

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS CURITIBA
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS**

LEONARDO PELLIZZARI WIELEWSKI

**AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5 EM ESPUMA
DE POLIURETANA E ANÁLISE PRELIMINAR DA BIODEGRADAÇÃO POR
FUNGOS BASIDIOMICETOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Curitiba
2014**

LEONARDO PELLIZZARI WIELEWSKI

**AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5 EM ESPUMA
DE POLIURETANA E ANÁLISE PRELIMINAR DA BIODEGRADAÇÃO POR
FUNGOS BASIDIOMICETOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, como requisito parcial à obtenção de título de Tecnólogo em Processos Ambientais, do Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *Campus Curitiba*.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz

Co-orientadora: Profa. Dra. Marlene Soares

Curitiba
2014

LEONARDO PELLIZZARI WIELEWSKI

**AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5 EM
ESPUMA DE POLIURETANA E ANÁLISE PRELIMINAR DA
BIODEGRADAÇÃO POR FUNGOS BASIDIOMICETOS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi) do *Campus* Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – PROF^a. DR^a. GISELLE MARIA MACIEL
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, (UTFPR)

Membro 2 – PROF. DR. ALESSANDRO FEITOSA MACHADO
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, (UTFPR)

Orientador – PROF. DR. MARCUS VINICIUS DE LIZ
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, (UTFPR)

Coordenadora do Curso – PROF^a. DR^a. VALMA MARTINS BARBOSA

Curitiba, 14 de março de 2014

Esta Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

AGRADECIMENTOS

Tenho o mais profundo sentimento de agradecimento a:

Deus e a todos os Seres que de alguma forma me auxiliaram neste projeto.

Sandra Mara Pellizzari, professora, companheira, psicóloga, meu maior exemplo de pessoa batalhadora, honesta... Minha Mãe! Por todo o auxílio, toda paciência, toda compreensão, por me pressionar e me acalmar nas horas certas, e sempre me incentivar a estudar.

Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz e Profa. Dra. Marlene Soares, meus orientadores, por toda paciência, dedicação, amizade, apoio e não menos importante, por acreditarem.

Toda minha família pelo apoio e confiança.

Todos os professores desde o início da graduação que me ajudaram a lapidar minhas ideias e aumentar meus conhecimentos.

Ana Carolina Siles Tardivo, meu amor, pela incrível paciência, serenidade, insistência, motivação, afeto e compreensão da minha ausência, pela grande ajuda nas pesquisas e parte final no laboratório.

Leonardo Kozak Michelin, Ramon Dall Agnol e Thiago Savick pelo auxílio nas pesquisas e na parte laboratorial, além de contribuírem, em muito, em momentos de pouca sensatez.

Emanuelle Cavalin e Rubia Matos Lima pelo auxílio nas tarefas do laboratório e pelo companheirismo.

Bruno, Débora, Francisco, Letícia, John, Willian(s), Priscilla, Juliana, Bruna, Duwe, Mayara, Ana(s), Camila, Maiara, Victor, Francielli, Hugo, Davy, Rodolfo, e tantos outros amigos que não caberiam aqui, obrigado por fazerem parte desta caminhada!

*“A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria;
O que você sente, você atrai;
O que você acredita, torna-se realidade.”
Buda*

*“A morte não é a maior perda da vida.
A maior perda da vida,
é o que morre dentro de nós enquanto vivemos”
Pablo Picasso.*

RESUMO

WIELEWSKI, Leonardo Pellizzari. **Avaliação da adsorção do corante Preto Reativo 5 em espuma de poliuretana e análise preliminar da biodegradação por fungos basidiomicetos.** 68 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Ambientais) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

Com o desenvolvimento industrial e a crescente demanda por produtos de melhor qualidade e aparência o ramo têxtil tem aumentado sua produção a cada ano, e com isso, vem gerando grandes quantidades de resíduos, nos quais os efluentes com concentrações elevadas de corantes estão incluídos. Devido à necessidade de tratamento de volumes cada vez maiores de resíduos, novos estudos têm sido realizados buscando a otimização e desenvolvimento de técnicas de tratamento. Este trabalho apresenta um estudo de otimização de variáveis que interferem no processo de biodegradação do corante Preto Reativo 5 pelos basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus floridae* combinado com adsorção em espuma de poliuretana tendo como base um planejamento 2². Foi verificado que a condição ideal para maior adsorção do corante Preto Reativo 5, dentro dos parâmetros previamente estabelecidos, foi de 50 mg.L⁻¹ em pH 6, atingindo 92,4% de eficácia. Entre os três fungos citados anteriormente, foi realizado um experimento para avaliar a capacidade de descoloração e crescimento radial, o *Phanerochaete chrysosporium* foi o mais eficaz atingindo 9,712 mm.dia⁻¹ na concentração de 50 mg.L⁻¹ em pH 6. A avaliação da biodegradação em respirômetro de Bartha, confirmou que o *Phanerochaete chrysosporium* é capaz de se desenvolver, apresentando o valor de produção de CO₂ acumulado igual a 490,93 mg de CO₂ produzido apenas com o corante como fonte de nutrientes.

Palavras-chave: Corante Preto Reativo 5. *Phanerochaete chrysosporium*. *Pleurotus ostreatus*. *Pleurotus floridae*. Respirômetro de Bartha.

ABSTRACT

WIELEWSKI , Leonardo Pellizzari. **Evaluation of adsorption of the dye Reactive Black 5 in polyurethane foam and preliminary analysis of biodegradation by basidiomycetes fungi.** 68 f. Completion of course work (Technology in Environmental Processes) - Academic Department of Chemistry and Biology, Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2014.

With the industrial development and the increasing demand for better quality products and look the textile industry has increased its production every year, and it has generated large amounts of waste, in which the effluent with high concentrations of dye are included. Due to the need to treat increasing waste volumes, new studies have been conducted to the optimization and development of treatment techniques. This paper presents an optimization study of variables that affect the biodegradation process of dye Reactive Black 5 by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus floridae* combined with adsorption on polyurethane foam based planning 2^2 . It was found that the optimum condition for greater adsorption of the dye Reactive Black 5, within the parameters previously set was 50 mg L^{-1} at pH 6, reaching 92.4% efficiency. Among the three fungi mentioned above, an experiment was conducted to evaluate the ability of discoloration and radial growth, *Phanerochaete chrysosporium* was the most effective reaching $9,712 \text{ mm.dia}^{-1}$ at a concentration of 50 mg L^{-1} at pH 6. Evaluation biodegradation in the respirometer Bartha confirmed that *Phanerochaete chrysosporium* is able to develop, with the value of cumulative production of CO_2 equal to 490.93 mg of CO_2 produced only with the dye as a nutrient source.

Keywords: Dye Reactive Black 5. *Phanerochaete chrysosporium*. *Pleurotus ostreatus*. *Pleurotus floridae*. Respirometer Bartha.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Grupos cromóforos constituintes dos corantes.	17
Figura 2: Estrutura química de um corante tipo azo.	18
Figura 3: <i>Pleurotus ostreatus</i>	22
Figura 4: Corpo de frutificação <i>P. floridae</i>	23
Figura 5: <i>Phanerochaete chrysosporium</i> observado no microscópio.....	24
Figura 6: Fluxograma representativo da metodologia.	29
Figura 7: Câmara de Neubauer.....	34
Figura 8: Gabarito da câmara de Neubauer.....	35
Figura 9: Esquema do traçado para a medida do crescimento radial.	38
Figura 10: Respirômetro de Bartha	40
Figura 11: Soluções padrão de corante Preto Reativo 5, da esquerda para a direita: 1 mg.L ⁻¹ , 5 mg.L ⁻¹ , 10 mg.L ⁻¹ , 15 mg.L ⁻¹ , 20 mg.L ⁻¹ , 25 mg.L ⁻¹ , 30 mg.L ⁻¹ , 40 mg.L ⁻¹ , e 50 mg.L ⁻¹	42
Figura 13: Decréscimo na absorvância do teste preliminar.....	45
Figura 14: Gráfico da variação de absorvância do ensaio na melhor condição.....	46
Figura 15: Crescimento radial (mm.dia ⁻¹) dos fungos nas diferentes condições de concentração e pH.....	51
Figura 16: Descoloração após o cultivo do <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . Da esquerda para a direita: 1º Coluna: 12,5 mg.L ⁻¹ e pH 6; 2º Coluna: 12,5 mg.L ⁻¹ e pH 8; 3º Coluna: 25 mg.L ⁻¹ e pH 7; 4º Coluna: 50 mg.L ⁻¹ e pH 6; 5º coluna: 50 mg.L ⁻¹ e pH 8.	52
Figura 17: Degradação do corante PR5 pelo <i>P. ostreatus</i> . Da esquerda para a direita: 1º Coluna: 12,5 mg.L ⁻¹ e pH 6; 2º Coluna: 12,5 mg.L ⁻¹ e pH 8; 3º Coluna: 25 mg.L ⁻¹ e pH 7; 4º Coluna: 50 mg.L ⁻¹ e pH 6; 5º coluna: 50 mg.L ⁻¹ e pH 8.	53
Figura 18: Degradação do corante PR5 pelo <i>P. floridae</i> . Da esquerda para a direita: 1º Coluna: 12,5 mg.L ⁻¹ e pH 6; 2º Coluna: 12,5 mg.L ⁻¹ e pH 8; 3º Coluna: 25 mg.L ⁻¹ e pH 7; 4º Coluna: 50 mg.L ⁻¹ e pH 6; 5º coluna: 50 mg.L ⁻¹ e pH 8.	53
Figura 19: Quantidade de CO ₂ produzido diariamente.....	55
Figura 20: Quantidade de CO ₂ produzido acumulado.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Planejamento fatorial para avaliação do efeito das variáveis pH e concentração do corante preto reativo 5 na adsorção pela espuma de poliuretana.....	31
Tabela 2: Confeção dos meios de cultivo em determinadas concentrações e pH utilizados para a inoculação dos fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus floridae</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i>	36
Tabela 3: Concentrações e pH utilizados nos ensaios preliminares de adsorção.....	44
Tabela 4: Resultados do ensaio de adsorção utilizando a condição ideal.....	47
Tabela 5: Contagem do número de células presentes na suspensão microbiana utilizada na inoculação dos experimentos.....	48
Tabela 6: Valores de velocidade de crescimento radial ($\text{mm}\cdot\text{dia}^{-1}$) para os três fungos, em todas as condições estudadas.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

atm – atmosfera
C - Carbono
CFC – Clorofluorocarboneto
CO₂ – Dióxido de Carbono / Gás carbônico
DDT – Diclorodifeniltricloroetano
DQO - Demanda Química de Oxigênio
EPU – espuma de poliuretana
FES - Fermentação no Estado Sólido
HCl – Ácido Clorídrico
HFC - hidrofluorocarbonetos
KOH – Hidróxido de Potássio
L – Litro
Lac – lacase
LiP - lignina peroxidase
MDI - difenilmetano diisocianato
min – minutos
mL – mililitro
MnP - Manganês peroxidase
N - Nitrogênio
NaOH – Hidróxido de Sódio
NBR – Norma Brasileira
O₂ – Gás Oxigênio
°C – Graus Celsius
PCB - Bifenilos Policlorados,
PDA – Potato dextrose ágar
pH – Potencial hidrogeniônico
PR5 – Preto Reativo 5
rpm – rotações por minuto
TDI - Tolueno diisocianato
UFC - Unidades Formados de Colônias
UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV-VIS – Ultra violeta – Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 CORANTES TÊXTEIS	15
3.2 BIORREMEDIAÇÃO POR BASIDIOMICETOS	18
3.2.1 Pleurotus	21
3.2.2 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	23
3.2.3 Sistemas Enzimáticos Encontrados nos Basidiomicetos	24
3.3 ESPUMAS POLIURETANAS (EPU'S)	25
3.4 RESPIROMETRIA	27
4 METODOLOGIA	29
4.1 ETAPA 1 – CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA MONITORAMENTO DA ADSORÇÃO DO CORANTE.	30
4.1.1 Otimização da Adsorção do Corante na Espuma de Poliuretana	30
4.1.2 Planejamento Fatorial dos Parâmetros de pH e Concentração do Corante Preto Reativo 5.	30
4.2 ETAPA 2 - ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5.	32
4.3 ETAPA 3 - SELEÇÃO DO FUNGO COM MAIOR VELOCIDADE DE CRESCIMENTO EM MEIO SOLIDIFICADO COM CORANTE PRETO REATIVO 5.....	32
4.3.1 Microrganismos	32
4.3.1.1 Preparo do inóculo	33
4.3.1.2 Quantificação de células	33
4.3.2 Preparação do Meio de Cultivo Com Corante Preto Reativo 5.	36
4.3.3 Plaqueamento e Perfuração dos Poços no Meio de Cultivo.....	37
4.3.4 Crescimento Radial	37
4.3.5 Descoloração do Meio de Cultivo	38
4.4 ETAPA 4 - ENSAIOS DE RESPIROMETRIA	39
4.4.1 Soluções Utilizadas Para o Ensaio de Respirimetria.....	39
4.4.2 Inoculação do Microrganismo	39
4.4.3 – Quantificação de CO ₂ Produzido	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 ETAPA 1 - CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA MONITORAMENTO DA ADSORÇÃO DO CORANTE.	42
5.1.1 Curva Analítica da Solução de Preto Reativo 5.	42
5.2 ETAPA 2 - ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5; ENSAIO DE ADSORÇÃO	44
5.2.1 Teste preliminar	44
5.2.2 Adsorção na melhor condição	45

5.3 ETAPA 3 - SELEÇÃO DO FUNGO QUE APRESENTA MAIOR VELOCIDADE DE CRESCIMENTO EM MEIO SOLIDIFICADO COM CORANTE PRETO REATIVO 5.....	48
5.3.1 Contagem de Células dos Fungos	48
5.3.2 Avaliação do Crescimento Radial e Descoloração.	49
5.4 ETAPA 4 – ENSAIOS DE RESPIROMETRIA	54
5.4.1 Montagem dos Respirômetros	54
5.4.2 Ensaio da Biodegradação do Corante Preto Reativo 5 Adsorvido em Espuma de Poliuretana.....	55
6 CONCLUSÃO	57
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

A indústria têxtil é uma das mais importantes e considerada uma das atividades com maior tradição da história. É responsável por grande movimentação financeira em diversos países e avalia-se que, pelo volume elevado de produção e também pela alta quantidade de resíduos produzidos nas operações de limpeza, tingimento e acabamento do produto, são responsáveis pela geração de efluentes. Os efluentes da indústria têxtil possuem alta diversidade de produtos químicos, muitas vezes nocivos ao homem e ao meio ambiente se descartados de forma incorreta (FORGIARINI, 2006).

Há grande preocupação com a contaminação humana decorrente da destinação inadequada de corantes em corpos hídricos, devido ao acúmulo na cadeia alimentar e às atividades mutagênicas e carcinogênicas que muitos podem conter. Estes problemas podem ser mais graves, considerando o fato de que muitos destes efeitos ainda não são conhecidos (DELLAMATRICE, 2005).

Uma das opções de remoção para contaminantes desta natureza é sua adsorção em diferentes materiais. Esta técnica é uma das utilizadas para a retenção de contaminantes como nos estudos de Accioly (2008), para retenção do corante Luganil azul em espuma de poliuretana, como citado por Kunz et al. (2002) que utilizou carvão ativado para adsorção de diferentes tipos de corantes têxteis. Silveira Neta (2011) utilizou a técnica de adsorção para retenção de corantes têxteis, mesmo foco de estudo apresentado no artigo publicado por Villalobos et al. (2013), em diversos outros trabalhos. Deve-se considerar que vários fatores podem interferir no processo de adsorção, tais como a estrutura molecular do adsorvente, solubilidade do soluto, pH, agitação/turbilhonamento, tamanho molecular do adsorbato, temperatura, entre outros (FOUST; WENZEL; CLUMP, 1982).

As Espumas de Poliuretana (EPU's) podem ser utilizadas como alternativas viáveis para a adsorção de diversos tipos de poluentes já que são materiais de baixo custo, estáveis, leves, altamente disponíveis no mercado, e

de fácil manuseio, pois em muitos casos, estas espumas podem ser utilizadas para adsorção de diferentes contaminantes sem precisar passar por qualquer tipo de pré-tratamento, fator que simplifica e até mesmo facilita sua utilização (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2006).

Ainda, buscando minimizar o processo de transferência de matriz, gerando lodo contaminado por corantes, pesquisas recentes (SOUZA ROSADO, 2009; DELLAMATRICE, 2005; KAMIDA; DURRANT, 2005) têm demonstrado bons resultados empregando fungos no processo de degradação de corantes, o que pode ser aprimorado via cultivo em estado sólido (utilizando a espuma de poliuretana como substrato), técnica que em alguns casos apresenta maior rentabilidade com menores custos comparados ao cultivo submerso (LIMA, 2009). Vários microrganismos vêm sendo estudados para a degradação dos diversos compostos utilizados neste ramo industrial com o objetivo da remoção de compostos tóxicos que não são tratados pelos processos utilizados com maior frequência (KAMIDA e DURRANT, 2005).

Neste trabalho foi avaliada a adsorção da espuma de poliuretana frente a uma solução aquosa de Preto reativo 5, um corante modelo, sob condições otimizadas de pH e concentração do corante, com análise da eficiência de degradação, entre fungos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus floridae* e *Phanerochaete chrysosporium*, do material adsorvido pelo fungo que apresentou melhor capacidade de desenvolvimento no corante Preto Reativo 5.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da adsorção do corante preto reativo 5 em espuma de poliuretana e análise preliminar da biodegradação por fungos basidiomicetos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os parâmetros de pH e concentração do corante preto reativo 5 para adsorção em espuma de poliuretana;
- Estudar a cinética de adsorção do corante na condição otimizada;
- Selecionar entre 3 basidiomicetos ligninolíticos aquele que apresenta maior velocidade de crescimento em meio solidificado com corante preto reativo 5, variando pH e concentração de corante dos cultivos ;
- Acompanhar a biodegradação do corante preto reativo 5 adsorvido em espuma poliuretana, pela técnica de respirometria seguindo a NBR 14283, empregando o basidiomiceto selecionado.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CORANTES TÊXTEIS

O processo de tingimento dos tecidos começou na antiguidade, e desde então, a disponibilidade comercial de diversos tipos de corantes vem crescendo. As tecnologias de tingimento foram aperfeiçoadas com processos de aplicação de diferentes cores em diversos tipos de tecidos tornando-as cada vez mais específicas. Isto depende de variáveis como a natureza da fibra têxtil, disponibilidade do pigmento para aplicação, características físicas, químicas e estruturais de cada fibra, das propriedades de fixação do material alvo do tingimento, e na maioria das vezes, questões econômicas que envolvam o valor do corante (ZOLLINGER, 1991).

A relação de custo x benefício do processo de tingimento, as questões ambientais principalmente relacionadas ao tratamento dos resíduos, gerados pela atividade também são fatores determinantes na utilização de cada método (ABRAHANT 1977).

Para que os produtos têxteis tenham grande visibilidade comercial e consigam atingir os consumidores, a etapa do tingimento é o fator primordial para a agregação de valores. São muito observados pelos consumidores, fatores como a padronização das cores, elevado grau de fixação do pigmento quando exposto à luz solar (não desbotando facilmente), aos processos de lavagem e à transpiração, mesmo que estes materiais sejam submetidos a estes fatores por grandes períodos de tempo (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os corantes são considerados importantes compostos orgânicos pertencentes a diferentes classes orgânicas, sendo encontrados no meio ambiente decorrente de sua alta utilização industrial. Mesmo não havendo exatidão no número atual de compostos utilizados, e quantidade, produzidos, há uma estimativa como citado por Mahmoodi, Hayati e Arami (2011), que mais de 10 mil compostos diferentes são comercializados.

O volume médio de água consumido para o tingimento de cada tonelada de tecido é de aproximadamente 100 m^3 , acarretando em grande DQO (Demanda Química de Oxigênio), dando origem a uma carga orgânica muito alta nos efluentes, o que pode ser caracterizado pela forte coloração observada nas estações de tratamento de efluentes têxteis (HASSEMER, 2002).

Segundo Forgiarini (2006), os reagentes utilizados nos processos têxteis apresentam composições químicas bastante variadas, sendo formados por substâncias orgânicas e inorgânicas. Os corantes têxteis são uma mistura de compostos com estruturas moleculares complexas, característica que proporciona a esta molécula estabilidade e, por consequência, uma difícil biodegradabilidade.

Segundo Dellamatrice (2005) nos efluentes gerados na indústria têxtil também são encontrados soda cáustica, gomas, detergentes, antiespumantes, cloro, formóis, emulsões, óleos, resinas, entre outras substâncias, o que dificulta o seu tratamento. Através das análises físico-químicas observam-se dados como pH, normalmente, entre 8 e 11; sólidos totais entre 1000 e 1600 mg L^{-1} ; e teor de sólidos em suspensão entre 30 a 50 mg L^{-1} , características que estão sujeitas a variações sazonais controladas pelo tipo e etapa de processo em andamento dentro da indústria.

Estas substâncias químicas encontradas nos despejos industriais, geralmente são insumos ou produtos que auxiliam o tingimento ou acabamento, e ao final do processo, na etapa da lavagem, são removidos dos tecidos. Como a grande quantidade destes compostos não são biodegradáveis acarretam diversos problemas ambientais (CASTILLO; BARCELÓ, 2001).

É estimado que aproximadamente 20% dos corantes têxteis utilizados acabam sendo descartados como efluente devido à perda ocorrida no processo industrial, já que geralmente os corantes não pertencem à mesma classe química de outros compostos utilizados para o melhoramento das malhas, pré tratamento dos tecidos, e fixação dos corantes. Muitas vezes os grupos funcionais destes compostos possuem grandes variações de reatividade, solubilidade, estabilidade, e volatilidade requerem métodos exclusivos para que possam ser identificados, para então serem quantificados e posteriormente degradados (CARNEIRO et al., 2004).

Os corantes nitrogenados, especialmente os corantes com grupamentos azo (Figura 1) da indústria têxtil são insolúveis em água e considera-se que são sintetizados sobre a fibra no processo de tingimento.

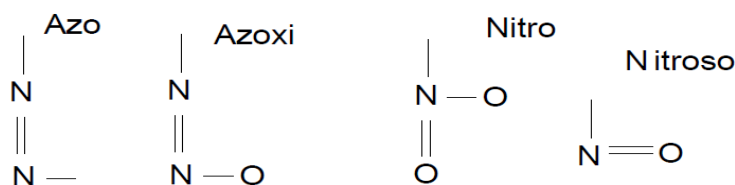


Figura 1: Grupos cromóforos constituintes dos corantes.
Fonte: Allinger et al, 1978

Nesta etapa as fibras são impregnadas com um composto solúvel em água, chamado de agente de acoplamento que apresenta grande afinidade com a celulose. Com a adição de um sal diazônio é realizada a reação de acoplamento com a substância anterior, o que produz um corante solúvel em água. O fato do uso do sistema de produção de corante diretamente na fibra, com a anterior adição de um agente precursor sem grupos sulfônicos e a formação de um composto solúvel, permite um método de tingimento de fibras celulósicas com alta fixação, alta resistência à luz e alta resistência à umidade (GUARATINI, ZANONI, 2000).

Como exemplo de composto utilizado para o tingimento das fibras têxteis, o corante Preto Reativo 5, é formado por dois grupos principais, o grupo cromóforo e a estrutura responsável pela fixação às fibras. O grupo de cromóforo mais utilizado (entre os mais diversos tipos) pertence à família dos azocorantes, representando atualmente 60% dos corantes utilizados, basicamente caracterizados por conterem grupamentos $-N=N-$ diretamente ligados aos anéis aromáticos (Figura 2) (KUNZ et al., 2002).

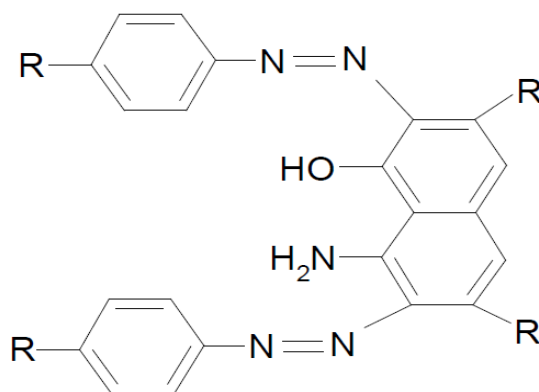


Figura 2: Estrutura química de um corante tipo azo.
Fonte: Kunz et al, 2002.

Devido a grande quantidade de compostos usados tanto no tingimento quanto na fixação dos corantes, alternativas ao tratamento químico (KAMIDA; DURRANT, 2005) relata que fungos basidiomicetos estão entre os microrganismos que são intensamente estudados para o tratamento de efluentes têxteis, enquadrados como tratamento biológico. Souza e Rosado (2009) demonstraram que estes fungos, normalmente conhecidos por degradarem lignina, apresentaram também grande eficiência na biodegradação de compostos recalcitrantes.

3.2 BIORREMEDIAÇÃO POR BASIDIOMICETOS

Segundo Oliveira (2008) biorremediação é definida como um conjunto de técnicas de remediação que podem ser utilizadas, em diversos meios contaminados, para tratar diversos tipos de contaminações por microrganismos. Esta técnica tem sido desenvolvida nos últimos anos a fim de aproveitar a grande diversidade de microrganismos, genes, ou mesmo enzimas capazes de degradar poluentes altamente tóxicos em substâncias menos nocivas ao meio ambiente (COLLA et al., 2008).

Alguns dos fatores que são levados em conta para a escolha de cada método concentração do contaminante (os quais têm os valores limites determinados pelos órgãos ambientais), toxicidade, custo final do processo, concentração final, danos gerados pelo processo de biorremediação (GUIMARÃES, 2009).

Os Basidiomicetos, que abrange o grupo de fungos degradadores de lignina, têm se mostrados eficientes agentes de descontaminação por corantes, e, conseqüentemente, potenciais recuperadores de ambientes contaminados (KAMIDA, DURRANT 2005). São conhecidas mais de 25 mil espécies de basidiomicetos, os quais são facilmente identificados por seus corpos de frutificação (cogumelos e orelhas de pau). Sua fase vegetativa é denominada micélio que são formados por diversos filamentos septados denominados hifas (PELCZAR JR.; CHAN; KRIEG, 1997).

Moreira Neto (2006) cita que os basidiomicetos lignolíticos têm a capacidade de secretar enzimas para converter grandes polímeros em moléculas com tamanhos reduzidos, podendo assim serem absorvidas e utilizadas como nutrientes para estes fungos. Este processo ocorre quando há o crescimento apical das hifas.

A classificação dos basidiomicetos degradadores de lignina ocorre de acordo com a diferença da degradação da madeira que usam como substrato, sendo possível a observação de características macroscópicas deste processo. Estes microrganismos podem ser sub divididos em (SOARES, 1998):

- Fungos da podridão branca: Degradam os três componentes principais da madeira (saber, celulose, hemicelulose e a lignina), o que os proporciona uma coloração clara.
- Podridão marrom ou parda: Degradam principalmente hemicelulose, polissacarídeos e celulose apresentando uma coloração mais escura nos locais que sofrem a degradação.
- Podridão mole: Juntamente com alguns actinomicetos são responsáveis pela degradação da parte mais resistente da madeira.

Os basidiomicetos muitas vezes são utilizados em processos biotecnológicos, devido à sua capacidade de produção de enzimas, auxiliando na redução da poluição causada por despejos de resíduos como efluentes industriais, carregados de matéria orgânica, compostos intermediários do sistema de tratamento, compostos recalcitrantes, ou mesmo, compostos não degradados, como muitas vezes os corantes da indústria têxtil são encontrados.

Como observado nos estudos publicados por Rosolen et al. (2004), Souza e Rosado (2009), Buratto e Rodrigues (2010), Ranzani (2002), entre outros, os basidiomicetos são largamente utilizados em diferentes técnicas de tratamento de corantes têxteis.

Seguindo a ideia de uma alternativa para tratamento deste tipo de resíduo, a Fermentação em Estado Sólido (FES) pode ser uma alternativa viável. Este tipo de cultivo recebeu diferentes definições, porém, de acordo com Aidoo, Hendry e Wood (1982) abrange todo cultivo que ocorre sob substrato sólido, ou mesmo, em suporte sólido nutricionalmente inerte.

O material sólido utilizado como base é geralmente de natureza granular, fragmentado ou fibroso, permitindo a retenção de água higroscopia ou capilaridade (SOCCOL et al., 1992).

Os principais microrganismos utilizados neste tipo de fermentação são os fungos filamentosos, já que este meio de cultivo se assemelha muito com o ambiente natural em que eles são encontrados (o solo ou cascas de árvores por exemplo) (SPIER 2005).

De acordo com citação feita por Soccol et al., (1992), a fermentação em estado sólido, constitui-se por um sistema de três fases (sólido – líquido – gasoso) no qual a fração sólida está diretamente ligada a fração líquida. Já a água encontra-se em três diferentes formas, e em proporções variáveis no meio de cultura sendo caracterizada como água ligada ao sólido (água de constituição), água fracamente ligada ao sólido (água de solvatação), água adsorvida por capilaridade ao sólido (água livre).

Este tipo de cultivo é largamente utilizado para obtenção de queijos tipo Roquefort, fungos comestíveis, alimentos orientais fermentados, produção de enzimas, enriquecimento proteico de produtos e resíduos agrícolas, síntese de metabólitos primários e secundários (SPIER, 2005).

Esta técnica apresenta algumas vantagens, em relação a outras formas, como a simplicidade do meio de cultura, redução dos efluentes líquidos a tratar, redução das contaminações, condições de culturas semelhantes ao meio natural. Os problemas geralmente encontrados são: elevação excessiva da temperatura, complicações nas variações de parâmetros de culturas (pH e umidade por exemplo), pré tratamento dos suportes e alta taxa de inoculação (SPIER, 2005).

3.2.1 Pleurotus

Pleurotus, da ordem dos *Agaricales*, família *Pleurotaceae*, pode apresentar diferentes espécies e linhagens, fungos com colorações salmão, azul escuro, rosa, marrom, branco, e amarelo, e o formato do píleo, que lembra o de uma concha. Este fungo tem um grande potencial aplicativo, já que é capaz de ser utilizado na degradação de componentes ligninocelulósicos, entre outras propostas biotecnológicas, como as quais são mais estudadas a descoloração de corantes, biopolpação e degradação de substâncias orgânicas. As enzimas que este fungo são capazes de metabolizar a lignina peroxidase (LiP), Manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac) (RAMOS, 2007).

a) *Pleurotus ostreatus*

Estes fungos têm características que os diferenciam de outras classes como uma estipe (lateral ou central) de consistência carnosa e basídiocarpo carnoso. O formato do seu corpo de frutificação geralmente apresenta o formato de conchas de ostras (daí a correlação que originou seu nome) e semelhante à estrutura lamelar quando unida. Por ter grande valor nutricional é comumente usado para fins terapêuticos e medicinais, além de diversas aplicações na área ambiental e largamente usado na biotecnologia (BETTIN, 2010). Este fungo apresenta bons resultados no quesito colonização e degradação dos mais diversos tipos de resíduos, tendo destaque para as estruturas ligninocelulósicas ou semelhantes (BETTIN, 2010).

Segundo Baba, Rosado e Zonetti (2009), os basidiomicetos da podridão branca apresentam-se como excelentes degradadores de compostos recalcitrantes, tendo grande destaque o gênero *Pleurotus*, além de se apresentarem como grande fonte de proteínas. Schmidt et al. (2003), observam que mesmo em situações pouco favoráveis, e não fazendo exigência

do substrato o *Pleurotus ostreatus* consegue produzir enzimas como as celobiose, lacase, ligninase, entre outras. Uma das formas de frutificação deste fungo é ilustrada na Figura 3.



Figura 3: *Pleurotus ostreatus*
Fonte: Mycoplant, 2013.

b) *Pleurotus floridae*

É uma variação do *P. ostreatus* como descrito por Kues e Liu (2000), sendo facilmente encontrados juntamente com todo o gênero *Pleurotus* em toda região tropical do planeta (KURTZMAN; ZADRAZIL, 1984).

Estes cogumelos geralmente apresentam coloração branca, rosa, marrom, amarelo e creme, porém apresentam variação da coloração quando cultivados em diferentes temperaturas (ZADRAZIL; GRABBE, 1983). Têm a vantagem, para produção nutricional em relação ao gênero *Agaricus*, pois são bem menos exigentes em relação ao substrato e condições de crescimento (SCHMIDT et al., 2003), além de apresentarem alta taxa de crescimento.

O corpo de frutificação do *Pleurotus floridae* é ilustrado na figura 4.



Figura 4: Corpo de frutificação *P. floridae*
Fonte: Figueiró, 2009.

3.2.2 *Phanerochaete chrysosporium*

Este fungo é frequentemente empregado na degradação de diversos poluentes, já que tem a capacidade de liberar altíssimas quantidades de enzimas (CUNHA et al., 2012). Bento et al. (2003), observou que o *Phanerochaete chrysosporium* foi capaz de degradar compostos estáveis e poluentes que causam grandes problemas ambientais como o benzoopireno, dioxina, DDT, atrazina e alguns PCB's.

O *Phanerochaete chrysosporium* é capaz de produzir as enzimas, liberadas por suas hifas (Figura 5), manganês peroxidase e lignina peroxidase, ambas capazes de degradar lignina, além de possibilitar a degradação de corantes e outros compostos orgânicos quando é submetido a condições adversas, além da produção de peróxido de hidrogênio que auxilia a degradação de diversos compostos (GUIMARÃES; MOTA, 1998).

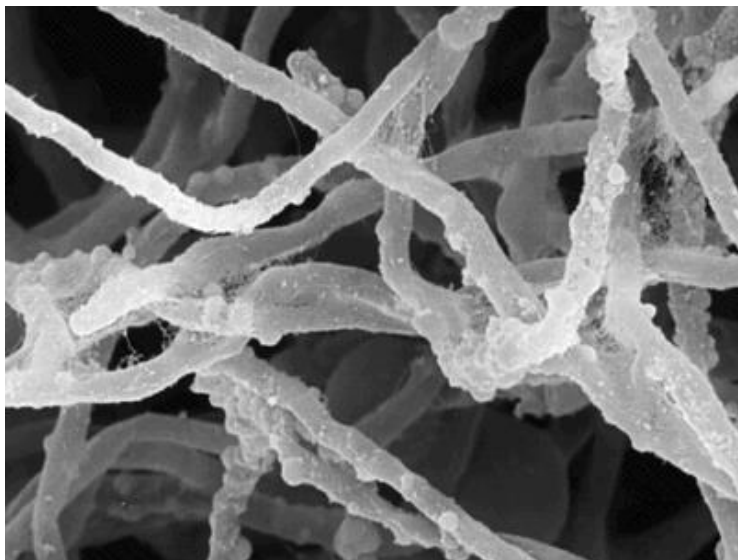


Figura 5: *Phanerochaete chrysosporium* observado no microscópio.
Fonte: JGI, 2013.

3.2.3 Sistemas Enzimáticos Encontrados nos Basidiomicetos

Estes microrganismos muitas vezes são utilizados em processos biotecnológicos, devido à sua capacidade de produção de enzimas, auxiliando na redução da poluição causada por despejos de resíduos. Moreira Neto (2006), como efluentes industriais, carregados de matéria orgânica, compostos intermediários do sistema de tratamento, compostos recalcitrantes, ou mesmo, compostos que não degradados. O sistema de degradação dos fungos é baseado em um conjunto complexo de enzimas que são secretadas no material. As reações que ocorrem são catalisadas por oxidoredutases do tipo lacases e peroxidases (MELO; AZEVEDO, 1997).

As lacases são polifenol oxidases encontradas nos fungos da podridão branca e em insetos, plantas, e até mesmo em bactérias. As lacases produzidas pelos fungos da podridão branca são glicoproteínas contendo até 550 aminoácidos constituídos de quatro íons Cobre, localizados em três sítios reacionais. Estes íons desempenham papéis importantes nas reações catalíticas que ocorrem a partir do substrato fenólico, enquanto o oxigênio molecular é utilizado para a formação de água. Esta enzima pode atuar sobre

diversos compostos, o que a concede grande versatilidade biotecnológica, geralmente aplicada na indústria têxtil, celulósica, cosmética, na degradação de xenobióticos, síntese inorgânica e produção de detergentes (SILVA et al., 2012).

As peroxidases são caracterizadas pela catálises de reações pela transferência de um átomo de hidrogênio de um composto para outro. Estas enzimas representam o maior grupo de enzimas das atividades metabólicas dos fungos, além de estarem muitas vezes relacionadas com produção de melaninas e outros pigmentos (CONCEIÇÃO; ANGELIS; BIDOIA, 2005).

3.3 ESPUMAS POLIURETANAS (EPU'S)

As espumas podem ser definidas como materiais em que parte da fração da massa sólida é substituída por uma fração de massa de gás. Este processo aumenta consideravelmente a área superficial devido às falhas/bolhas geradas no interior do material favorecendo, por consequência, grande aplicação nos processos de adsorção. A produção deste tipo de espuma tem a rota mais comumente utilizada a reação dos grupamentos hidroxilas localizados na região terminal de um poliéster com grupamentos isocianatos. A forma e as condições que essas reações ocorrem irão determinar as características dos polímeros (BRAUN; NAVRATIL; FARAG, 1985).

O aumento da utilização e da importância destas espumas ocorreu após o estudo pioneiro de Bowen (1970), o qual já havia sugerido que as espumas de poliuretana já serviriam para a retenção de diferentes espécies químicas. Estas espumas podem ser utilizadas diretamente em sua forma inicialmente produzida, sem qualquer tipo de tratamento prévio (CASSELLA et al., 2000; FARAG; EL-SHAHAWI 1991; EL-SHAHAWI; AL-DAHERI 1996; ALMEIDA et al. 2007; CASSELLA et al. 1999) ou modificações podem ser feitas por meio de carreadores, agentes quelantes, adição de íons, ou, até mesmo, outras substâncias líquidas (ALEXANDROVA; ARPADJAN 1995; SANT'ANA et al.

2004; CASSELLA et al., 2001; BRAUN; HUSZAR; BAKOS, 1973; BRAUN; FARAG 1972).

A versatilidade das espumas de poliuretana, como constatado por Bowen (1970), é decorrente de que em sua estrutura são encontrados muitos grupamentos polares, e muitos outros apolares. As estruturas apolares podem ser utilizadas na adsorção de compostos extremamente apolares como compostos aromáticos, ditizonatos metálicos, entre outros. Já os polares são úteis na retenção de ânions que apresentem grande polaridade.

São propriedades importantes das espumas de poliuretana nas suas aplicações a alta capacidade de isolamento, térmico e sonoro, com espessura reduzida; Ser um material leve; Possuir alta resistência mecânica; Ser quimicamente e biologicamente resistentes; Possuir durabilidade; E atender aos regulamentos contra incêndios em certas aplicações específicas (SEPÚLVEDA, 2010).

Os grupamentos presentes nas espumas de poliuretana podem ser formados, por diversos compostos como amidas, ureia, ligações éster, ligações éter, biureto entre outros (SEPÚLVEDA, 2010).

Os estudos de Fogaça (2007), Avelar (2012), e Silveira Neta (2011) são exemplos de como as espumas de poliuretana podem ser utilizadas para a adsorção de corantes têxteis, abrindo oportunidades para que esta matriz formada (corante adsorvido + espuma de poliuretana) seja objeto de estudo para novas pesquisas com o intuito de aplicar uma forma de tratamento destes corantes, e não apenas, transferi-los de fase.

Alguns fatores podem interferir no processo de adsorção das espumas poliuretanas, porém, esta interferência nem sempre é prejudicial ao estudo. Entre os fatores mais estudados estão a temperatura, a área superficial do sólido, a concentração inicial e o tamanho das moléculas do composto a ser adsorvido, a velocidade da agitação em que o sistema for submetido e o pH (ACCIOLY, 2008).

São diversas as aplicações para a adsorção utilizando espumas de poliuretana, entre elas estão à adsorção de luganil azul, um corante gerado na indústria de curtumes, o qual teve adsorção média de 74,2% em pH 2,60 pesquisado por Accioly (2008), a purificação de gás natural removendo mercúrio e contaminantes à base de enxofre, obtendo eficiência de remoção na

ordem de 83% como demonstrado por Ferreira (2006), recuperação do metal Índio através da adsorção e posterior sorção em espumas de poliuretanas obtendo valores de $(1.55 \pm 0.02) \times 10^{-1} \text{ mol.kg}^{-1}$ e $(7.0 \pm 1.3) \times 10^4 \text{ L.g}^{-1}$, respectivos a capacidade de saturação e coeficiente de adsorção “b” (FERREIRA et al., 2004), aplicado por Zeck (2004) no tratamento de óleo mineral isolante contaminado por bifenilas policloradas atingindo 53% de adsorção, além dentre muitas outras aplicações, a adsorção de corantes têxteis, demonstrado na pesquisa de Mori e Cassela (2008), que alcançou 92% de retenção do corante catiônico Violeta Cristal. Villalobos et al., (2013), avaliou a adsorção por diferentes composições de espumas de poliuretana do corante vermelho procion, e obteve valores correspondentes a 90,89% de adsorção. Mori e Cassela (2008) realizou um estudo da sorção do corante catiônico Violeta Cristal por espuma de poliuretano em meio aquoso contendo dodecilsulfato de sódio obtendo 93% de remoção do corante nas condições otimizadas, entre diversos outros exemplos.

3.4 RESPIROMETRIA

O termo respirometria é utilizado como descrição do consumo de oxigênio pela população de microrganismos, presentes em uma certa quantidade de solo, efluente ou outros materiais que podem ser utilizados como aporte de crescimento, e que contenha um contaminante, sendo este, adicionado com intuito da realização de uma pesquisa ou mesmo, já presente na amostra coletada de um local específico. O consumo de O_2 em condições aeróbicas é proporcional à biomassa ou a matéria orgânica degradada (ANDREO, 1999).

Experimentos respirométricos têm sido utilizados para avaliar a degradabilidade e a eficiência de diferentes sistemas envolvendo formas distintas de contaminação, além de proporcionar alternativas para o gerenciamento de estações de tratamentos de efluentes ou biorremediação de

solos contaminados por se tornar um parâmetro de fácil observação para a toxicidade do composto estudado (ANDREO, 1999).

Como citado por Fielder e Grunda (1997), grande parte dos organismos utiliza oxigênio para as oxidações enzimáticas e para a geração de novas células, e no final do processo, CO_2 é liberado. A respiração é um processo de fornecimento de energia a nível celular, já que o oxigênio reduz compostos orgânicos e inorgânicos que liberam elétrons. Tomando esta informação como base, pode-se concluir que na respiração microbiana, tendo consumo de O_2 , ou liberação de CO_2 , comunidades vivas estão metabolizando fontes que irão servir como alimento.

A taxa de respiração é quantidade de O_2 em um determinado período de tempo, consumido pela população microbiana estudada, sendo que esta medição estabelece relação direta ao crescimento microbiano e consumo do substrato (SPANJERS et al, 1996).

4 METODOLOGIA

A pesquisa foi dividida em quatro etapas, demonstrada da seguinte forma: Etapa 1, Curva analítica e otimização da adsorção do corante na espuma de poliuretana; Etapa 2, Estudos cinéticos de adsorção do corante na condição previamente otimizada; Etapa 3, Seleção do fungo que apresenta maior velocidade de crescimento em meio solidificado com corante preto reativo; Etapa 4, Acompanhamento da biodegradação do corante preto reativo 5 adsorvido em espuma poliuretana, pela técnica de respirometria. A Figura 6 esquematiza em forma de fluxograma todo o procedimento.

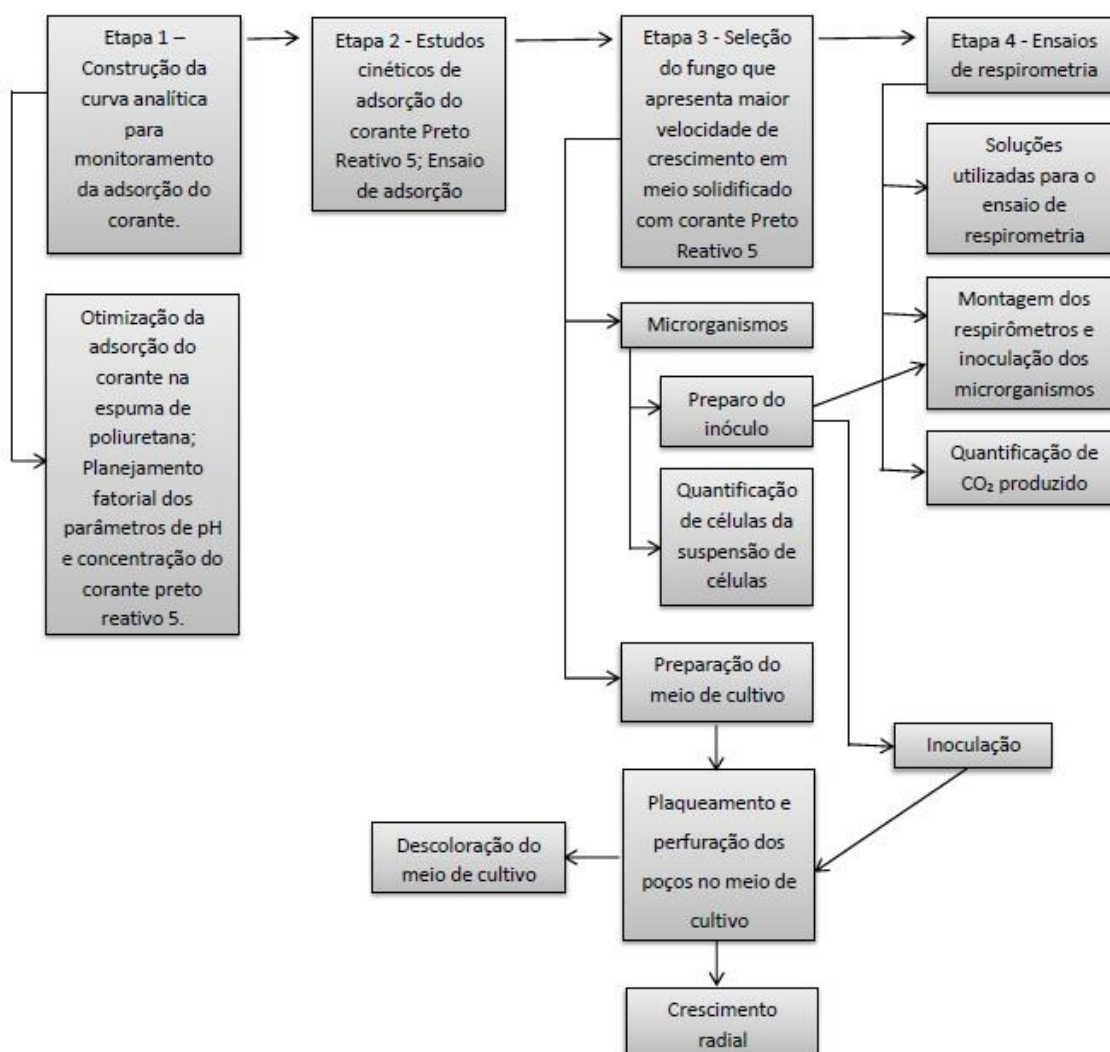


Figura 6: Fluxograma representativo da metodologia.

4.1 ETAPA 1 – CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA MONITORAMENTO DA ADSORÇÃO DO CORANTE.

Foi construída uma curva analítica utilizando soluções de corante Preto Reativo 5, realizando diluições a partir de uma solução estoque de 100 mg.L^{-1} . As concentrações utilizadas foram (em mg.L^{-1}): 1, 5, 10, 15, 20, 25, e 30. As amostras de preto reativo 5 foram levadas para leitura da absorbância da solução na faixa de 190 a 800 nm, em espectrofotômetro Varian Cary 50 concentration sendo usado o comprimento de onda de absorção máxima do corante, 598 nm, para monitorar a concentração da solução de corante Preto Reativo 5 após os ensaios de adsorção.

4.1.1 Otimização da Adsorção do Corante na Espuma de Poliuretana.

Um planejamento fatorial foi realizado para otimizar as condições de adsorção do corante Preto Reativo 5 em espuma de poliuretana e determinar os valores de pH e concentração do corante para o estudo cinético.

4.1.2 Planejamento Fatorial dos Parâmetros de pH e Concentração do Corante Preto Reativo 5.

O planejamento fatorial (GALDÁMEZ, 2002) que teve por objetivo avaliar o efeito das variáveis experimentais (pH e concentração do corante) para as melhores condições do processo de adsorção. Deve-se ressaltar, como citado por Mall, Srivastava, e Agarwal, (2006), a mudança do pH altera a carga superficial do adsorvente e conseqüentemente o grau de ionização de diferentes poluentes. Esta variável pode alterar o processo de adsorção por

meio da dissociação de grupos funcionais presentes nos sítios ativos do adsorvente. Já o corante pode se tornar tóxico aos fungos caso esteja em uma concentração muito elevada (tendo como referência os microrganismos estudados), assim como qualquer composto pode se tornar tóxico a partir de certas concentrações. Devido a este fato, foi determinado que as concentrações do corante utilizadas no experimento seriam de $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$, 25 mg.L^{-1} e 50 mg.L^{-1} .

Cada variável foi estudada em dois fatores e dois níveis, acrescidos de três pontos centrais, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Planejamento fatorial para avaliação do efeito das variáveis pH e concentração do corante preto reativo 5 na adsorção pela espuma de poliuretana.

VARIÁVEL	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
pH	6	7	8
Concentração do corante (mg.L^{-1})	12,5	25	50
Experimento	Concentração do corante	pH	
1	-	-	
2	+	-	
3	-	+	
4	+	+	
5	0	0	
6	0	0	
7	0	0	

Para a realização dos ensaios foi preparada uma solução estoque de Corante Preto Reativo 5, com concentração de 100 mg.L^{-1} , utilizando corante comercial e água Mili-Q. A partir desta solução estoque foram realizadas diluições para a concentração desejada. O pH foi ajustado para os valores desejados no estudo utilizando solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, NaOH $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e HCl $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. As variáveis de concentração e pH foram determinadas com base no planejamento fatorial descrito a Tabela 1. A espuma de poliuretana utilizada foi cedida pelo grupo Tecotrater e continha os seguintes constituintes: Polietilenoglicérol, 4,4-difenilmetano diisocianato, glicérol, água e montimorilonita 3%.

Foram utilizados 100 mg de espuma de poliuretana cortada em pequenos pedaços (de aproximadamente 1cm X 1cm X 1cm), 250 mL de solução de corante, a agitação ocorreu em shaker a 120 rpm em temperatura ambiente com coleta de amostras em 15 e 30 minutos.

4.2 ETAPA 2 - ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5.

Nas condições otimizadas os estudos cinéticos de adsorção foram feitos inicialmente em incubadora shaker a 120 rpm e temperatura ambiente (OLIVEIRA; UGARTE 2004), porém com o andamento do experimento, também foram realizados estudos de adsorção utilizando agitadores magnéticos. Foi utilizado 100 mg de espuma de poliuretana para 50 mL de solução de Preto Reativo 5. As amostras de 3 mL foram coletadas nos minutos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 para que pudesse ser encontrado o tempo em que a espuma de poliuretana alcançasse a saturação, em seguida, foi realizado a leitura no espectrofotômetro UV-VIS.

4.3 ETAPA 3 - SELEÇÃO DO FUNGO COM MAIOR VELOCIDADE DE CRESCIMENTO EM MEIO SOLIDIFICADO COM CORANTE PRETO REATIVO 5.

4.3.1 Microrganismos

Os fungos utilizados neste trabalho foram: *Pleurotus ostreatus* POS 560, *Pleurotus floridae* PSP 1 e *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725.

4.3.1.1 Preparo do inóculo

Após ativação foi coletado uma pequena quantidade de micélio com o auxílio de uma alça de metal e transferido para frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura Potato Dextrose Ágar (PDA, em português ágar batata dextrose) estéril, com posterior incubação pelo período de sete dias a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Em seguida foi preparada 50 mL de solução de água peptonada 1g.L^{-1} em erlenmeyers, a qual foi adicionada 0,2% de Tween 80, aproximadamente 3 g de pérolas de vidro, e uma barra magnética para agitação, além de tubos de ensaio estéreis. O conjunto foi autoclavado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1,1 atm por 15 minutos, para a suspensão de esporos e células. A suspensão foi armazenada em geladeira a 4°C por até 30 dias (SPIER, 2005).

O conteúdo dos erlenmeyers foi vertido sobre a cultura fúngica, ao término do cultivo. O conjunto foi levado ao agitador magnético, ficando $15\text{ min} \pm 1\text{ min}$ em rotação suficiente para promover a dispersão de esporos, mas capaz de formar espuma (SPIER, 2005).

Com este processo, foi obtida uma suspensão de células a qual foi quantificada já em seguida. Segundo SPIER (2005), esta suspensão pode ser armazenada em geladeira, com temperatura próxima a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 30 dias para posterior uso. Contudo, com basidiomicetos o número de células funcionais sofre um decréscimo ao longo do período (DUWE, 2009), sendo necessária recontagem em placa toda vez que a suspensão de células for utilizada (DUWE, 2013). Com esta informação, foi tomado o cuidado para que o tempo máximo de armazenamento não ultrapassasse duas semanas.

4.3.1.2 Quantificação de células

Foram duas as formas de quantificação de células: a) a contagem em câmara de Neubauer e b) a contagem de células viáveis em placas.

a) Contagem em câmara de Neubauer

Esta técnica, realizada com auxílio de um microscópio ótico, pode ser considerada como um recurso rápido. É utilizada para contagem de algas unicelulares, hemácias e fungos. A câmara de Neubauer, é ilustrada na Figura 7.



Figura 7: Câmara de Neubauer

Fonte: Hezasystems Group

Estas câmaras apresentam área reticulada, com profundidade determinada de 0,1 mm, em duas áreas com nove quadrantes de 1 mm² cada, como ilustrado na Figura 8, totalizando 9 mm³ de volume (SPIER, 2005).

Após a preparação das diluições seriadas, foi adicionado 1 mL de solução de suspensão de células ao quadrante C da câmara de Neubauer, ilustrado na figura 8, e então, foram contados 7 quadrículos, excluindo o maior e o menor valor obtido. O cálculo do n^o de células por mL foi definido por:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de Células.mL}^{-1} = [(\text{n}^{\circ} \text{ de células total}/0,1 \text{ mm}^3) \cdot (1000 \text{ mm}^3/1 \text{ mL}) \cdot \text{fator de diluição}] \text{ (SPIER, 2005).}$$

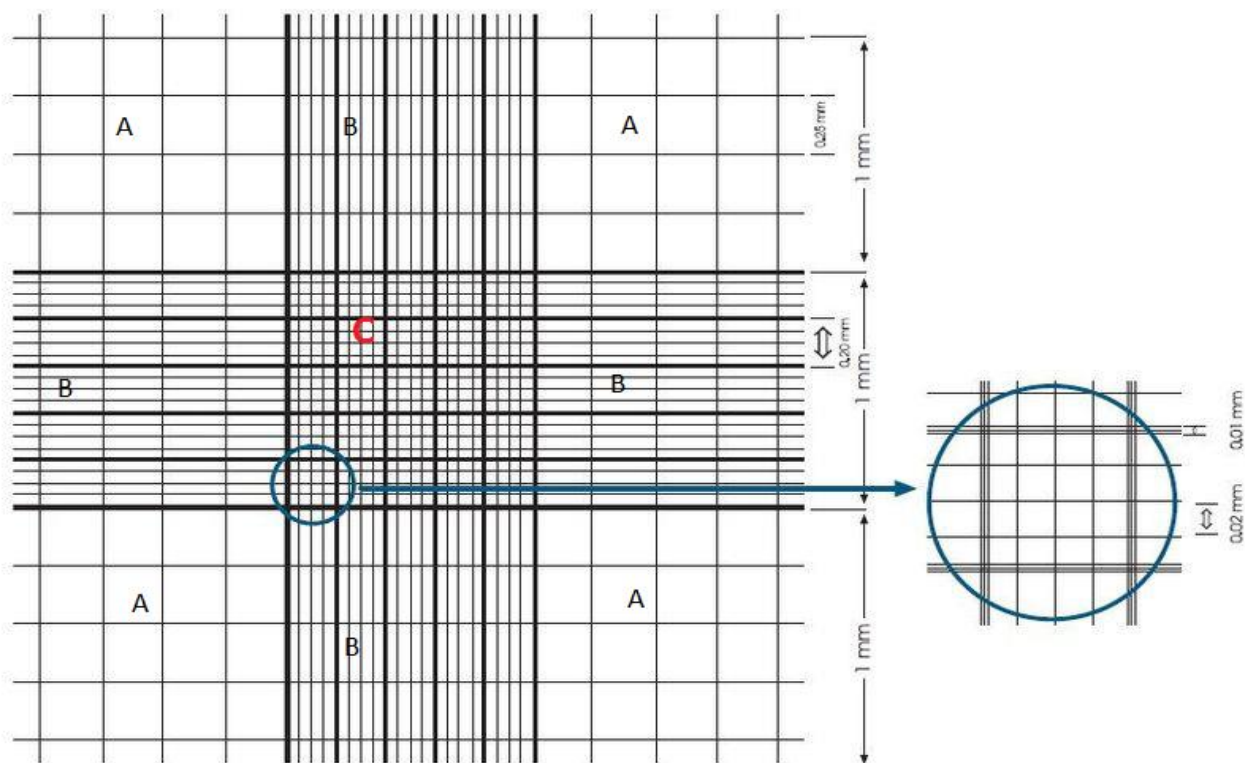


Figura 8: Gabarito da câmara de Neubauer

Fonte: Wikipédia

b) Contagem em placas.

Utilizando volume de 0,1 mL da suspensão de células em uma diluição foi inoculado em placa de Petri com PDA utilizando-se a técnica de espalhamento, e levado a incubação por 24-72 horas a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foi realizado a contagem de colônias, e o valor foi expresso em $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Unidades Formadoras de Colônias por mililitro) (SPIER, 2005).

4.3.2 Preparação do Meio de Cultivo Com Corante Preto Reativo 5.

Foi realizado um planejamento fatorial para cada fungo estudado, afim de, encontrar a melhor condição de degradação em meio sólido. Para estes ensaios foram utilizados as mesmas condições de pH e concentração do corante descritas na Tabela 1.

Os testes foram realizados em duplicata para os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus floridae* e *Pleurotus ostreatus*.

Os ensaios foram realizados em placas de Petri, utilizando ágar-ágar a 1,5% esterilizado a 121 °C, a 1,1 atm por 15 minutos. Com o ágar ainda no estado líquido foi adicionado a massa do corante Preto Reativo 5 necessária para formar as concentrações desejadas de corante, e, o pH foi ajustado para as condições do estudo. Pode-se observar a Tabela 2 para melhor entendimento.

Tabela 2: Confeção dos meios de cultivo em determinadas concentrações e pH utilizados para a inoculação dos fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus floridae* e *Pleurotus ostreatus*.

pH	Concentração		
	12,5 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹	50 mg.L ⁻¹
6	X		X
7		X	
8	X		X

4.3.3 Plaqueamento e Perfuração dos Poços no Meio de Cultivo

O plaqueamento ocorreu em câmara de fluxo laminar, devidamente higienizada e com os aparatos necessários, com o meio de cultivo, já acrescido de corante e pH ajustado. Verteu-se 20 mL de solução em placa de petri, e após o ágar solidificar, foi levado à geladeira por 120 min \pm 10 min para a completa formação e fixação da camada formada, chamada de camada basal. Em seguida, voltaram-se as placas para a câmara de fluxo laminar para a formação da segunda camada, a qual caracteriza a técnica de inoculação em poços. Com o auxílio de um cilindro de metal também autoclavado e resfriado a temperatura ambiente, colocado sempre o mais aproximado possível do centro da placa, verteu-se mais 20 mL de solução ágar + corante, esperado o resfriamento também foi levado a geladeira por mais 120 min \pm 5 min. Então as placas de Petri foram novamente levadas a câmara de fluxo laminar e, com movimentos circulares exercidos pelo dedo indicador, com cuidado para não rasgar nenhuma das camadas de ágar, foi feito a retirada dos cilindros de metal, e pôde-se observar a formação dos “pocinhos” (FERRONATTO; SALMASO, 2010).

4.3.4 Crescimento Radial

A inoculação dos microrganismos nas placas de Petri foi realizada adicionando-se 0,1 mL da suspensão de células, descrito no item 4.3.1.1, nos poços. As placas foram incubadas em estufa a 26 °C \pm 2 °C, até que fosse possível observar que o micélio fúngico atingiu a borda da placa, determinando o final da medição do crescimento.

Os dados foram coletados com ajuda de um paquímetro, medindo a distância do centro do poço até a extremidade do micélio, seguindo um dos

quatro eixos que dividiam a placa de Petri em quatro partes (COLLA, 2008; FAN; SOCCOL, 2001), como pode ser observado na Figura 9.

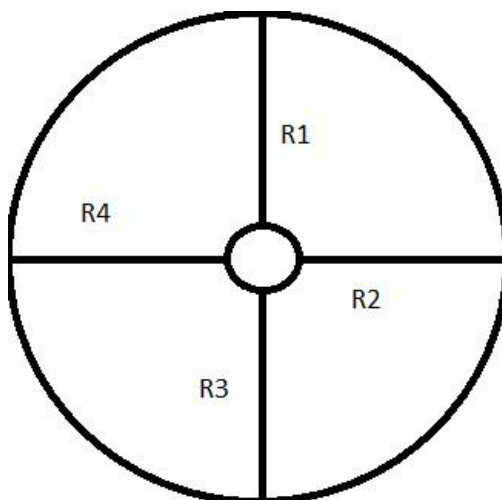


Figura 9: Esquema do traçado para a medida do crescimento radial.

A velocidade de crescimento foi determinada pela divisão da média de cada triplicata pelo número de dias que o experimento ocorreu, fornecendo o resultado em mm.dia^{-1} .

4.3.5 Descoloração do Meio de Cultivo

Após a observação do crescimento encerrada as placas com as colônias foram recolocadas na estufa a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por cinco dias para que os microrganismos pudessem dar continuidade ao processo de degradação do corante, o qual foi determinado visualmente.

4.4 ETAPA 4 - ENSAIOS DE RESPIROMETRIA

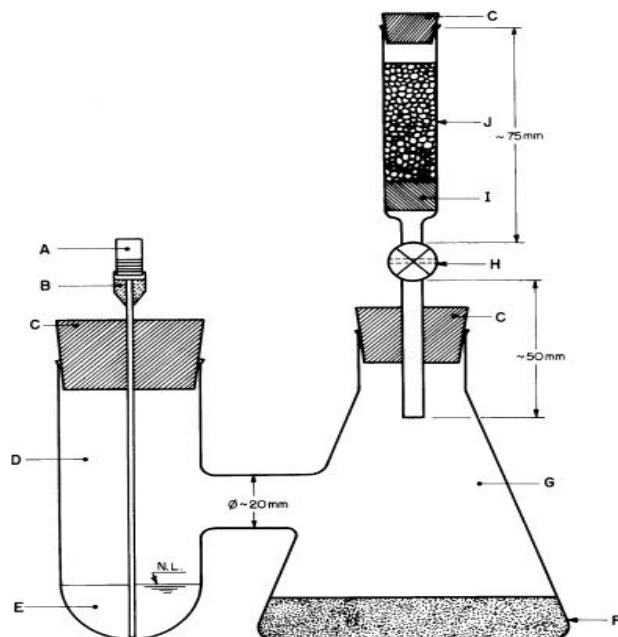
Consistiu na montagem dos respirômetros de Bartha como indicado na NBR 14283 (1999), e na quantificação do CO₂ produzido pelo microrganismo que apresentou maior velocidade de crescimento e descoloração (ETAPA 3) em meio sólido. Foi realizada a inoculação do microrganismo à espuma de poliuretana com corante Preto Reativo 5 adsorvido, nas melhores condições.

4.4.1 Soluções Utilizadas Para o Ensaio de Respirometria

Seguiu-se a metodologia segundo a NBR 14283 (1999). O volume de solução de KOH recomendado pela Norma de 10 mL e foi substituído por 20 mL para manter a proporcionalidade já que a quantidade de espuma utilizada foi de 100 g ao invés da massa sugerida pela norma, que é de 50 g. Esta medida foi tomada para haver maior área de crescimento do fungo e para que pudesse facilitar na visualização dos resultados.

4.4.2 Inoculação do Microrganismo

No compartimento G do respirômetro ilustrado na Figura 10 foi adicionado 100 mg de espuma de poliuretana com o corante Preto Reativo 5 adsorvido, e então inoculado 1 mL da suspensão de células, contendo 18×10^5 cel.g⁻¹ de EPU.



A - Tampa da cânula B - Cânula (\varnothing entre 1 m e 2 m), com canhão Luer C - Rolha de borracha D - Braço lateral (\varnothing ~40 m; H~100 m) E - Solução de KOH F - Solo G - Frasco de Erlenmeyer (250 mL) H - Válvula I - Suporte (lã de vidro ou algodão) J - Filtro de ascarita (\varnothing ~15 m; H~ 40 m)

Figura 10: Respirômetro de Bartha
Fonte NBR 14283 (1999)

4.4.3 – Quantificação de CO₂ Produzido

Foi retirado o volume de KOH existente na cânula do respirômetro a cada 24 horas \pm 1 hora por 15 dias. O experimento ocorreu em temperatura ambiente, com média de 26 °C.

O experimento foi realizado em triplicata, gerando 3 amostras. Para cada amostra foram preparados dois frascos Erlenmeyer contendo 1 mL de solução de Cloreto de Bário, e duas gotas de fenofaleína. No primeiro Erlenmeyer foi adicionado o KOH do respirômetro retirado com auxílio de uma seringa, No segundo Erlenmeyer foi adicionado 60 mL de água isenta de CO₂ que foi utilizada para a lavagem do respirômetro.

Imediatamente foi realizada a titulação das soluções de KOH + Cloreto de Bário + fenofaleína contra HCl, e anotado o volume para posteriores cálculos. Deve-se ressaltar que os valores dos dois Erlenmeyers foram

somados, já que o objetivo do segundo é exclusivamente retirar algum volume residual de KOH que pudesse ter permanecido no recipiente.

A quantificação de CO₂ feita com base nos cálculos realizados tendo como base a fórmula

$$\text{mg de CO}_2 = (V \text{ HCl}_{\text{branco}} - V \text{ HCl}_{\text{amostra}}) * 50 * f\text{HCl}$$

Onde:

HCl_{branco} = volume de HCl utilizado para neutralizar o KOH do branco.

V HCl_{amostra} = volume de HCl utilizado para neutralizar o KOH da amostra.

fHCl = fator de correção do HCl (NBR 14283).

“50” = fator para transformar o equivalente em mol de CO₂.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ETAPA 1 - CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA MONITORAMENTO DA ADSORÇÃO DO CORANTE.

5.1.1 Curva Analítica da Solução de Preto Reativo 5.

Uma curva analítica foi preparada para a determinação da concentração de corante Preto Reativo 5 em solução após os ensaios de adsorção. As soluções foram preparadas em balões volumétricos de 100 mL (Figura 11), nas concentrações de 1 mg.L^{-1} , 5 mg.L^{-1} , 10 mg.L^{-1} , 15 mg.L^{-1} , 20 mg.L^{-1} , 25 mg.L^{-1} , 30 mg.L^{-1} , 40 mg.L^{-1} , e 50 mg.L^{-1} .



Figura 11: Soluções padrão de corante Preto Reativo 5, da esquerda para a direita: 1 mg.L^{-1} , 5 mg.L^{-1} , 10 mg.L^{-1} , 15 mg.L^{-1} , 20 mg.L^{-1} , 25 mg.L^{-1} , 30 mg.L^{-1} , 40 mg.L^{-1} , e 50 mg.L^{-1} .

Com a leitura dos padrões no espectrofotômetro UV-VIS, utilizando o comprimento de onda de 598 nm, pode-se obter a curva analítica mostrada na Figura 12.

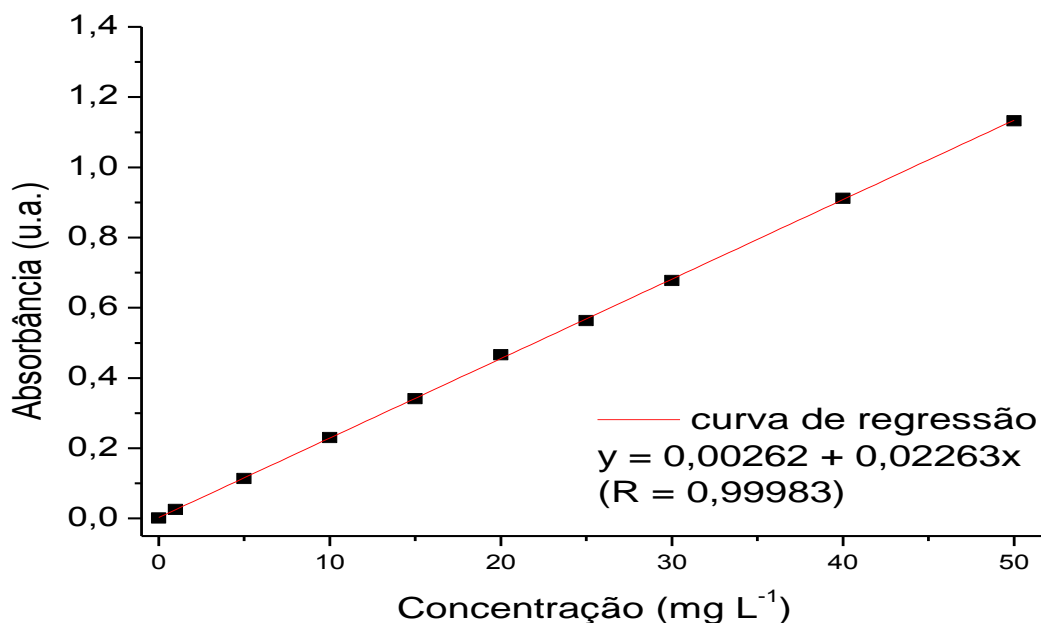


Figura 12: Curva analítica das soluções de corante Preto Reativo 5, analisadas em 598 nm.

Com a montagem da curva analítica, obteve-se a equação da reta, que foi utilizada para a determinação das concentrações de cada solução após o experimento de adsorção. Com os valores de absorbância fornecidos pelo espectrofotômetro UV-VIS foi possível calcular a concentração final de corante Preto Reativo 5 na solução, após o processo de adsorção.

Os valores encontrados para os coeficientes foram, $a = 0,00262$ e $b = 0,02263$. O termo “x” representa a concentração do corante Preto Reativo 5 na solução, e o termo “y” o valor da absorbância.

O gráfico foi constituído por dez concentrações diferentes atendendo ao dobro de pontos exigidos pela ANVISA (2003).

Já o coeficiente de correlação da reta, representado por “R”, teve valor obtido de 0,99983, indicando que as amostras apresentaram uma boa linearidade na faixa de trabalho avaliado.

5.2 ETAPA 2 - ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5; ENSAIO DE ADSORÇÃO

5.2.1 Teste preliminar

Para a determinação da melhor condição da adsorção do corante Preto Reativo 5 na espuma de poliuretana, foi realizado um teste utilizando a agitação em shaker a 120 rpm e agitador magnético em velocidade para formação de vórtice de ± 1 cm. As soluções de corante Preto Reativo 5 utilizadas foram as selecionadas no planejamento fatorial (item 4.1.2) nas concentrações e pH demonstradas na Tabela 3:

Tabela 3: Concentrações e pH utilizados nos ensaios preliminares de adsorção.

pH	Concentração		
	12,5 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹	50 mg.L ⁻¹
6	X		X
7		X	
8	X		X

O teste ocorreu por 30 minutos, sendo que foram retiradas amostras de 3 mL da solução com 15 e 30 minutos de agitação.

O menor valor de absorvância foi verificado na amostra de concentração 50 mg.L⁻¹ e pH 6 coletada aos 30 minutos do agitador magnético, apresentando redução de 19,7% do sinal inicial, concluindo que nesta condição houve maior adsorção do corante PR5. A Figura 13 ilustra o decaimento da absorvância de todas as amostras do teste preliminar.

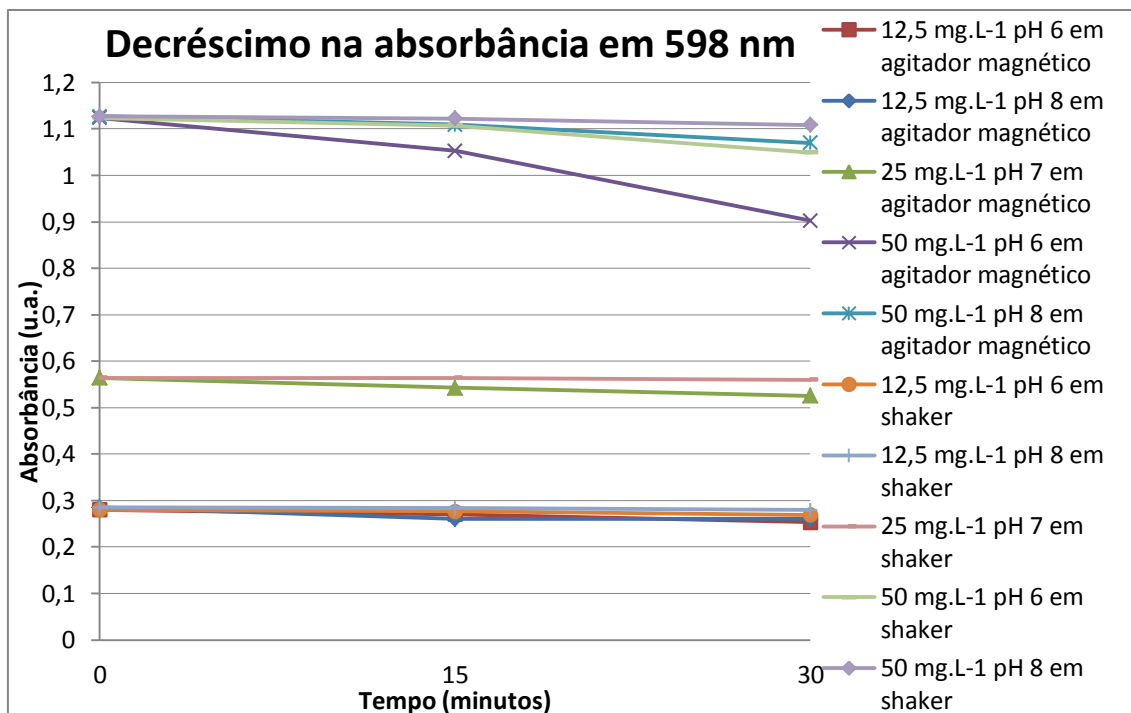


Figura 13: Decréscimo na absorbância do teste preliminar.

5.2.2 Adsorção na melhor condição

Foram submetidos à agitação (em agitador magnético) três frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mg de espuma de poliuretana em 50 mL de solução de corante Preto Reativo 5 na concentração de 50 mg.L^{-1} e pH 6, e 1 frasco erlenmeyer contendo apenas espuma de poliuretana e solução Padrão de corante Preto Reativo 5 na concentração de 50 mg.L^{-1} , por 120 minutos em temperatura ambiente, realizando coleta de amostras de 3 mL a cada 10 minutos.

Foi possível observar que a adsorção máxima ocorreu no tempo de 110 minutos como ilustrado na Figura 14. Após o constante decaimento da absorbância, houve um ligeiro aumento no tempo 120 minutos, indicando que a saturação do adsorvente foi alcançada e que ocorreria um equilíbrio na dessorção/adsorção, não havendo mais necessidade da continuidade do experimento.

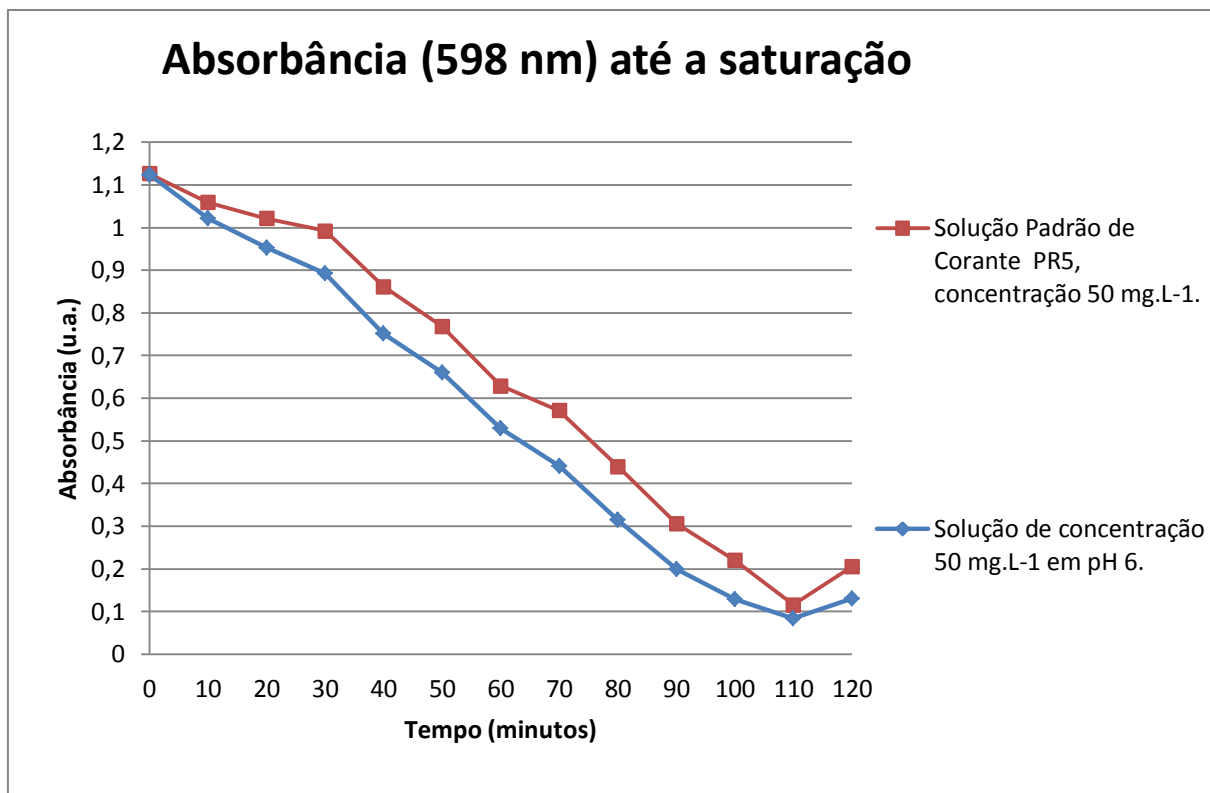


Figura 14: Gráfico da variação de absorbância do ensaio na melhor condição.

Os valores da absorbância obtida, assim como a porcentagem de corante Preto Reativo 5 adsorvidos pela espuma de poliuretana estão exemplificados na tabela 4.

Tabela 4: Resultados do ensaio de adsorção utilizando a condição ideal.

	Solução Padrão de Corante PR5, sem ajuste de pH.	Solução de concentração 50 mg.L ⁻¹ em pH 6.
Absorbância inicial (nm)	1,1269	1,1238
Absorbância obtida após ensaio de adsorção (nm)	0,1156	0,0833
Concentração calculada na solução após adsorção (mg.L ⁻¹)	5,23	3,80
% de massa de PR5 em solução	10,45	7,60
Concentração adsorvida (mg.L ⁻¹)	44,76	46,2
% de massa de PR5 Adsorvida	89,55	92,4

Analisando a tabela 4, é possível constatar o aumento da adsorção do corante na espuma de poliuretana sem alteração do pH contra a solução que teve o pH alterado para 6, este valor pode ser considerado pequeno em porcentagem, porém quando os transformamos para miligramas, é constatado que houve aumento na adsorção de 1,44 mg.

O resultado expresso em porcentagem de adsorção do corante Preto Reativo 5 pela espuma de poliuretana, está próximo dos valores alcançados por autores como Mori e Cassela, (2008), que utilizou um cilindro de espuma de poliuretana na adsorção do corante Violeta Cristal em condições otimizadas, e agitação durante quatro horas obtendo 93% de adsorção.

Villalobos et all., (2013), demonstrou em seu estudo porcentagens de adsorção do corante Vermelho Procion para quatro variações de espumas de poliuretanas, sendo que a espuma de poliuretana sem celulose apresentou remoção de 83,82%, a poliuretana com celulose sem modificar obteve 75,66%,

poliuretana com celulose modificada com MDI na proporção de 1:1 encontrou 90,89% de adsorção, e poliuretana com celulose modificada com MDI na proporção de 3:1 obteve 84,32% de adsorção.

5.3 ETAPA 3 - SELEÇÃO DO FUNGO QUE APRESENTA MAIOR VELOCIDADE DE CRESCIMENTO EM MEIO SOLIDIFICADO COM CORANTE PRETO REATIVO 5.

5.3.1 Contagem de Células dos Fungos

Com os fungos ativados e purificados foi feita a contagem para determinação da quantidade de células presentes na suspensão de células, em câmara de Neubauer e contagem em placas, sendo os resultados apresentados na tabela 5:

Tabela 5: Contagem do número de células presentes na suspensão microbiana utilizada na inoculação dos experimentos.

Fungo:	Contagem em câmara de Neubauer (cel.mL ⁻¹):	Contagem em placas (UFC.mL ⁻¹):
<i>Pleurotus floridae</i>	9 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵
<i>Pleurotus ostreatus</i>	3 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1,8 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸

O *Phanerochaete chrysosporium* teve a produção de células superior ao *P. floridae* e ao *P. ostreatus*. Muito provavelmente esta maior concentração de células influenciará nos resultados de velocidade de crescimento radial e descoloração. Isso indica que para trabalhos futuros o número de células deve ser padronizado entre os microrganismos testados.

5.3.2 Avaliação do Crescimento Radial e Descoloração.

Foram observadas duas fases nesse procedimento, sendo elas divididas em Fase de crescimento radial, onde pôde-se observar o crescimento fúngico, com descoloração do corante quase nula, e a fase de descoloração, onde possivelmente ocorreu a destruição do grupamento cromóforo, fazendo com que o composto perdesse a coloração azulada.

No quarto dia de incubação percebeu-se que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* esteve na iminência de atingir a borda da placa de Petri, determinando assim, o encerramento desta etapa.

A velocidade de crescimento radial (mm.dia^{-1}) está indicado na Tabela 6 e sua representação esquemática é observado na Figura 16.

Tabela 6: Valores de velocidade de crescimento radial (mm.dia⁻¹) para os três fungos, em todas as condições estudadas.

	Concentração 12,5 mg.L ⁻¹		Concentração 25 mg.L ⁻¹	Concentração 50 mg.L ⁻¹	
	pH 6	pH 8	pH 7	pH6	pH8
<i>Pleurotus ostreatus</i>	6,291 ±0,466	6,797 ±0,513	6,974 ±0,363	6,225 ±0,229	6,228 ±0,425
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	8,081 ±0,291	7,828 ±0,533	7,767 ±0,230	9,712 ±0,349	7,175 ±0,655
<i>Pleurotus floridae</i>	7,365 ±0,367	4,997 ±0,334	6,198 ±0,392	4,713 ±0,462	4,684 ±0,290

Considerando a velocidade de crescimento radial (VCR) indicada na Tabela 6, pôde-se observar que na concentração de 12,5 mg de corante por litro, para o *P. ostreatus* e para o *Phanerochaete chrysosporium* não foi observada a influência do pH como ocorreu para o *P. floridae*.

Na concentração de 25 mg.L⁻¹, o *Phanerochaete chrysosporium* apresentou maior VCR entre os fungos estudados, porém com pouca diferença para o *P. ostreatus*.

Na concentração de 50 mg.L⁻¹, *Phanerochaete chrysosporium* apresentou a maior VCR do experimento, porém não obteve o mesmo desempenho em pH alcalino. O aumento na concentração do corante PR5 de 12,5 mg.L⁻¹ para 50 mg.L⁻¹ indicou que não foi tóxico para o *Phanerochaete chrysosporium* e para o *P. ostreatus*, diferentemente do que se pode perceber para o *P. floridae*, o qual não conseguiu se desenvolver como nas concentrações mais baixas de corante.

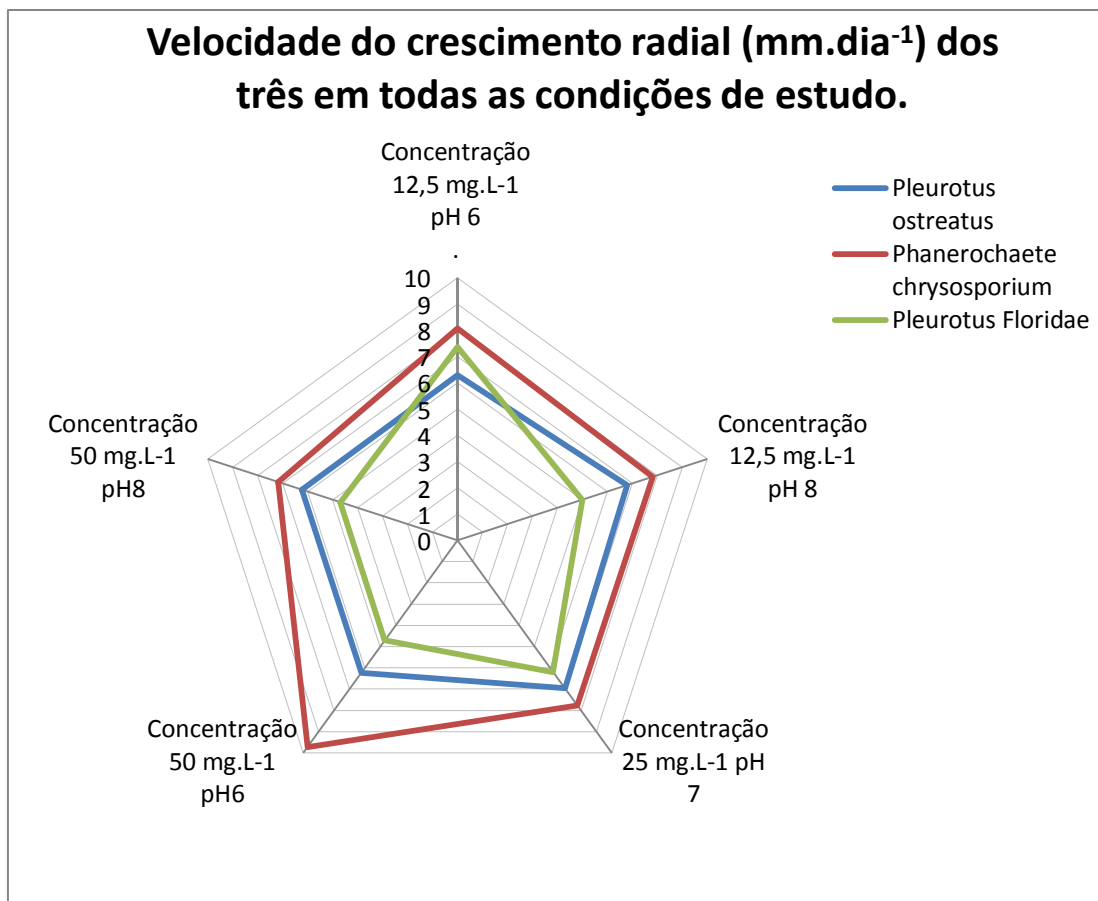


Figura 15: Crescimento radial (mm.dia⁻¹) dos fungos nas diferentes condições de concentração e pH.

Pode-se perceber com os dados da Tabela 6, e ilustrado na Figura 15 que o *Phanerochaete chrysosporium* se adaptou melhor que o *P. ostreatus* e o *P. floridae* em todas as condições. Esta adaptação deve-se também a quantidade elevada de esporos que este fungo produziu, comparada aos outros dois microrganismos estudados.

A descoloração pode ser visualizada na sequência formada pela Figura 16 até a Figura 18 as quais demonstram a placa usada como branco na parte superior, e a duplicada que foi inoculada na parte inferior de cada imagem:

Deve-se ressaltar que a descoloração nesta etapa, ocorreu de forma muito parecida nas concentrações e pH de 12,5 mg.L⁻¹ pH 6 e pH 8 para o *P. ostreatus* e para o *Phanerochaete chrysosporium*, e na concentração de 50 mg.L⁻¹ pH 6 e pH 8, sendo observado um raio de 15 mm ± 3 mm do centro do poço. Já na concentração de 25 mg.L⁻¹ pH 7, foi observado 11 mm ± 2 mm de descoloração.



Figura 16: Descoloração após o cultivo do *Phanerochaete chrysosporium*. Da esquerda para a direita: 1º Coluna: 12,5 mg.L⁻¹ e pH 6; 2º Coluna: 12,5 mg.L⁻¹ e pH 8; 3º Coluna: 25 mg.L⁻¹ e pH 7; 4º Coluna: 50 mg.L⁻¹ e pH 6; 5º coluna: 50 mg.L⁻¹ e pH 8.

Foi observado que em nenhuma das placas houve descoloração completa, porém na concentração de 50 mg.L⁻¹ e pH 6, mostrado na Figura 16 a descoloração por *Phanerochaete chrysosporium* foi a que atingiu maior área e intensidade.

Considerando apenas os melhores valores de crescimento radial dos três fungos em todas as concentrações o *Phanerochaete chrysosporium* apresentou o valor de 9,712 mm.dia⁻¹ na concentração 50 mg.L⁻¹ em pH 6, contra 6,974 mm.dia⁻¹ alcançado pelo *Pleurotus ostreatus* na concentração 25 mg.L⁻¹ em pH 7, e 7,365 mm.dia⁻¹ do *Pleurotus floridae* na concentração 12,5 mg.L⁻¹ em pH 6.

Com intuito de demonstrar visualmente a diferença da descoloração promovida por cada fungo, já que os dados foram apresentados anteriormente, a Figura 16 (apresentada anteriormente) ilustra a degradação do grupamento cromóforo pelo *Phanerochaete chrysosporium*, a Figura 17 o efeito do *P. ostreatus*, e na Figura 18 a degradação pelo *P. floridae*.

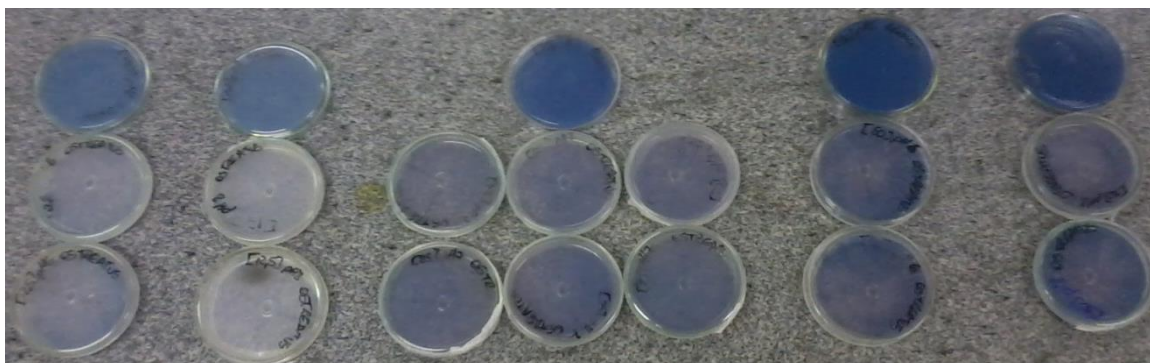


Figura 17: Degradação do corante PR5 pelo *P. ostreatus*. Da esquerda para a direita: 1º Coluna: 12,5 mg.L⁻¹ e pH 6; 2º Coluna: 12,5 mg.L⁻¹ e pH 8; 3º Coluna: 25 mg.L⁻¹ e pH 7; 4º Coluna: 50 mg.L⁻¹ e pH 6; 5º coluna: 50 mg.L⁻¹ e pH 8.



Figura 18: Degradação do corante PR5 pelo *P. floridae*. Da esquerda para a direita: 1º Coluna: 12,5 mg.L⁻¹ e pH 6; 2º Coluna: 12,5 mg.L⁻¹ e pH 8; 3º Coluna: 25 mg.L⁻¹ e pH 7; 4º Coluna: 50 mg.L⁻¹ e pH 6; 5º coluna: 50 mg.L⁻¹ e pH 8.

No nono dia de incubação, não foi observada degradação total do corante em nenhuma das concentrações, porém foi possível observar uma fase intermediária de cor rósea em todas as placas, o que condiz com o estudo de Bonugli e Santos et al, (2013), no qual demonstrou que o fungo *Peniophora sp.* age sobre o corante, e que houve rápida degradação da coloração azul, e posteriormente, surgimento de uma coloração rosa que demorou mais tempo para desaparecer do meio de cultivo contendo corante Preto Reativo 5.

O resultado obtido também similar ao do estudo de Ottoni (2012), que utilizou condições similares às do efluente industrial como salinidade, nutrientes, agitação, pH, e até mesmo utilizando suportes de espuma de poliuretano observou que em algumas condições houve degradação total do corante pelo *Phanerochaete chrysosporium*.

Já no trabalho de Lenhard (2006), foi possível a descoloração de outro corante o Remazol Brillante Blue R em teste preliminar, e posteriormente de nove outros azo corantes reativos, e um efluente de lavanderia por outros fungos lignolíticos como o *Pleurotus pulmonarius*, *Lentinus edodes* e *Ganoderma lucidum*, em meio sólido, porém a variação deste estudo foi a correção da relação C:N. Os resultados deste estudo variaram de 69% a 96% de descoloração.

A pesquisa de Barrasa et al, (2009), mostrou que trinta fungos, incluindo os basidiomicetos, isolados diretamente de uma floresta na Espanha são capazes crescer em meio de cultivo com o corante PR5, mas apenas o *Calocera córnea* da família *Dacrymycetaceae*, o *Lopharia spadicea* da família *Phanerochaetaceae* e o *Polyporus alveolares* família *Polyporaceae* conseguem crescer e promover a descoloração do corante.

Com base nos resultados obtidos, a partir da observação dos dados e da descoloração, foi realizada a escolha do *Phanerochaete chrysosporium* para a incubação no respirômetro de Bartha.

5.4 ETAPA 4 – ENSAIOS DE RESPIROMETRIA

5.4.1 Montagem dos Respirômetros

Para a determinação da produção de CO₂ foram montados três respirômetros de Bartha com o sistema espuma de poliuretana + corante Preto Reativo 5 adsorvido, e um para controle.

5.4.2 Ensaio da Biodegradação do Corante Preto Reativo 5 Adsorvido em Espuma de Poliuretana

As condições ideais observadas foram de pH 6 e concentração de 50 mg.L⁻¹ para que a solução de corante fosse degradada pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, que apresentou descoloração em placa de Petri. Já para a adsorção, foi observado que em conjunto à concentração e pH acima citados, ocorreu a retenção de 46,2 mg.L⁻¹ de corante em 110 minutos.

Na Figura 19 é ilustrado o andamento da degradação do corante PR5 durante a etapa de respirometria. Os valores apresentados são a média dos resultados obtidos na triplicata. A diferença de valores que resultou no desvio padrão foi ocasionada por variáveis não controladas como a diferença no formato entre os respirômetros e a forma irregular das espumas de poliuretana, já que todos os frascos estavam em temperatura ambiente e sem interferência de agentes externos que poderiam prejudicar o andamento do experimento.

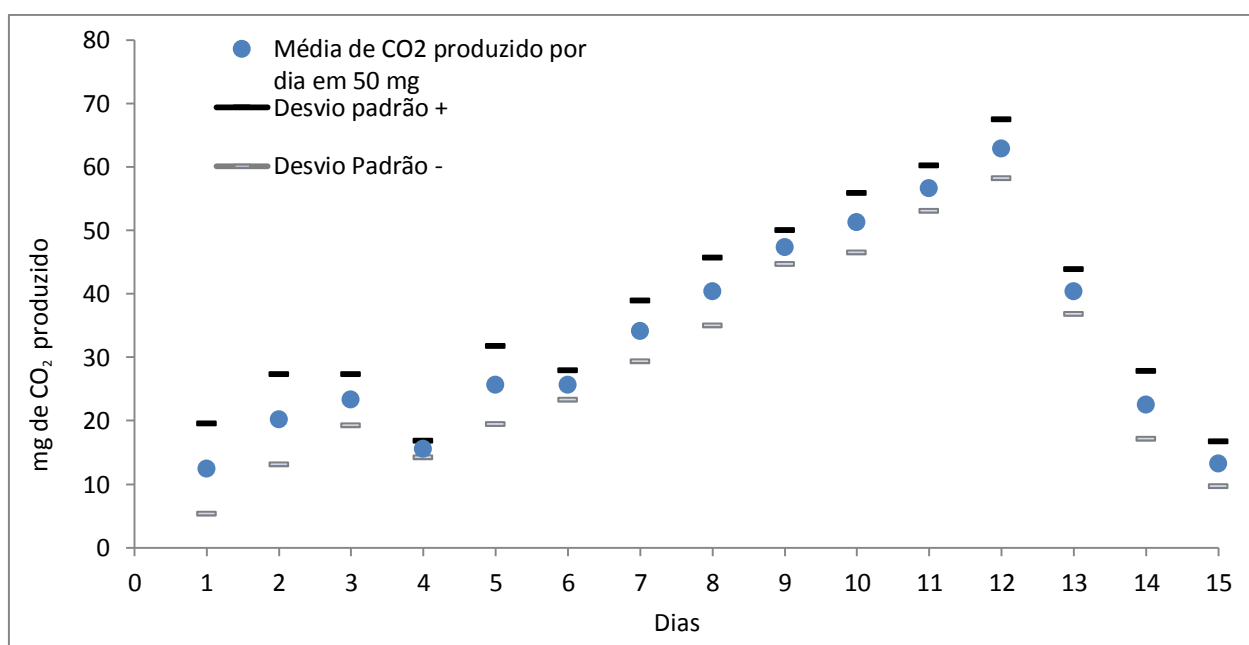


Figura 19: Quantidade de CO₂ produzido diariamente.

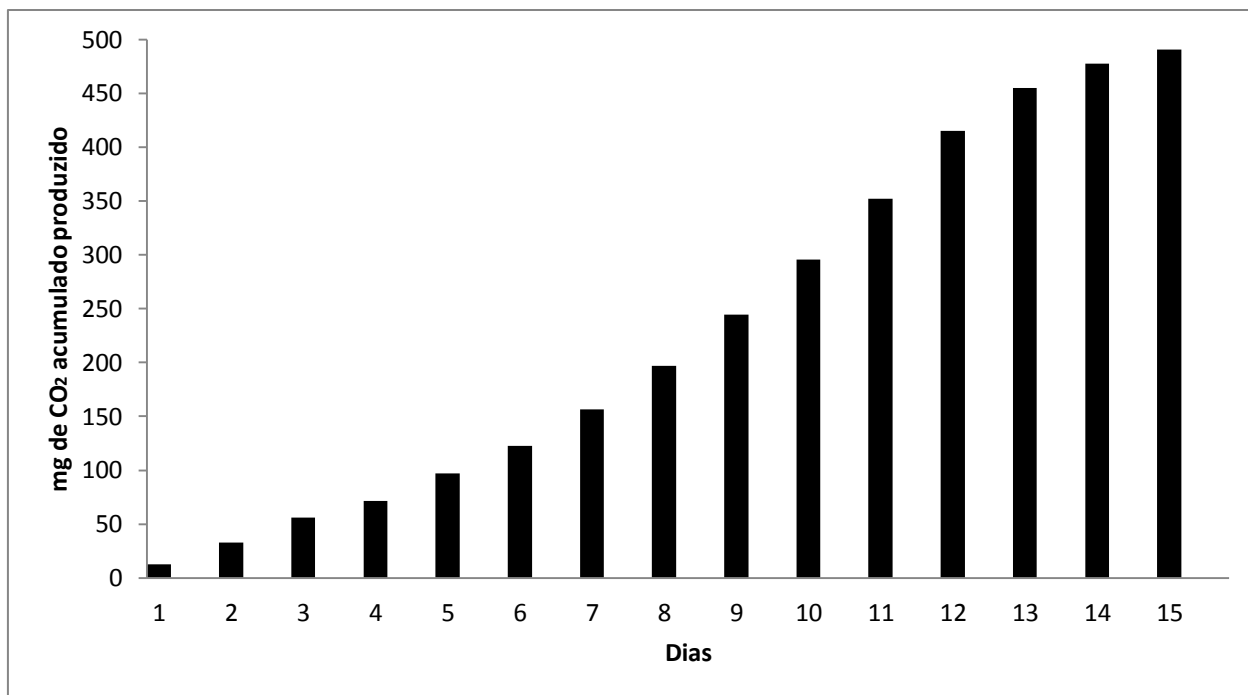


Figura 20: Quantidade de CO₂ produzido acumulado.

Estes valores representam indiretamente a taxa de crescimento do microrganismo, e conseqüentemente a degradação do contaminante que é utilizado como fonte de nutrientes. Os valores de CO₂ encontrados foram de 12,41 mg no primeiro dia, 96,94 mg no quinto dia, 295,49 mg no décimo dia, e 490,93 mg no décimo quinto e último dia do experimento.

Comparando com os valores obtidos por Coneglian et al. (2005) que utilizaram respirometria para degradação de borra oleosa da Estação de Tratamento de Efluentes da REPLAN/PETROBRÁS que por noventa dias avaliaram a degradabilidade de contaminantes provenientes de combustíveis no solo, encontrando no décimo quarto dia 300 mg de CO₂, e com a pesquisa de Silva e Duarte (2009) que avaliaram a degradação de gasolina em latossolo e obtiveram 105 mg de CO₂ em quatorze dias, o valor de 490,93 mg de CO₂ acumulado ao décimo quinto dia enfatiza com a eficiência do *Phanerochaete chrysosporium* na degradação e no descoloramento do corante, esta que foi verificada visualmente.

6 CONCLUSÃO

Através deste trabalho pode-se observar que o basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* foi o mais eficaz na descoloração do corante Preto Reativo 5, além de ter sido o fungo estudado com melhor velocidade de crescimento radial atingindo o valor médio de $9,712 \text{ mm.dia}^{-1}$ em placa de petri.

O ensaio de adsorção provou que a espuma de poliuretana tem grande capacidade na retenção do corante Preto Reativo 5, com eficiência na adsorção de 92,4%, equivalente a 46,2 mg de corante de uma solução com concentração inicial a 50 mg.L^{-1} e pH 6. Foi possível constatar que a condição de concentração máxima (50 mg.L^{-1}) da solução de corante Preto Reativo 5 e pH mínimo (pH 6) foram mais favoráveis para o desenvolvimento desta pesquisa, já que o valor de pH ideal para máxima adsorção, também fez parte da condição que favoreceu o desenvolvimento do *Phanerochaete chrysosporium*.

Ao final, no ensaio respirométrico, foi possível observar o aumento da quantidade de CO_2 produzido no decorrer da inoculação, chegando ao valor acumulado no último dia de monitoramento de 490,93 mg de CO_2 , um valor alto comparado ao que outros pesquisadores obtiveram utilizando outros contaminantes.

Conclui-se que o *Phanerochaete chrysosporium* tem a capacidade de degradar, eficientemente, o corante Preto Reativo 5 adsorvido em espuma de poliuretana, utilizando-o como única fonte de nutrientes.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aumento no número de fungos para comparação do crescimento radial e capacidade de degradação do corante;
- Adição de nutrientes para correção da proporção Carbono/Nitrogênio/Fósforo;
- Análises toxicológicas antes e após o processo de biodegradação;
- Ampliação na faixa de variação de concentração do corante e pH;
- Análise enzimática;
- Comparação entre diferentes tipos de adsorventes;
- Aumento na variedade de condições como proporção da espuma de poliuretana pela solução de corante, velocidade de agitação, pH, concentração do corante;
- Padronização e variação do tamanho, forma, e massa da espuma de poliuretana utilizada;
- Monitoramento dos valores de O₂ simultâneos aos de CO₂;
- Utilização de outros corantes;
- Prolongar o tempo de incubação, afim de, observar o comportamento do microrganismo e a degradação de compostos secundários;
- Pesquisar se existe a formação de compostos que sejam mais tóxicos;
- Explorar diversas, e mais complexas, abordagens estatísticas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHANT, E. N.; **Dyes and Their Intermediates**. Edward Arnold Ltd. London, 1977.

ACCIOLY, M. G.; **Adsorção do corante luganil azul por espuma de poliuretano**. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Ambiental - Unesp, Campus de Rio Claro (SP), Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Rio Claro – SP, 2008.

AIDOO, K.E.; HENDRY, R; WOOD, B.J.B. Solid Substrate Fermentations - **Advance Applied Microbiology**. V. 28, 1982. p. 201-237.

ALEXANDROVA, A.; ARPADJAN, S. Column solid phase extraction as preconcentration method for trace element determination in oxalic acid by atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry - **Analytica Chimica Acta**, 307, 71–77, 1995.

ALLINGER, N.L, CAVA, M.P, JONGH, D.C, JOHNSON, C.R, LEBEL, N .; STEVENS, C.L, **Química Orgânica**, 2 ed, Guanabara Dois, Rio de Janeiro, p.337-558, 1978.

ALMEIDA, G. N.; de SOUSA, L. M.; PEREIRA-NETTO, A. D., & CASSELLA, R. J. Characterization of solid-phase extraction of Fe(III) by unloaded polyurethane foam as thiocyanate complex - **Journal of Colloid and Interface Science**, 315, 63–69, 2007.

ANDREO, A. P.. **Ensaio de Spirometria: Monitoração de CO₂ utilizando um sistema FIA com detecção condutométrica**. 1999. Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil. Faculdade de Engenharia Civil da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

ANDREOTTOLA G., OLIVEIRA E. L., FOLADORI P., DALLADO L., PETERLINI R., CADONNA M., **Método respirométrico para o monitoramento de processos biológicos**. Engenharia Sanitarista Ambiental, Vol. 10 – n ° 1, jan/mar 2005, p 14 – 23.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução **RE nº 899. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, D.O.U., 02/06/2003, Brasil, 2003.

ARAÚJO, A.S.F. de; MONTEIRO, R.T.R.; ABAKERLI, R.B.; SOUZA, L.S. de; Biodegradação de glifosato em dois solos brasileiros - **R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v.23, p. 157-164, jan./dez. 2003.

AVELAR, L. M. M. P. R. de. **Ensaio de biocontaminação por microfungos em vários tipos de polímeros** - Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2012.

BABA, A.Y.; ROSADO, F.R.; ZONETTI, P.da.C. **Biorremediação de efluentes líquidos por meio da ação de pleurotus spp.** Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar., Centro Universitário de Maringá, Maringá, out.2009.

BARRASA, J. M.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Isolation and selection of novel basidiomycetes for decolorization of Recalcitrant Dyes. **Folia Microbiologica**, v. 54, n. 1, p. 59-66, 2009.

BENTO, F. M; CAMARGO, F.A.O; OKEKE, B.; FRANKENBERGER - JUNIOR, W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. - **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo-SP, v. 34, supl. 1, Nov. 2003.

BETTIN, F. Cinética de Crescimento e Produção de Lacases do Fungo *Pleurotus Sajor-Caju* PS- 2001(Fr.) **Singer em Processo Submerso em Biorreator com Agitação Mecânica.** 230 f. Tese(Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2010.

BONUGLI-SANTOS, R.C; VIEIRA, G.A.L.; COLLINS, C.; FERNANDES, T.C.C.; MORALES, M.A.M.; MURRAY, P.; BERLINCK, R.G.S.; SETTE, L.D. - Avaliação dos metabólitos e da taxa de mutagenicidade durante a degradação do corante têxtil Preto Reativo 5 pelo fungo marinho *Peniophora sp.* CBMAI 1063 - **27º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2013.

BOWEN, H. J. M. Adsorption by polyurethane foams: new method of separation - **Journal of the Chemical Society A**, 7, 1082–1085, 1970.

BRAUN, T.; FARAG, A. B. Reversed-phase foam chromatography. Reversed-phase foam chromatography: separation of palladium, bismuth and nickel in the tributyl phosphate-thiourea perchloric acid system - **Analytica Chimica Acta**, 61, 265–276, 1972

BRAUN, T.; HUSZAR, É.; BAKOS, L. Reversed-phase foam chromatography: separation of trace amounts of cobalt from nickel in the tri-n-octylamine-hydrochloric acid system - **Analytica Chimica Acta**, 64, 77–84, 1973.

BRAUN, T.; NAVRATIL, J. D.; FARAG, A. B. **Polyurethane foam sorbents in separation science** - Boca Raton: CRC Press, 1985.

BURATTO, A.P.; RODRIGUES, M.B., **Biodegradação de corante têxtil azul qr-19 com fungo ligninolítico *Pleurotus ostreatus*** – PIBIC, UTFPR, Pato Branco – PR, 2010.

CARNEIRO, P.A.; OSUGI, M.E.; FUGIGAVA, C.S.; BORALLE, M.F.; ZANONI, M.V.B. Evaluation of different electrochemical methods on the oxidation and degradation of Reactive Blue 4 in aqueous solution - **Chemosphere** 59, p. 431 – 439, 2005

CARNEIRO, P. A; OSUGI, M. E; SENE, J. J; ANDERSON, M. A; ZANONI, M. V. B.; Evaluation of Color Removal and Degradation of a Reactive Textile Azo Dye on Nanoporous TiO₂ Thin - Film Electrodes, **Electrochimica Acta** 49, p.3807 - 3820, 2004.

CASSELLA, R. J.; BITENCOURT, D. T.; BRANCO, A. G.; FERREIRA, S. L. C.; JESUS, D. S.; CARVALHO, M. S. *et al.* On-line preconcentration system for flame atomic absorption spectrometry using unloaded polyurethane foam: determination of zinc in waters and biological materials - **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 14, 1749–1753, 1999.

CASSELLA, R. J.; GARRIGUES, S.; SANTELLI, R. E.; de la GUARDIA, M. Retention of carbaryl by polyether type polyurethane foam: a critical study - **The Analyst**, 125, 257–261, 2000.

CASSELLA, R. J.; SALIM, V. A.; JESUÍNO, L. S.; SANTELLI, R. E.; FERREIRA, S. L. C.; CARVALHO, M. S. Flow injection determination of cobalt after its sorption onto polyurethane foam loaded with 2-(2-thiazolylazo)-p-cresol (TAC). **Talanta**, 54, 61–67, 2001.

CASTILLO, M.; BARCELÓ, D. Characterisation of Organic Pollutants in Textile Wastewater and Landfill Leachate by Using toxicity based Fractionation Methods Followed by Liquid and Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometric Detection - **Analytica Chimica Acta** 426, p. 253 - 264, 2001.

COLLA, 2008.; FAN, L; SOCCOL, C.R. **Destoxificação da casca de café utilizando fungo comestível do Gênero *Pleurotus***. II Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil. Paraná, 2001.

COLLA, L.M; PRIMAZ, A.L; LIMA, M.de; BERTOLIN, T.E; COSTA, J.A.V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, maio, 2008.

CONCEIÇÃO, D.M.; ANGELIS, E. D. de; BIDOIA, D. de F. A.; Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Microbiologia Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, v.72, n.1, p.99-106, jan./mar., 2005.

CONEGLIAN, C. M. R., SIVIERO, A. R., POLETTI, E. C.C., VENDEMIATI, J. A. S., DRAGONI, G. S., RIBEIRO, M. S., ANGELIS, D. F., FURLAN, L.T., GONÇALVES, R. A. Avaliação da Biodegradação no Solo de Resíduos Gerados em Refinaria de Petróleo. **HOLOS Environment**, v.6 n.2, 2006 - P.106. São Paulo.

CUNHA, A.L.; MÁXIMO, H.de.O; ANDRADE, M.V.F.de.; MARINHO, G.M.; RODRIGUES, K. **Degradação de corante azo por *Phanerochaete chrysosporium* em sistema de reatores em bateladas sequenciais operados em série**. Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação, Tocantins, 2012.

DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e Toxicidade de Efluentes Têxteis e Efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana - SP.**, 2005, 137f. - Tese de Doutorado em Ecologia de Agrossistemas – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba - SP, 2005.

EL-SHAHAWI, M. S.; AL-DAHERI, S. M. Preconcentration and separation of acaricides by polyether based polyurethane foam - **Analytica Chimica Acta**, 320, 277–287, 1996.

FARAG, A. B.; EL-SHAHAWI, M. S. Removal of organic pollutants from aqueous solution: V. Comparative study of the extraction, recovery and chromatographic separation of some organic insecticides using unloaded polyurethane foam columns - **Journal of Chromatography A**, 552, 371–377, 1991.

FERREIRA, E. de M. M; MORELLI, T; MOREIRA, I. M.N.S; CARVALHO, M. S. Studies on indium sorption from iodide medium by polyurethane foam. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo , v. 15, n. 4, ago. 2004 .

FERREIRA, R.S., **Desenvolvimento de materiais poliméricos uretânicos para purificação de gás natural: remoção de mercúrio e compostos à base de enxofre** - Dissertação de Mestrado em Química, Curso de Pós – Graduação em Química, UFPR, Curitiba – PR, 2006.

FERRONATTO, G.R, SALMASO, M.H.S, **Avaliação de atividade antimicrobiana de espécies de macrófitas aquáticas da região metropolitana de Curitiba**. Trabalho de Conclusão de Curso, Tecnologia em Química Ambiental – UTFPR, Curitiba 2010.

FIELDER, H.J.; GRUNDA, B. Nachweiss der am Kohlsenstoff-Kreislauf beteiligten Mikroorganismen under ihrer Leistungen. – DUNGER, W; FIELDER, H. J. (Eds.) - **Methoden der Bodenbiologie**. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1997. p. 168-192.

FIGUEIRÓ, G.G. **Influência do substrato no cultivo e na composição química do cogumelo *Pleurotus florida***. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Unesp, Ilha Solteira – SP, 2009.

FOGAÇA, M. N. **Estudo da toxicidade e tratamento de águas residuárias através da adsorção em espumas de poliuretana** - Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG, 2007,

FORGIARINI, E. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP)**. 2006, 110f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FOUST, A.S.; WENZEL, L.A.; CLUMP, C.W. **Princípio das operações unitárias**. Rio de Janeiro: *Guanabara Dois*, 1982.

FRANCHETTI, S. M. M., MARCONATO J. C., Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 4, 811-816, 2006.

GALDAMÉZ, E. V. C., **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Produção – Escola de engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2002.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B; Corantes têxteis. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p.71-78, fev. 2000.

GUIMARÃES, C.; MOTA, M. **Role of Manganese Peroxidases and Lignin Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the degradation of the colourants present in a sugar refinery effluent**. Biotec, p.324, 1998.

GUIMARÃES, M.S.de.O. **Coleta, isolamento e identificação de fungos presentes em sistemas de tratamento de efluentes de indústria petroquímica para utilização em processos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos**. 56 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

HASSEMER, M. E. N. Tratamento do Efluente de uma Indústria Têxtil. Processo Físico-Químico com Ozônio e Coagulação/Floculação - **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 7, n.1, p. 30-36, jan./mar. 2002.

HEXASYSTEMS. Foto da Câmara de Neubauer. <http://www.hexasystems.com.br/produto/camara-de-neubauer-nao-espelhada-improved-og-100.aspx> Acessado em 28/02/2014.

KAMIDA, H. M; DURRANT, L. R. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 4, p. 629-632, 2005.

KUES, U.; LIU, Y. **Fruiting body production in basidiomycetes**. Applied Microbiology and Biotechnology, Washington, v.54, p.141–152, 2000.

KUNZ, A; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. **Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis** - Quim. Nova, v. 25, n. 1, p. 78-82, jan./fev. 2002.

KURTZMAN, R. H; ZADRAZIL, F. **Physiological and taxonomic considerations for cultivation of Pleurotus mushrooms**. In: CHANG, S.T, QUIMIO, T.H. (Eds). Tropical mushrooms: biological nature and cultivation methods. Hong Kong: Chinese University, p.299-348, 1982.

LENHARD, D.C. - **Descoloração de corantes têxteis reativos por fungos ligninolíticos e por lacase** . Dissertação de Mestrado - Engenharia Química, UEM, Maringá – PR, 2006

LIMA, T. de. **Modelo de inferência para a estimação da umidade do leito de um biorreator de fermentação no estado sólido**. - Pós-Graduação em Engenharia Química, Dissertação de Mestrado, Área de concentração em Desenvolvimento de Processos Químicos - Setor de Tecnologia - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MAHENDRAKER, M.; VIRARAGHAVAN, T. Respirometry in Environmental Engineering. **Journal in Environmental - Science Health**, v.A30, n,4, p.713-734, 1995.

MAHMOODI, N.M.; HAYATI, B.; ARAMI, M, C.; **Adsorption of textile dyes on Pine Cone from colored wastewater: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies**. Desalination, 268, 117-125, 2011.

MALL, I. D.; SRIVASTAVA, V; C., AGARWAL, N. K. **“Removal of Orange-G and Methyl Violet dyes by adsorption onto bagasse fly ash – kinetic study and equilibrium isotherm analyses”** - *Dyes and Pigments* 69, pp. 210-223. 2006

MELO, I.S; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**, EMBRAPA, CNPMA, 1997.

MOREIRA NETO, S. L. **Enzimas lignofílicas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006, 110f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Ambiental e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

MORI, M.; CASSELA, R.J., **Remoção do Corante Catiônico Violeta Cristal em Meio Aquoso Empregando Espumas de Poliuretano – 31ª RASBQ**, Águas de Lindóia – SP, 2008.

NBR 14283, Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico – **ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas**, 1999.

OLIVEIRA, L. S. M. ; UGARTE, J. F. O. **Utilização da vermiculita como adsorvente de óleo da indústria petrolífera** - Iniciação Científica – Engenharia Química, UFF, Rio de Janeiro – RJ, 2004

OTTONI, C. A. - **Descoloração de corantes têxteis por fungos ligninolíticos em condições de pH e salinidade elevada** - Tese de doutoramento em Engenharia Química e Biológica, Universidade do Minho – Portugal, 2012.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. 1997. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**, Vol 1. Makron Books: São Paulo.

RAMOS, G. C. **Avaliação da biodegradação de corantes pelos basidiomicetos *Pleurotus sajor caju* e *Phanerochaete chrysosporium*** - Trabalho de Conclusão de Curso, Tecnologia em Química Ambiental, UTFPR – Curitiba, 2007.

RANZANI, M. E. T. de C.. Uso de basidiomicetos comestíveis - *Pleurotus spp.* para descoloração/degradação de corantes têxteis - Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas – SP, 2002.

ROSOLEN, L. A.; MONTEIRO, R. T. R.; DELLAMATRICE, P. M.; KAMIDA H. M. **Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos basidiomicetos** - XVII congresso latino americano de química têxtil, São Paulo/SP, 2004.

SANT'ANA, O. D.; JESUÍNO, L. S.; CASSELLA, R. J.; CARVALHO, M. S.; SANTELLI, R. E. Determination of lead by electrothermal atomic absorption spectrometry employing a novel sampling strategy of polyurethane foam impregnated with thiazolylazo-p-cresol (TAC) - **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 15, 96–102, 2004.

SCHMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; NASCIMENTO, J. S.; VARGAS JUNIOR, F. M. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1866-1871, 2003.

SEPÚLVEDA, M. M. V. B. **Biodegradação de Poliuretanos Derivados de Fontes Renováveis** - Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - Instituto Politécnico de Bragança, Bragança – SP, 2010.

SILVA E. C., DUARTE P. A. N., **Montagem de respirômetros de Bartha e acompanhamento da respirometria durante biodegradação de gasolina em latossolo**. Trabalho de conclusão de curso. UTFPR – Curitiba – PR, 2009.

SILVA, J. J. da; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; ALMEIDA, P. H. de; SOUZA, S. G. H. de; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, supl. 1, p. 191-196, jul./dez. 2012.

SILVEIRA NETA, J.J. **Síntese e caracterização de poliuretano a base de óleo de Mabea fistulifera Mart. e sua utilização para remoção de corantes têxteis**. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica – Tese de Doutorado – UFV. Viçosa – MG, p. 1-91. 2011.

SOARES, C. H. L. **Estudos Mecanísticos de degradação de efluentes de indústria de papel e celulose por fungos basidiomicetes degradadores de madeira**. 1998, 133f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

SOCCOL, C.R.; CABRERO, M.A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. **Selection of *Rhizopus* for Growing on Raw Cassava** - VI International Symposium on Microbial Ecology - Barcelona, 6-11, 1992.

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis - **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, jan./abr. 2009 - ISSN 1981-9951.

SPANJERS, H., VANROLLEGHEM, P., OLSSON, G. e DOLD, P. Respirometry in control of the activated sludge process. **Water Science & Technology**, 34 (3-4), p. 117-126, 1996.

SPANJERS, H., VANROLLEGHEM, P., OLSSON, G., DOLD, P., Respirometry in control of the activated sludge process. **Water science and technology**, v. 34, n. 3, p 117-126, 1996.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba – PR, p.1-157, 2005.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. do C. E. Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos - **Quím. Nova**, São Paulo , v. 29, n. 2, Apr., p.230-233, 2006 .

VILLALOBOS, L.D.G.; GÓES, M.M.; CARVALHO, G.M.; MORAES, J.C.G. **Utilização de resíduo de madeira na síntese de espumas de poliuretana para adsorção do corante vermelho procion**. 12º Congresso Brasileiro de Polímeros (12ºCBPol), Florianópolis – SC, 2013.

WIKIPÉDIA - Gabarito Câmara de Neubauer, http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1mara_de_Neubauer. Acessado em 28/02/2014

ZADRAZIL, F.; GRABBE, K. Edible mushrooms. **Biotechnology, Weinheim**, v.3, p.145 187, 1983.

ZECK, S. E. C., **Utilização de espumas uretânicas no tratamento de óleo mineral isolante contaminado com PCB** - Dissertação de Mestrado em Química - Universidade Federal do Paraná, CURITIBA – PR, 2004.

ZOLLINGER, H. **Color Chemistry**, 2ª edn., V. C. H. Publishers, New York, 1991.