**: 2280 - 2284.
- Timofeevski, S.L.; Reading, N.S.; Aust, S.D. (1998) mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**: 287 – 295.
- Treybal, R.E. (1991). Operaciones de transferencia de masa. Mc Graw Hill, 2ª edición, USA.
- Tzitzzi, M.; Vagenas, V., Lyberatos. G. (1994). Pretreatment of textile industry wastewaters with ozone. *Wat. Sci. Technol.* **29**:151 - 160.
- Usepa, 1991. Technical support document for water quality-based toxics control. EPA/505/2-90-001 PB91-127415.
- Vandevivere, P.V.; Bianchi, R.; Verstraete, W. (1998). Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **72**: 289 – 302.
- Weber, W.J.; Smith, E.H. (1986). Removing dissolved organic contaminants from water. *Environ. Sci. Technol.* **20**: 970 – 979.

- Wu, J.; Eiteman, M.A.; Law, S.E. (1998). Evaluation of membrana filtration and ozonation processes for treatment of reactive-dye wastewater. *J. Environ. Eng.* **124**: 272 – 277.
- Young, L.; Yu, J. (1997). Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Wat. Res.* **31**: 1187 - 1193.
- Yesilada, Ö. (1995). Decolourization of Crystal Violet by fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 601 - 602.
- Zapanta, L. S.; Tien, M. (1997). The role of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. *J. Biotechnol.* **53**: 93 - 102.
- Zhang, F.M.; Knapp, J.S.; Tapley, K.N. (1998). Decolourisation of cotton bleaching effluent in a continuous fluidized-bed bioreactor using wood rotting fungus. *Biootechnol. Lett.* **20**: 717 – 723.
- Zhang, F.M.; Knapp, J.S.; Tapley, K. N. (1999). Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enzime. Microb. Technol.* **24**: 48-53.
- Zhou, H.; Smith, D.W. (1997). Process parameter development for ozonation of kraft pulp mill effluents. *Wat. Sci. Technol.* **35**: 261 – 268.

8 – Atividades desenvolvidas durante o período de doutoramento:

8.1 – Estágio no exterior:

Laboratório de Recursos Renováveis, Universidade de Concepción – Concepción, Chile. Janeiro a março de 1997.

8.2 – Atividades acadêmicas:

Auxiliar didático no curso de graduação em química (IQ – Unicamp) durante o segundo semestre de 1996 das disciplinas QA – 215 (Química Analítica Experimental) e QA – 216 (Química Analítica II).

8.3 – Publicações:

8.3.1 – Revistas Internacionais:

- Peralta-Zamora, P.; Kunz, A.; Nagata, N.; Poppi, R.J. (1998). Spectrophotometric determination of organic dye mixtures by using multivariated calibration. *Talanta* 47: 77 – 84.

- Peralta –Zamora, P.; Kunz, A.; Moraes, S. G.; Pelegrini, R.; Moleiro, P.C.; Reyes, J.; Duran, N. (1999). Degradation of reactive dyes I. A comparative study of ozonization, enzymatic and photochemical processes. *Chemosphere* 38: 835 – 852.

- Kunz, A.; Jardim, W.F. (1999). Complexation and adsorption of copper in raw sewage. *Water Research* (no prelo).

- Durán, N.; Bromberg, N.; Kunz, A. (1999). Biotransformation of veratryl alcohol by peroxidase. *Biocatalysis & Biotransformation* (submetido).

- Freire, R.S.; Kunz, A.; Durán, N. (1999). Some chemical and toxicological aspects about paper mill effluent treatment with ozone. *Environmental Technology* (submetido).

- Kunz, A.; Mansilla, H.; Durán, N. (1999). Treatment of textile reactive dyes by ozonization process. *Chemosphere* (submetido).

- Kunz, A.; Durán, N. (1999). Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*-Ozone. *Chemosphere* (submetido).

- Moraes, S.G.; Kunz, A.; Peralta-Zamora, P.; Durán, N. Remediation of textile effluent: New tendencies (em fase final de preparação).

8.3.2 – Revistas nacionais:

- Kunz, A. (1997). O que é a ISO 14000?. *Tecnia* 2: 137 – 141.

- Kunz, A.; Freire, R.S.; Rohwedder, J.J.R.; Mansilla, H.; Rodriguez, J.; Duran, N. (1999). Construção e otimização de um sistema para produção e aplicação de ozônio em escala de laboratório. *Química Nova* 22: 425 – 428.

8.3.3 – Patentes:

- Kunz, A.; Freire, R. S.; Rohwedder, J.J.R.; Gutierrez, J.P.R.; Caballero, N.E.D.C. (1998). Desenho e montagem de um sistema para produção de ozônio em escala laboratorial. *P.I.* 9802076.

8.3.4 – Proceedings em congressos internacionais:

- Kunz, A.; Mansilla, H.; Freer, J.; Baeza, J.; Durán, N. (1997). Chemical treatment (ozone) of dyes presents in textile effluents: toxicity of intermediates formed in the process. *Proceedings of fifth symposium on the chemistry of lignins and other wood components*. 31 august to 05 september. Curitiba-PR Brazil Vol. VI: 92 – 98.

- Kunz, A.; Esposito, E.; Reyes, J. Durán, N. (1998). Biodegradation of textile effluent using the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc. of Third Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium*. Florianópolis, 27-30 April, 1998. Paper nº 46, 1-5.

- **Kunz, A.**; Reyes, J.; Durán, N. (1999). New alternatives on textile effluent remediation. *Proc. Inter. Conf. Diff. Poll.*. Perth – WA – Austrália, 16 – 20 may, 1999. 525 – 531.

- **Kunz, A.**; Durán, N. (1999). Textile effluent remediation using the sequence Ozone-*P. chrysosporium* fungus. *Proceedings of sixth symposium on the chemistry of lignins and other wood components*. October 25-28. Guaratinghetá-SP Brazil (no prelo).

8.3.5 – Anais em congressos nacionais:

- **Kunz, A.**; Reginatto, V.; Reyes, J.; Durán, N. (1998). Estudo da toxicidade de corantes têxteis e seus produtos de degradação frente a alga *Scenedesmus Subspicatus*. *Anais da II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente*. Florianópolis, SC – 12 a 15 de outubro de 1998. (no prelo).

- Reginatto, V.; **Kunz, A.**; Durán, N. (1998). Avaliação da toxicidade do cobre pelo uso do ensaio com a alga verde *S. subspicatus*. *Anais da II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente*. Florianópolis, SC – 12 a 15 de outubro de 1998 (no prelo).

8.3.6 – Trabalhos apresentados em congressos (apenas com resumo ou abstract):

- Silva, S.T.; **Kunz, A.**; Jardim, W.F. (1997). Contribuição dos tampões PIPES, HEPES, BES e MES na complexação de cobre. Publicado no Livro de resumos do *IX encontro nacional de química analítica*. 31/08 a 03/09/1997. São Carlos-SP.

- **Kunz, A.**; Mansilla, H.; Freer, J.; Baeza, J.; Durán, N. (1997). A influência do pH na degradação do corante têxtil preto reativo-5 utilizando ozônio. Publicado no livro de resumos do *XXXVII congresso brasileiro de química*. 28 de setembro a 03 de outubro. Natal - RN

- **Kunz, A., Reyes, J., Esposito, E., Durán N.** (1997). Produção de lignina peroxidase em efluente têxtil. Publicado no livro de resumos do *3^o seminário brasileiro de tecnologia enzimática*. 29 a 31 de outubro de 1997. Rio de Janeiro-RJ.

- **Kunz, A., Reyes, J., Durán, N.** (1998). A problemática do tratamento de efluente têxtil : Novas alternativas de remediação. Publicado no livro de resumos da *XI reunión chemrawn en química ambiental. Congreso latinoamericano en química analítica ambiental*. 15 – 20 de março de 1998. Montevideo-Uruguay.

- **Kunz, A.; Esposito, E.; Reyes, J.; Durán, N.** (1998). Biodegradation of textile effluents using the white-rot fungus *Phanaerochaete chrysosporium*. Abstracts of the Third Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium. 27 – 30 april, Florianópolis-SC-Brazil.

- **Peralta-Zamora, P.; Kunz, A.; Nagata, N.; Poppi, R. J.** (1998). Determinação espectrofotométrica de misturas de corantes utilizando-se calibração multivariada. Publicado no livro de resumos da *21^a reunião anual da sociedade brasileira de química*. 25 a 28 de outubro. Poços de Caldas – MG.

- **Peralta-Zamora, P.; Kunz, A.; Moraes, S.G.; Pelegrini, R.; Moleiro, P.C.; Reyes, J.; Duran, N.** (1998). Degradação de corantes reativos. Estudo comparativo dos processos enzimáticos, fotoquímico e de ozonização. Publicado no livro de resumos da *21^a reunião anual da sociedade brasileira de química*. 25 a 28 de outubro. Poços de Caldas – MG.

- **Kunz, A.; Reyes, J.; Durán, N.** (1998). Textile effluents pretreatment using ozone. Abstracts of the *nineteenth Biennial Conference of the International Association on Water Quality*. June 21-28 – Vancouver, B.C., Canada.

-**Kunz, A. ; Masilla, H.; Reyes, J.; Durán, N.** (1998). Degradation of textile dyes using ozone. Resumenes del *XXIII congreso latinoamericano de química*. 26-31 de julio. Rio Grande - Puerto Rico.

- **Kunz, A. ; Freire, R.S.; Reyes, J. Durán, N.** (1998). Estudos de transferência de massa de ozônio para um reator de escala de laboratório. Publicado

no livro de resumos do *XXXVIII congresso brasileiro de química*. 21 a 25 de setembro. São Luiz – MA.

- Freire, R. S. ; Kunz, A.; Reyes, J.; Durán, N. (1998). Tratamento do efluente de indústria papeleira com ozônio: Aspectos químicos e toxicológicos. Publicado no livro de resumos do *XXXVIII congresso brasileiro de química*. 21 a 25 de setembro. São Luiz – MA.

- Kunz, A.; Moraes, S.G.; Zamora, P.P.; Durán, N. (1999). Tratamento de efluente têxtil com ozônio após precipitação com hidróxido de ferro. Publicado no livro de resumos da *22ª reunião anual da sociedade brasileira de química*. 25 a 28 de maio. Poços de Caldas-MG.

8.3.7 – Participação em Simpósios:

- 2^o Minisimpósio de Novas Estratégias em Química e Biotecnologia de Materiais Renováveis. 25 e 26 de novembro de 1995. Instituto de Química – Unicamp, Campinas/SP.

- 3^o Minisimpósio de Novas Tecnologias em Química e Biotecnologia de Materiais Renováveis. 30 de agosto de 1997. Instituto de Química – Unicamp, Campinas/SP.

- Workshop sul-americano sobre usos alternativos de resíduos de origem florestal e urbana. 4 – 5 de outubro de 1997. Hotel Bourbon. Curitiba-Pr.

- II Simpósio internacional de Qualidade Ambiental. 26 a 28 de outubro de 1998. PUCRS- Porto Alegre/RS.

8.3.8 – Palestras e Seminários Ministrados:

- **Utilization of combined methods on remediation of industrial effluents.** Ministrado em 31 de julho de 1998 na Universidad Metropolitana, San Juan, Puerto Rico.

- **Novas alternativas para remediação de efluentes industriais.** Ministrada na disciplina EC 211 – Tópicos especiais em Saneamento:

Perspectivas Atuais em Saneamento. Departamento de saneamento e Ambiente, Faculdade de Engenharia Civil – Unicamp. 27 de agosto de 1998.

8.3.9 – Cursos extra-curriculares:

- Por uma gestão integrada dos resíduos; promovido pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Porto Alegre – RS), ministrado pelo professor Mauro Gandolla (Suíça), nos dias 27 e 28 de outubro de 1998 (8 horas).