

# Estudo da biodegradação de corantes azóicos por inóculo proveniente de biodigestor anaeróbio de alimentos

**ANA CAROLINA MAGANHA DE ALMEIDA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de Microbiologia Aplicada.

**RIO CLARO**  
Março 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# Estudo da biodegradação de corantes azóicos por inóculo proveniente de biodigestor anaeróbico de alimentos

**ANA CAROLINA MAGANHA DE ALMEIDA**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Corso

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de Microbiologia Aplicada.

**RIO CLARO**  
2008

576 Almeida, Ana Carolina Maganha de  
A447e Estudo da biodegradação de corantes azóicos por inóculo  
proveniente de biodigestor anaeróbio de alimentos / Ana  
Carolina Maganha de Almeida . – Rio Claro : [s.n.], 2008  
100 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Carlos Renato Corso

1. Descoloração. 2. Acid yellow 25. 3. Direct Violet 51. 4.  
Consórcio microbiano. 5. Biodigestor anaeróbio. I.  
Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## DEDICATÓRIA

*Ao Deus do Universo,  
no qual tudo posso,  
com o qual tudo sou,  
sem o qual nada faz sentido  
e eu não estaria aqui.*

### Salmo 23

*O Senhor é meu Pastor e nada me falta;  
Em verdes prados ele me faz repousar.  
Conduz-me junto às águas refrescantes e  
restaura as forças de minha alma.  
Pelos caminhos retos Ele me leva, por amor de seu nome.  
Ainda que eu atravessasse o vale escuro, nada temerei, pois estás comigo.  
Vosso bordão e vosso báculo são o meu amparo.  
Preparais para mim a mesa a vista de meus inimigos.  
Derramais o perfume sobre a minha cabeça, e transborda a minha taça.  
A vossa bondade e misericórdia hão de seguir-me por todos os dias de minha vida.  
E habitarei na casa do Senhor por longos dias.*

## AGRADECIMENTOS

...essa música merece volume alto... essas flores merecem amor, esse dia merece um sorriso, sua amizade merece a minha, o esforço merece recompensa, tudo é um conjunto do que é e do que merece.

Esse mestrado não me deu apenas um título, mas com certeza foi a melhor experiência da minha vida e eu nunca vou esquecer de todas as pessoas que me ajudaram, de todos os abraços, sorrisos, palavras, carinhos, amor, muito mais do que qualquer lugar no mundo, foi no Departamento de Bioquímica e Microbiologia que eu descobri as melhores coisas da minha vida e o melhor de mim, pelo menos até os meus 25 anos de vida...!

Este é um lugar ao qual eu devo imensa gratidão e que conseguiu reunir pessoas de uma humanidade incrível, muito obrigada!

Dizem que a faculdade é a melhor época da vida, mentira...! É o mestrado!

Eu não saberia dizer o que mais me marcou em toda essa experiência, afinal vamos deixar o blábláblá do conhecimento científico para as próximas páginas, até vocês se cansarem e se perguntarem por que eu não fiz isso ou aquilo, ou talvez corrigirem os erros que eu esqueci de corrigir, que passaram batido, porque eu gastei um tempo tremendo escrevendo tudo isso que vocês estão prestes a ler....

Hãã: Primeiro eu gostaria de agradecer a Deus, mas para não ser injusta com Ele coloque-o esse agradecimento especial na primeira página!

*“Thoughts become things!”*

*“The Secret ”.*

*“Um poderoso instrumento de Deus em minha vida, através do qual descobri que sou eu a única capaz e responsável pela minha própria felicidade e pelo meu maravilhoso destino!”*

## **À MINHA FAMÍLIA**

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em tudo, todo o suporte possível de ser dado, eu recebi deles, presentes mesmo distantes de mim, com todos os desafios que passaram durante o meu Mestrado, foram cruciais quando disseram “Vai filha, você consegue!” e eu fui.... oito meses de distância, uma conquista maravilhosa e nossa, de todos nós!

Às minhas tias, vó, primas e irmã, meus amores, minha vida, seres essenciais a tudo o que eu considero amor e vida, são vocês!

Ao meu amor, Fernando, incentivador, firme, coerente, visionário e que disse a frase mais importante da minha vida: você tem que ir e você vai! Depois agradeço de verdade amor! Hahahaha!

À minha família Zanto, Izilda, Paula e a todos os associados “Soncelas” e “Santos”!  
Hahahaha, afinal oito anos a gente já é da família né?

## **AOS PROFISSIONAIS ENVOLVIDOS**

Aqui eu guardo espaço para os profissionais que foram absolutamente essenciais nesses dois anos.

Meu orientador, Carlos e sua doce esposa Lurdes. Por tudo o que fizeram por mim, tudo o que estava ao seu alcance, mais do que se espera de orientador eu tive um paizão ao meu lado, que sempre acreditou em mim e lutou para que eu concretizasse esse grande sonho, esse maravilhoso Mestrado!

À professora Sandra Mara, Gilson Coutinho Junior, Marconato, Dejanira, Eleonora, Dilza e aos técnicos e técnicas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Unesp Rio Claro: Beto, Luiza, Inês, Carmem, Fátima, Zito, Ângela, Nega e Juliana.

Aos funcionários do Restaurante Universitário, sempre tão gentis em me ajudar a realizar as coletas dos alimentos.

Eu agradeço profundamente a todos, com meu amor, com meu coração com tudo o que fizeram por mim, mesmo sem saber, pelo incentivo, pelos abraços, pelos olhares, cafezinhos restauradores!

Eu sei que muitas pessoas aqui não foram citadas, até porque eu sou uma pessoa muito bem relacionada e seria impossível colocar todo mundo....(risos)!

Mas o que eu gostaria de dizer é que de certa forma estamos conectados com tudo o que amamos, com tudo a que somos afins, acredito que uma postura sincera de agradecimento me faz alcançar todas as pessoas que eu gostaria de agradecer agora, mesmo as que eu tenho certeza de que fisicamente não verei mais ... e isso me causa um extremo contentamento com a vida e com Deus!

Não é esta uma filosofia maravilhosa e contentadora?

*Obrigada!*



### ***Für Mein Liebes Deutschland***

*Ich möchte hier mit meine ganze Dankebarkeit für dieses erstannliche Land und die wunderbaren Leute ausdrucken.*

*Es ist schwer all die Dinge, dei ich in Deutschland erlebt und gelernt habe während meines Aufenthaltes inwarte zufassen.*

*Als erstes möchte ich mich bei Professor Jürgen Backhaus bedanken, der immer an mich geglaubt hat und es mir ermöglichte einen großen Traum zu erfüllen außeshalb Brasilien zu studieren. Danke für die Möglichkeit meinen Aufenthalt von 3 auf 8 Monate zu verlängern.*

*Ein große Dank gilt auch dem IA Labour. An Ralp Müller, Caro, Anette, Tamara, Vivika, Olga, Marjo und dem ganzem Forschungsteam herzlichen Danke für die hervorränge Zusammenarbeit und für alles was ich lernen durfte.*

*Desweiteren gilt ein großer Danke Professor Harald Hoffmann und seiner reisenden Frau Doris, Cobral (Kooperationzentrum für Deutsch-Brasilianischer studiengänge) für all dir Unterstietzung und Möglichkeiten. Maria do Carmo Massoni, Mariana und Eric, ich danke euch von Herzen.*

*Meine lieben freunde Alessandra, Janaina, Fabian, Marcella, Juliana, Tamara, Sebastian, Annet, Steff und Marj, ohne euch wäre die zeit nur halb so schön geworden!*

*Ich will diese arbeit meiner Familie Ednyr, Viviane, Olivia und Linda und unserer schönen zeit in Belgien.*

*Ganz herzlichen Danke an alle Freunde, all die Momente, die ich erleben durfe und all die Dinge, die ich erreichen durfte.*

*Iche werde euch und Deutschland immer dankebar sein und hoffe euch alle wieder zu sehen.*

*In Liebe,*

*Ana Almeida.*

**AOS MEUS AMIGOS:**

Eu dedico meu trabalho, meu Mestrado, minhas realizações aos amigos que acreditaram em mim, me apoiando nos momentos cruciais, com palavras de fé e incentivo, pessoas sem as quais eu jamais teria conseguido com tanto louvor essa maravilhosa conquista!

Com vocês foi mais gostoso, foi mais divertido, foi mais fácil, foi motivante, adoráveis companhias!

Meus amigos eu só posso expressar a gratidão que eu sinto e o meu amor!

À Robertha, Mariana, Luciana, Adriana (Barbie), Adriana, Sueli, Gervásio, Isabel (baianíssima-um exemplo para todos nós), Guilherme, César, Mariane!

*A todos vocês, muito obrigada!*

*“Tudo aquilo que a mente do homem pode conceber  
ela pode alcançar.”*

W. Clement Stone

*O Segredo*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula molecular do corante azóico “Direct Violet 51.....	<b>8</b>
Figura 2 - Fórmula molecular do corante azóico “Acid Yellow 25”.....	<b>8</b>
Figura 3 - Biodigestor anaeróbio de alimentos utilizado para a produção do I.L.R....	<b>21</b>
Figura 4- Inoculação das sobras alimentares com E.M. (Microrganismos Exógenos) antes de serem bombeadas para dentro do biodigestor anaeróbio.E.M. produzido pela Fundação Mokiti-Okada.....	<b>22</b>
Figura 5a - Vista superior com esfera metálica para coleta do I.L.R. b. Vista frontal. Recipiente metálico utilizado na disposição de resíduos. Na confecção do biodigestor foi utilizado um recipiente estéril e novo. 5c. Peça montada para retirada do I.L.R.: tampa plástica do recipiente com furo para passagem de uma mangueira de PVC posteriormente conectada a um tubo de alumínio oco. Extremidade do tubo de alumínio dentro da esfera de peneira metálica, compondo o aparato de extração do líquido. 5d. “Vista superior do “container” de metal”.....	<b>25</b>
Figura 6 - Retirada do I.L.R. após o 30º dia da inoculação, observar o aspecto alaranjado do líquido.....	<b>31</b>
Figura 7 - Gráfico da avaliação entre a matéria orgânica e mineral inicial da pasta de alimentos em comparação com o I.L.R. SST (Sólidos Totais:matéria orgânica e mineral), STV (Sólidos Voláteis-matéria orgânica), SSF (Sólidos Fixos -minerais).....	<b>32</b>
Figura 8a - Cultivo do efluente em Meio PCA. Contagem de bactérias diluição $10^4$ do I.L.R. b. Cultivo do efluente em Meio PCA. Contagem de bactérias diluição $10^5$ do I.L.R.....	<b>34</b>
Figura 9 - Biodigestor anaeróbio de alimentos do tipo “batelada” Extração do novo inóculo produzido.....	<b>36</b>
Figura 10 - Novo I.L.R, produzido a partir do Biodigestor Anaeróbio em batelada...	<b>37</b>
Figura 11 - Espectros do inóculo em diferentes valores de pH: 2,50; 4,50; 6,50 e 3,40 (pH original). Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leituras em espectrofotômetro UV-Vis HP 8456.....	<b>38</b>
Figura 12 - Ação do I.L.R novo sobre o corante AY25 no pH 2,50. Da esquerda para a direita: 5dias, controle e 2horas.....	<b>40</b>

Figura 13 - Espectros de Absorção do corante AY25 após interação com I.L.R. no pH: 2,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em Espectrofotômetro UV.....	43
Figura 14 - Espectro de Absorção do corante AY25 após interação com I.L.R. no pH: 4,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453.....	44
Figura 15 - Espectro de Absorção do corante AY25 após interação com I.L.R. no pH: 6,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453.....	45
Figura 16 - Espectro de Absorção do corante DV51 após interação com I.L.R. no pH: 2,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em Espectrofotômetro UV UV-Vis HP 8453.....	46
Figura 17 - Espectro de Absorção do corante DV51 após interação com I.L.R. no pH: 4,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453.....	47
Figura 18 - Espectro de Absorção do corante DV51 após interação com I.L.R. no pH: 6,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453.....	48
Figura 19 - Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$ do corante “Acid Yellow 25” no pH 2,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.....	50
Figura 20 - Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$ do corante “Acid Yellow 25” no pH 4,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.....	51
Figura 21. Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$ do corante “Acid Yellow 25” no pH 6,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.....	52
Figura 22 - Esquema das possíveis vias de degradação do corante AY25. Subprodutos da esquerda para a direita: benzeno sulfonado, amina aromática sulfonada, imidazol. Benzeno-sulfonado.....	53
Figura 23 - Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$ dos controles do corante “Acid Yellow 25” nos diferentes valores de pH. Preparados na forma de pastilhas, preparadas na proporção de 1mg do sobrenadante seco para 149 mg de KBr. Leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.....	55

Figura 24 - Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400cm <sup>-1</sup> dos tratamentos do corante “Acid Yellow 25”, após 240horas, nos diferentes valores de pH. Preparados na forma de pastilhas, preparadas na proporção de 1mg do sobrenadante seco para 149 mg de KBr. Leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.....	<b>56</b>
Figura 25 - Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> do corante “Direct Violet 51” no pH 2,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.....	<b>57</b>
Figura 26 - Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> do corante “Direct Violet 51” no pH 4,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector .....	<b>58</b>
Figura 27 - Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> do corante “Direct Violet 51” no pH 6,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.....	<b>59</b>
Figura 28 - Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> dos controles do corante “Direct Violet 51” nos diferentes valores de pH. Preparados na forma de pastilhas, preparadas na proporção de 1mg do sobrenadante seco para 149 mg de KBr. Leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.....	<b>60</b>
Figura 29 - Espectro de absorção em FTIR na região de 4.000 a 400 cm <sup>-1</sup> dos tratamentos do corante “Direct Violet 51”, após 240 horas, nos diferentes valores de pH.....	<b>61</b>
Figura 30 - Esquema das possíveis vias de degradação do corante DV51. Subprodutos no sentido horário: naftol sulfonado, amina aromática sulfonada, amina aromática sulfonada, amina aromática sulfonada +éter aromático.....	<b>62</b>
Figura 31 - a,b,c. Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do corante AY25 no pH 2,50 a 390nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R.....	<b>65</b>
Figura 32 - a,b,c - Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante AY25 no pH 2,50 a 230nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R. Alta sensibilidade no UV.....	<b>66</b>

Figura 33 - a,b,c - Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante AY25 no pH 2,50 a 254nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R. Alta sensibilidade no UV.....	<b>67</b>
Figura 34 a,b,c - Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante DV51 no pH 2,50 a 550nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R.....	<b>68</b>
Figura 35 a,b,c - Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante DV51 no pH 2,50 a 230nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R. Alta sensibilidade no UV.....	<b>69</b>
Figura 36 a,b,c - Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante DV51 no pH 2,50 a 254nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R. Alta sensibilidade no UV.....	<b>70</b>
Figura 37 - a,b,c. dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante DV51 no pH 4,50 a 550nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R. Observar as diferenças com os cromatogramas do DV51 no pH 4,50...	<b>71</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Principais grupos de corantes.....	<b>6</b>
Tabela 2 - Resumo dos tratamentos (não biológicos disponíveis para efluentes têxteis.....	<b>10-11</b>
Tabela 3 - Determinação das medidas de pH e condutividade das amostras de alimento e do I.L.R. Temperatura de 25 <sup>0</sup> C, 1 atm.....	<b>33</b>
Tabela 4 - Porcentagem de remoção dos corantes AY25 e DV51 após as primeiras horas de contato.....	<b>41</b>
Tabela 5 - Áreas integradas do corante AY25, pH 2,50, comprimentos de onda 230nm, 254nm, 390nm. Tempos controle, tempo 1 (6, 24 ou 48horas) e tempo 2 (168 ou 240horas).....	<b>72</b>
Tabela 6 - Áreas integradas do corante DV51, pH 2,50, comprimentos de onda 230nm, 254nm, 550nm. Tempos controle, tempo 1 (6, 24 ou 48horas) e tempo 2 (168 ou 240horas).....	<b>72</b>

<b>SUMÁRIO</b>	
LISTA DE FIGURAS	<b>x</b>
LISTA DE TABELAS	<b>xiv</b>
RESUMO .....	<b>1</b>
ABSTRACT.....	<b>2</b>
INTRODUÇÃO.....	<b>3</b>
REVISÃO DA LITERATURA.....	<b>5</b>
1. Corantes Têxteis.....	<b>5</b>
2. Tratamento de efluentes têxteis.....	<b>9</b>
2.1. Métodos Físicos e Químicos.....	<b>9</b>
2.2. Métodos Biológicos.....	<b>12</b>
3. Os processos e a definição de biorremediação.....	<b>12</b>
3.1. Biossorção de corantes têxteis.....	<b>13</b>
3.2. Biodegradação de corantes têxteis.....	<b>16</b>
4. Biodigestores.....	<b>18</b>
MATERIAL E MÉTODOS-parte 1	<b>21</b>
1. Funcionamento do Biodigestor.....	<b>21</b>
1.1 Tipo de modelo e regime de abastecimento.....	<b>21</b>
1.2. Estabilização e produção do inóculo.....	<b>22</b>
1.3. Análise Espectrofotométrica UV-Vis.....	<b>23</b>
1.4. Análise Química e Biológica do Líquido Residual.....	<b>23</b>
MATERIAL E MÉTODOS-parte 2	<b>24</b>
1.5. Reprodução do biodigestor em escala laboratorial.....	<b>24</b>
1.6. Análises Espectrofotométricas do Inóculo UV-Vis. ....	<b>26</b>



2. Critérios para a escolha dos corantes.....	27
3. Análises Espectrofotométricas dos corantes no UV-Vis.....	27
3.1. Calibração dos corantes. ....	27
4. Teste de bioissorção e biodegradação nos diferentes valores de pH-Avaliação no UV-Vis.....	27
4.1. Teste de atividade do novo Inóculo produzido a partir do biodigestor em batelada.....	27
4.2. Inoculação das soluções de corante em diferentes valores de pH.....	28
4.3. Cálculo das Absorbâncias Relativas.....	28
5. Teste de bioissorção e biodegradação nos diferentes valores de pH. Análises no FTIR. ....	28
5.1. Análises dos controles dos corantes e das soluções após o tratamento. ....	29
6. Teste de bioissorção e biodegradação nos diferentes valores de pH-Avaliação no HPLC-UV.....	29
6.1. Leitura dos controles.....	30
6.2. Leitura dos tratamentos.....	30
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO-parte 1</b>	<b>31</b>
1. Funcionamento do Biodigestor.....	31
1.1 Tipo de modelo e regime de abastecimento.....	31
1.2. Estabilização e produção do inóculo.....	31
1.3. Análise Espectrofotométrica UV-Vis.....	32
1.4. Análise Química e Biológica do Líquido Residual.....	32
Conclusões Parciais.....	34
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO - parte 2.....</b>	<b>36</b>
1.5.Reprodução do biodigestor em escala laboratorial.....	36
1.6. Análises Espectrofotométricas do Inóculo UV-Vis. ....	37
2. Critérios para a escolha dos corantes.....	38
3. Análises Espectrofotométricas dos corantes no UV-Vis.....	38
4. Teste de bioissorção e biodegradação nos diferentes valores de pH-Avaliação no UV-Vis.....	39
4.1. Teste de atividade do novo Inóculo produzido a partir do biodigestor em batelada.....	39

4.2. Inoculação das soluções de corante em diferentes valores de pH	<b>40</b>
4.3. Cálculo das Absorbâncias Relativas.....	<b>42</b>
Conclusões Parciais.....	<b>49</b>
5. Análises no FTIR.....	<b>50</b>
5.1. O FTIR e a análise do corante “Acid Yellow 25”.....	<b>50</b>
5.2. O FTIR e a análise do corante “Direct Violet 51”.....	<b>62</b>
Conclusões Parciais.....	<b>63</b>
6. Análises no HPLC-UV.....	<b>64</b>
6.1 Análise do AY25.....	<b>72</b>
6.2. Análise do DV51.....	<b>72</b>
Conclusões Parciais.....	<b>73</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>82</b>

## RESUMO

O uso de biodigestores anaeróbios é uma versátil alternativa para produção de biomassa microbiana a partir de resíduos orgânicos. O reaproveitamento das sobras alimentares, produzidas pelo Restaurante Universitário da Unesp Campus Rio Claro, foi o responsável pela produção de um Inóculo Líquido Residual (I.L.R.) utilizado como agente biodegradador e biossorvente para os corantes azóicos “Acid Yellow 25” e “Direct Violet 51” de importante destaque industrial. O projeto dividiu-se em duas etapas, a primeira contemplando a produção do inóculo em grande escala (biodigestor de fluxo contínuo) e a segunda em escala de laboratorial (biodigestor em batelada). Os resultados da análise microbiológica revelaram a presença predominante de bactérias acidogênicas e de leveduras em menor escala. Estes microrganismos foram aplicados como inóculo nas soluções dos dois corantes em condições variadas de pH (2,50; 4,50 e 6,50). A análise dos produtos formados a partir da interação com o I.L.R demonstraram as potencialidades biodegradativas e biossorventes do consórcio microbiano e sua ação diferenciada de acordo com a mudança de pH. As aminas aromáticas e sulfonadas, formadas após a redução da ligação azóica, foram estudada a partir do sobrenadante dos tratamentos dos corantes através do uso dos métodos difundidos do UV-Vis e do HPLC aliados às análises vanguardistas do FTIR.

**Palavras-chave:** Descoloração. Acid yellow 25. Direct Violet 51. Consórcio microbiano. Biodigestor anaeróbio.

## ABSTRACT

The use of anaerobic bioreactor is a versatile alternative for the production of microbial biomass from organic waste. The reuse of the leftovers from the University Restaurant of Unesp Rio Claro Campus, was responsible for producing a Residual Liquid Inoculum (R.L.I.) used as a biodegradator and biosorptive agent for two azo dyes Acid Yellow 25 and Direct Violet 51 with a major role in the industrial scenery. The project was divided in two steps, the first covering the production of the inoculum in large scale (continuous flow bioreactor) and the second in bench-scale (in-batch bioreactor) The results of the microbiological analysis revealed a predominant presence of acidogenic bacteria and a few yeasts. These microorganisms were used as inoculum in both dye solutions at different pH conditions (2.50, 4.50 and 6.50) The analysis of the resultant by-products demonstrated the biodegradation and biosorptive potential of the consortium and its differentiated pH-regulated action. The aromatic sulfonated amines, formed after the reduction of the azoic bounds, were studied through the spreaded analytic methods of UV-Vis and HPLC in conjunct with the vanguard of FTIR device.

**Key-words:** decolorization, acid yellow 25, direct Violet 51, anaerobic bioreactor, microbial consortia.

## INTRODUÇÃO

### **A poluição da Água.**

Indiscutivelmente, a poluição da água representa um dos grandes problemas da humanidade na atualidade. Órgãos especialistas no assunto, como a Sabesp (Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo), estimam que a demanda por água seja maior que a capacidade de abastecimento para a população já a partir de 2010, na região metropolitana de São Paulo (ROMANE, 1998).

Neste contexto, os efluentes têxteis apresentam importante papel, pois seu descarte sem o tratamento apropriado pode causar danos biotóxicos e introduzir o perigo potencial de bioacumulação citado por Zee (2002), em decorrência da presença de produtos e subprodutos tóxicos e carcino-mutagênicos para os seres vivos aquáticos e para o homem (CORSO et al.,1997).

Desta forma, a biossorção e a biodegradação de dois corantes azóicos, relevantes industrialmente “Direct Violet 51” e “Acid Yellow 25”, foi estudada inicialmente a partir da interação com uma cultura mista microbiana, produzida a partir da fermentação das sobras alimentares do Restaurante Universitário da Unesp de Rio Claro e, em uma segunda fase, a partir do inóculo produzido por um biodigestor de bancada.

Os métodos analíticos da Espectrofotometria no Ultravioleta e Visível (UV-Vis), da Espectroscopia do Infravermelho (FTIR) e da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC-UV) foram as ferramentas utilizadas na avaliação da biodegradação dos corantes azóicos.

Parte da presente Pesquisa de Mestrado foi realizada na Alemanha no ano de 2007. Isso foi possível no contexto da parceria entre o **Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA) Campus Rio Claro** e o **Centro de Cooperação Acadêmica Brasil-Alemanha (COBRAL)** da **Universidade de Ciências Aplicadas de Mannheim. (HOCHSCHULE MANNHEIM)**.

A coordenação do COBRAL, pelo Prof. Dr. Harald Hoffmann e a Prof. Maria do Carmo Massoni e a supervisão do Prof. Dr. Jürgen Backhaus, que colocou seu laboratório à nossa disposição, foram essenciais à realização do trabalho.

## **REVISÃO DA LITERATURA.**

### **1 - Corantes Têxteis.**

Na Antigüidade, o homem pré-histórico já tingia casacos, tecidos e outros objetos com substâncias naturais de origem vegetal e animal. Hieróglifos do Antigo Egito descrevem minuciosamente como eram feitas a extração e a aplicação dos corantes naturais no tingimento de tecidos. Pinturas encontradas em cavernas da Altamira, Espanha, relatam como os pigmentos inorgânicos eram usados nos tempos pré-históricos (BRUNELLO, 1973).

Apesar de evidências de sua utilização durante a Pré-História somente na Época Moderna, no ano de 1865 com a descoberta do Mauve por W.H.Perkin, que a história da indústria de corantes sintéticos começou. Nos últimos 130 anos, milhares de compostos químicos coloridos foram sintetizados e um número próximo de 10.000 reflete a produção em escala industrial no início da década de 90 (ZOLLINGER, 1991).

Os colorantes abrangem os corantes e os pigmentos, apesar desses termos serem utilizados indiscriminadamente, pigmentos são compostos considerados insolúveis no meio em que serão aplicados e precisam ser misturados a um substrato antes de serem aplicados nos tingimentos, já os corantes são solúveis em meio aquoso e geralmente possuem afinidade pelo substrato em que serão utilizados (ZOLLINGER, 1991).

Aproximadamente 15% da produção mundial de corantes é perdida para o meio-ambiente durante a síntese, processamento ou tingimento dos tecidos e fibras (ANLINKER, 1977). Isso representa um lançamento diário de 128 toneladas no meio ambiente, o que é alarmante considerando-se que muitos corantes são visíveis em concentrações inferiores a

1mg. L<sup>-1</sup> e que o processo têxtil produz tipicamente efluentes com concentração entre 10 e 200mg. L<sup>-1</sup> (O'NEILL et al., 2000).

O processo de tingimento é um dos fatores fundamentais no sucesso comercial dos produtos têxteis. Além da padronagem e beleza da cor, o consumidor geralmente exige algumas características básicas do produto, por exemplo, elevado grau de fixação em relação à luz, lavagem e transpiração, tanto inicialmente como após uso prolongado (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Desta forma, a produção de corantes têxteis visa principalmente o desenvolvimento de compostos com características químicas que os tornam altamente persistentes. Os corantes podem ser divididos em várias classes *baseadas em sua constituição química* (mais comuns - azóicos – monoazo, diazo, triazo e poliazo, antraquinonas, azóicos, indigóides, ftalocianinas, triarilmetano; menos comuns: diarilmetano, indigóides, azinas, tiazinas, xantenos, nitro, nitroso, metino, tiazol, indaminas, quetonimina, etc) ou *de acordo com o modo pelo qual ocorre a fixação às fibras*: reativos, ácidos, básicos, diretos, dispersos, à cuba, de enxofre e complexados com metais ou pré-metalizados. Algumas características importantes dos grupos de corantes foram selecionadas e dispostas na **Tabela 1**.

<b>TABELA 1. Principais grupos de corantes</b>					Continua...
<b>Classe do Corante</b>	<b>Colour Index (C.I.)</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Processos</b>	<b>Composição Química</b>	
<b>Dispersos</b>	~3 <sup>a</sup> maior classe de corantes listados no C.I.: 1600, dos quais 40% estão em produção atualmente.	Raramente solúveis, são utilizados para tingir tecidos sintéticos. Tais como: acetato de celulose, nylon, poliéster e poliamida.	O tingimento requer a exposição do tecido a mais de 120°C, além da adição de um agente dispersante de cadeia longo que aumenta a interação do corante à fibra.	<b>Azóicos ou Nitro-componentes.</b> Amarelo ao vermelho. <b>Antraquinonas:</b> azul e verde. <b>Metal-complexos:</b> todas as cores.	
<b>Pigmentos Orgânicos</b>	Pequena, mas em expansão classe de corantes. ~25% dos nomes disponíveis e listados no C. I. ~1600 nomes diferentes representam apenas ~ 800 corantes.	Compostos insolúveis, não iônicos, às vezes sais. Retêm sua estrutura cristalina e particulada após o tingimento.	O tingimento é alcançado através da adição no banho de um agente químico dispersante.	<b>Azóicos:</b> amarelo, laranja ou vermelho. <b>Ftalocianinas:</b> azul e verde.	



<b>Básicos</b>	Representam 5% dos corantes listados no C.I.	Utilizados para tingir fibras com grupos ácidos, tais como o polyacryl modificado.	Possuem grupos básicos que se ligam a grupos ácidos de fibras.	<b>Diarilmetano, triarilmetano, antraquinonas</b> e compostos azóicos.
<b>Corantes à cuba</b>	<b>Corantes à Cuba (à Tina ou de Redução)</b> - É uma grande e importante classe de corantes baseada nos índigos, tioindigóides e antraquinóides.	Corantes insolúveis utilizados particularmente para o tingimento de fibras celulósicas (algodão).	O tingimento das fibras é feito através da redução da forma insolúvel (com hidrossulfito de sódio em meio alcalino) corante e sua oxidação, realizada após o banho. Transformam-se em leuco compostos, solúveis e capazes de tingir as fibras celulósicas.	<b>Antraquinonas e Indigóides.</b> A produção de hidrossulfito de sódio pode causar problemas ecológicos.
<b>Corantes De Enxofre</b>	~15% produção mundial.	Corantes com anel benzênico heterocíclico, contendo um átomo de S. Após a sua aplicação, caracterizam-se por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos.	O processo envolve redução e oxidação durante o tingimento, assim como no caso dos índigos. Utilizados principalmente para fibras celulósicas.	<b>Azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, ketonimina, nitro, e nitroso,</b> que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação: verde oliva, preto, azul marinho, marrom.

(FONTE: Adaptado de Guaratini e Zanoni, 2000; Robinson et al., 2001 e Kunz et al., 2002, Marcanti-Contato, 1995)

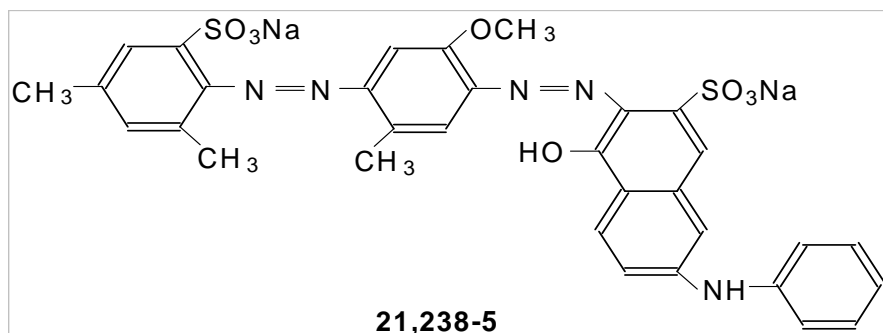
Durante o tingimento com os Corantes Reativos é necessário o acréscimo de grandes quantidades de sais e amônia (60 até 200g/L) para atingir um grau mínimo de fixação. 10 a 50% dos corantes continuam hidrolisados, permanecendo em solução

De acordo com o "Colour Indice" (C.I.), editado e desde 1924 revisado a cada três meses pela "Society of Dyers and Colourists and the American Association of Textile Chemists and Colorists", estão listados aproximadamente 28.000 nomes comerciais de corantes, representando cerca de 10.500 corantes, divididos em 15 classes.

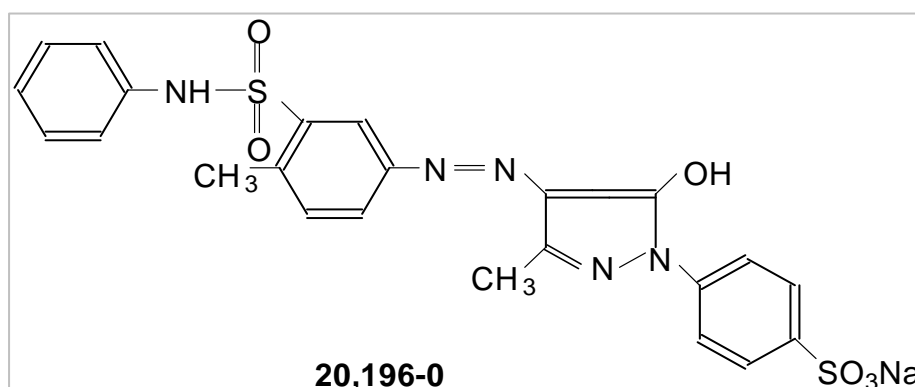
A classe de corantes, com maior número de representantes (60 a 70%) é a dos azóicos e sua participação entre reativos, ácidos e diretos é ainda maior, por isso constituem a maior parte dos efluentes de indústrias têxteis (ZEE, 2002).

A principal característica dos corantes azóicos é a ligação de anéis aromáticos por grupos  $-N=N-$  cromóforos (**Figuras 1 e 2.**) que, somada às substituições sulfonadas,

contribuem para a alta resistência dos corantes aos processos de degradação química e microbiológica (HU e WU, 2001)



**Figura 1.** Fórmula molecular do corante azóico “Direct Violet 51”.



**Figura 2.** Fórmula molecular do corante azóico “Acid Yellow 25”.

A estabilidade da molécula do corante é diretamente associada à força de ligação química dos átomos componentes dos grupos cromóforos (tais como nitro, nitroso, azo e carbonila) e auxocromos, grupos que intensificam ou modificam a cor final (etila, nitro, amino, sulfônico, hidroxila, metóxi, etóxi, cloro e bromo). Os grupos auxocromos sulfônicos tornam a molécula do corante solúvel em meio aquoso e aumentam a afinidade pelas fibras no processo de tingimento (KIMURA et al., 1999).

O corante “Acid Yellow 25” utilizado nessa pesquisa, proveniente da TMX Representação Comércio Importação e Exportação Ltda., foi descoberto por O. Dressel, H. Kothe e H. Hörlein em 1909, de acordo com as informações do fabricante. Possui a estrutura de um mono azo e é classificado por sua aplicação como corante ácido, mesmo apresentando uma estrutura complexa, a presença de um grupo sulfônico torna sua solubilidade rápida e permanente em meio aquoso (FAHL et al., 2004).

O “Direct Violet 51” é um corante bem utilizado para tingimento, pois em sua estrutura há ligantes diazo que conferem grande resistência à lavagem além de alta substantividade, o que o torna muito aderente aos tecidos (VITOR, 2005).

Os corantes diretos são em sua maioria compostos azos-sulfonados, similares aos corantes ácidos na constituição e não há uma nítida demarcação entre essas duas classes. Alguns corantes diretos podem tingir também fibras protéicas e poliamidas. A natureza da afinidade da celulose pelos corantes diretos ainda não foi satisfatoriamente explicada. Pode ocorrer por ação das forças não polares de Van der Waals, ou seja, acúmulo de cargas negativas e positivas em lugares diferentes do átomo, que se comporta como dipolo elétrico. Dentre outras explicações estão as pontes de hidrogênio e a de que a “substantividade” (ou afinidade de um corante por determinado substrato) estariam relacionados com a estrutura molecular planar do corante, que poderia permitir seu alinhamento sobre superfície da fibra. Além disso, os corantes diretos podem ser utilizados em fibras celulósicas, como já citadas, algumas protéicas e poliamidas, além de papel, couro e preparação de sais de metais pesados para uso em pigmentos, mordentes biológicos e indicadores (VITOR, 2005).

## **2 - Tratamento de efluentes têxteis.**

### **2.1. - Métodos Físicos e Químicos.**

Os corantes azóicos são predominantemente utilizados pelas indústrias têxteis, podem também ser encontrados na farmacêutica, nas indústrias de papel, tintas, couro e cosmética. Por isso, não é surpresa seu destaque no cenário de preocupações ambientais. Muitos desses corantes encontram o caminho para o meio ambiente nos efluentes industriais e, em decorrência de reterem sua cor e integridade estrutural no meio ambiente por longos períodos, mesmo sob a ação microbiana, são considerados compostos persistentes (WALLACE, 2001).

O aumento da conscientização e da rigidez das regras ambientais têm incentivado o desenvolvimento de tecnologias melhoradas no tratamento desses efluentes. Na **Tabela 2** é possível verificar as principais técnicas físico-químicas disponíveis na literatura, que envolvem principalmente os processos de adsorção, precipitação, degradação química e eletroquímicas (GUARATINI; ZANONI, 2000; ROBINSON et al., 2001).

Apesar dos principais métodos de tratamento de efluentes utilizados serem os físico-químicos (coagulação seguido por sedimentação ou flotação), esses sistemas são muito onerosos e constituem sistemas não-destrutivos. Apesar do volume de resíduos serem diminuídos, a disposição final da fase sólida é um problema. Assim, os processos de biorremediação surgem como uma alternativa ecologicamente amigável, com a facilidade de implementação em larga escala e a versatilidade da degradação de uma vasta gama de poluentes, por um custo mais acessível. Os versáteis processos de degradação microbológica serão abordados posteriormente. **TABELA 2:**

**Tabela 2.-** Resumo dos tratamentos (não biológicos) disponíveis para efluentes têxteis.

Continua

<b>Método</b>	<b>Princípios Gerais</b>	<b>Corantes Alvo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Técnicas de Adsorção</b>	Passagem da amostra em adsorvente na forma de filtro. Carvão ativado, Sílica Gel, Bauxita, Resinas de Troca Iônica.	O sucesso da adsorção é determinado pela interação do corante e do adsorvente.	Efetivo para tratamento de pequenos volumes.	Lento e não econômico.
<b>Carvão Ativado:</b>	A técnica mais usada e conhecida para remoção de corantes. Superfície adsorptiva é positiva.	Remoção de corantes catiônicos mordentes e ácidos e em menor extensão de corantes dispersos, direto <i>vat</i> e reativos.	Alta eficiência da remoção da cor.	Custo elevado. Reativação não é totalmente efetiva.
<b>Alternativas</b> Turfa, serragem e outros derivados de celulose, como bambu e casca de eucalipto, quitosana.	Adsorção.	Boa remoção de uma vasta gama de exceto os cationicos Boa capacidade adsorptiva para corantes ácidos.	Bom adsorvente devido à estrutura celular.	Área específica para adsorção menor do que a do carvão ativado. Tempo de retenção elevado.
<b>Troca-iônica</b>	O efluente é movido através de uma resina até que todos os sítios estejam saturados.	Corantes catiônicos e aniônicos podem ser removidos.	Regeneração sem perda dos adsorventes. Recuperação do solvente após o uso e remoção de corantes solúveis.	Não efetivo para corantes dispersos. Custo elevado dos solventes orgânicos.
<b>Coagulação/ Filtração</b>	Uso de polietilótritos -Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , amônia e/ou flocculantes (sais de ferro e alumínio).	Tratamento mais adotado nas indústrias têxteis, geralmente seguidos de tratamento biológico seguido de lodos ativados.	Graus variados de sucesso para tratamento terciário do efluente, especialmente na remoção da cor.	Resultado depende do tipo de corante a ser removido, composição, concentração e fluxo do rejeito. A alta eficiência está ligada à utilização de um excesso de polietilótrito, o que acrescenta grande volume de resíduo ao efluente e grande formação de lodo.
<b>Fentons reagente</b> <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe (II) Sais.</b>	Separação química que se utiliza da propriedade de oxidação ou de ligação com o corante.	Descoloração de corantes solúveis e insolúveis.	Técnica química indicada quando o efluente é resistente ao ataque microbiano ou tóxico para a biomassa.	Geração de lodo devido à flocculação do reagente e das moléculas de corante.
<b>Tecnologias de Membranas</b>	Retenção das moléculas com determinado tamanho pelas membranas Nanofiltração, Microfiltração, Ultrafiltração e Osmose Reversa.	Remove todos os tipos de corantes.	Tratamento rápido e satisfatório para grandes volumes. Possibilitam o reúso da água no processo industrial.	Custo elevado e limpeza das membranas é complicada. Alta formação de lodo.

**Tabela 2 - Resumo dos tratamentos (não biológicos) disponíveis para efluentes têxteis. ....**

Conclusão

<b>Método</b>	<b>Princípios Gerais</b>	<b>Corantes Alvo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Degradação Química Ozônio.</b>	Para o tratamento de efluente têxtil o ozônio se mostra muito atrativo. Geralmente, os cromóforos com grande número de conjugação de ligações duplas podem ser atacados pelo ozônio direta ou indiretamente, descolorindo o efluente.	A dosagem aplicada no efluente depende do total de cor e COD presentes. Agente oxidante poderoso com capacidade de reagir com inúmeros compostos.	Aplicado no estado gasoso: sem alteração do volume.	Meia-vida curta (20min) implica na ozonação continuada consequentemente o alto-custo. Possível aumento da toxicidade de alguns intermediários de reação o que implica no acompanhamento do processo através de testes de toxicidade.
<b>Processos oxidativos avançados (KAMMIRADT, 2004)</b>	Agente oxidante H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ativado por luz ultravioleta, por exemplo.	Idem ao anterior.	Remoção do corante do efluente pela clivagem do anel aromático.	Evita a geração de resíduos degradando totalmente a molécula de corante.
<b>Hipoclorito de Sódio (NaOCl)</b>	Em solução é completamente dissociado a Na <sup>+</sup> e ClO <sup>-</sup> , enquanto uma pequena porção é hidrolisada a hidróxido de sódio e ácido hipocloroso. O poder oxidante deste e do hipoclorito quebram as moléculas de corantes.	Não indicado para os corantes dispersos e diretos. Boa ação para os corantes monoazo e os antraquinonas.	Inicia e acelera a clivagem da ligação azo.	Liberação de aminas aromáticas.
<b>Eletrólise</b>	A degradação da molécula é realizada eletroquimicamente através do potencial ou corrente controlada, ou através de componentes secundários gerados eletroquimicamente.	Indicado para todas as classes de corantes.	Compostos resultantes da degradação são não tóxicos. Baixo ou gasto inexistente de compostos químicos.	Alto gasto de eletricidade. Porém a produção de reações paralelas que geram cloro, radicais hidroxila tem diminuído a potencialidade do método.
<b>Reações Fotoquímicas</b>	Degrada moléculas de corantes a CO <sub>2</sub> e água. Pelo uso de UV na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Degradação ocorre em função da formação de radicais hidroxila.	Inúmeros corantes, principalmente azóicos.	Sem produção de lodo. Mineralização de uma vasta gama de substâncias de relevância ambiental, inclusive muito corantes têxteis.	Formação de subprodutos como halídeos, metais, sais inorgânicos, aldeídos e ácidos carboxílicos. Problemas de ordem prática: como fonte de radiação ultravioleta artificial, penetração da radiação no meio de reação, dificuldades na separação dos fotocatalisadores. Difícil implementação em larga escala pelos motivos acima citados.
<b>Cucurbituril</b>	Polímero cíclico de Glycoril e formaldeído. Forma compostos “hóspede” com aminas aromáticas.	Formação de agregados insolúveis cucurbituril-corante-cátion.	Boa capacidade sortiva para muitos corantes.	Custo elevado. Para ser utilizado em escala industrial, deve ser incorporado a um filtro de leito fixo.
<b>Coagulação Eletrocinética</b>	Adição de sulfato férrico e cloreto férrico.	Excelente remoção de corantes diretos.	Econômico e interessante método para remoção de corantes.	Produção de grande volume de lodo, e consequente aumento do custo para a disposição final do lodo.

FONTE: Adaptado de Zollinger, 1991; Guaratini e Zanoni, 2000, Robinson et al., 2001 e Kunz et al., 2002,

## **2.2. - Métodos Biológicos.**

Inúmeros trabalhos estão disponíveis abrangendo a biorremediação de corantes têxteis, seja pela bioadsorção microbiana, biodegradação ou diminuição da toxicidade dos efluentes. Ambos incluem-se entre os processos de biorremediação. O primeiro com enfoque na remoção física do corante pela biomassa. O segundo na forma de degradação enzimática das moléculas do corante objetivando-se a mineralização, mais rara e geralmente alcançada quando o processo é aliado a outras técnicas.

Ressalta-se que não há metabolização do corante durante a bioadsorção, mas apenas sua remoção do meio, desta forma, espera-se que a toxicidade possa ser atenuada com a diminuição da concentração do poluente. Ambos são biorremediadores e a atenuação da toxicidade é uma consequência parcial, mas também importante, dos processos de biorremediação.

## **3 - Os processos e a definição de Biorremediação.**

A biotecnologia ambiental não constitui um campo novo, compostagem e tratamento de água são tecnologias bem conhecidas e já utilizadas. Entretanto, estudos recentes em biologia molecular e ecologia oferecem novas oportunidades para melhorar esses processos biológicos.

A biorremediação é definida como o processo no qual contaminantes ou poluentes são degradados, sob condições controladas, até atingirem um estado inócuo ou níveis abaixo dos limites estabelecidos pelos órgãos fiscalizadores (MUELLER et al., 1996).

Por definição, biorremediação é o uso de organismos vivos, especialmente microrganismos, para degradar os contaminantes ambientais a formas menos tóxicas. Utilizam-se fungos, bactérias, cianobactérias, algas e plantas para degradar e detoxificar substâncias perigosas ao homem e ao meio ambiente. Os organismos utilizados podem ser endógenos da área contaminada ou isolados de outro local e, posteriormente, trazidos ao sítio contaminado.

A biorremediação é efetiva apenas quando as condições ambientais permitem o crescimento microbiano e a sua atividade, desta forma, seu sucesso envolve necessariamente a manipulação ambiental dos parâmetros necessários ao seu desenvolvimento (VIDALI, 2001).

No caso dos tratamentos biológicos, procuram-se imitar o metabolismo de estabilização dos seres vivos (existentes nos rios, lagoas, mares, solos e atmosfera) que transformam a matéria orgânica em novos constituintes celulares (VITOR, 2005). Os contaminantes são

transformados pelos organismos através de reações que fazem parte do seu próprio metabolismo. A biodegradação de um composto geralmente é resultado da ação de um conjunto de organismos, cada um atuando em um passo da degradação.

No contexto de crescimento e atividade microbiana, fatores como o pH, temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes são fundamentais. Embora muitos microrganismos tenham sido isolados de condições extremas, a maioria deles cresce dentro de uma estreita faixa ótima (VIDALI, 2001). Para que a biorremediação seja viável e efetiva, tais fatores devem ser considerados no cultivo em condições laboratoriais. Quanto menos exigente é a espécie ou o consórcio de microrganismos estudado, a biorremediação é mais vantajosa e viável.

Dada a complexidade das interações biomassa-poluinte, quando se consideram os processos de biodeterioração, entre a biodegradação do poluinte e sua total mineralização, existem passos intermediários agrupados entre os processos interfaciais, que devem ser considerados nos estudos mais verossímeis; formação de biofilmes, deposição, “leaching”-degradação dos aditivos- no caso de polímeros, corrosão, hidratação e penetração, colorização do meio (FLEMMING, 1997).

### **3.1. - Biossorção de corantes têxteis.**

Uma das técnicas de remediação está no uso da capacidade adsorptiva de certos tipos de biomassa ou compostos inorgânicos. A adsorção por materiais como o carvão ativado foi observada como eficaz na remoção de alguns tipos de corantes, porém seu custo impossibilita a aplicação em larga escala. Assim, procuram-se substituintes, de baixo-custo, como a turfa, cinzas, sílica, serragem e outros tipos de biomassa com alguma afinidade química com os corantes (RAMAKRISHNA; VIRARAGHAVAN, 1997; EL-GEUNDI, 1991; ABO-ELALA et al., 1988). Entretanto, esses adsorventes têm uma capacidade reduzida quando comparados ao carvão ativado e grandes quantidades seriam necessárias para o tratamento, o que novamente limita seu uso.

A biossorção é uma alternativa que tem ganhado importante destaque no cenário de remoção de poluentes de efluentes. O termo que se aplica à interação de biomassa viva ou processada de bactérias, algas, cianobactérias, leveduras, fungos filamentos, etc., com corantes ou outras substâncias poluentes, como metais pesados. No primeiro caso, variáveis como o impacto do poluinte na população microbiana e as condições de crescimento para a mesma devem ser considerados, no segundo geralmente a biomassa é processada e pode ser imobilizada para composição de filtros biológicos. A recuperação da substância-alvo é mais

fácil, e a lavagem da biomassa permite sua reutilização, entretanto apenas no primeiro a biodegradação ocorre, porque o arsenal enzimático está ativo.

Robison et al. (2001) sugeriram a utilização de biomassa microbiana em um tratamento hipotético de efluentes, que aliaria o método de biossorção de corantes têxteis a um estágio posterior de fermentação sólida do resíduo sólido saturado de corante e outros produtos, produzido pela primeira fase do tratamento. A fermentação seria realizada com *Phanerochaetes chrysosporium*, por exemplo, e o produto resultante aplicado para enriquecimento de solo agrícola.

Quando se estudam as células mortas, as moléculas do corante podem ser retidas por essa biomassa sem a ocorrência da sua biodegradação. Este fato é extremamente importante, pois implicaria na remoção do corante associado sem seu desdobramento em subprodutos tóxicos (CORSO, 1998).

Portanto, para as células vivas, há dois mecanismos através dos quais os microrganismos podem retirar a cor do efluente: a biodegradação e a biossorção.

A primeira realiza-se por meio da utilização de enzimas que atacam e desfazem as ligações químicas mais importantes dos corantes (para que o corante possa ser utilizado como fonte alternativa de carbono) e a segunda ocorre pela retenção das moléculas do corante por componentes celulares do microrganismo (MOU et al., 1991). Além disso, quando a célula está viva há possibilidade do transporte do corante para dentro da mesma, o que envolveria o gasto de energia e a interação com grupos químicos das organelas celulares presentes.

Para as células mortas, apenas a biossorção ocorre. Esta envolve interações entre o corante e sítios (na parede celular do microrganismo) através de interações passivas físico-químicas tais como a adsorção, a deposição e a troca-iônica (FU; VIRARAGHAVAN, 2001).

Assim, o termo biossorção é utilizado para explicar os fenômenos de remoção de moléculas potencialmente tóxicas de soluções aquosas por adsorção na parede celular ou outros tipos de ligações químicas com estruturas existentes dentro da célula (CORSO, 1998), o termo é normalmente utilizado para células vivas e mortas.

No contexto descrito por Zollinger (1991), no final da década de 70, trabalhos pioneiros sobre biossorção de corantes por microrganismos foram realizados no Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Unesp de Rio Claro.

ANGELIS et al. (1979) apresentaram os primeiros ensaios estudando o crescimento o fungo *Neurospora crassa* 74A em culturas contendo o corante Azul Quimacel e verificaram a remoção de 80 a 93% da cor pela biomassa nas primeiras 24 horas.



Vários tipos de corantes têxteis como o “Basic Orange 2” e o “Basic Brown” (básicos), “Acid Yellow 23” e “Acid Orange 7” (ácidos), “Direct Red 23” e “Direct Violet 51”(diretos), “Procion Blue-MXG” e “Procion Scarlet-MXG” (reativos) foram estudados para se verificar a capacidade de remoção de colônias paramorfogênicas de *Aspergillus niger*, na forma de “pellets” miceliais de 1mm. Nestes trabalhos foram avaliadas as capacidades biossorbitiva e biodegradativa do fungo. Os corantes que mais interagiram foram os reativos e os diretos (MARCANTI-CONTATO; CORSO, 1993).

*Neurospora crassa* também foi utilizado por CORSO et al. (1981) para interagir com o corante Vermelho Reanil P8B. Variando-se as concentrações de corante em solução, o autor encontrou os melhores resultados de remoção (em torno de 90%) nas soluções aquosas contendo 32 e 64 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , revelando ainda que o crescimento microbiano não foi afetado pelo corante.

A fim de descobrir se apenas há a ligação externa da membrana com o corante ou há a sua internalização, BRAHIMI-HORN et al. (1992) estudaram a compartimentalização das células e observaram as células intactas e não-intactas concluindo que, depois de 24 horas, a biossorção era maior no caso das células com membrana intacta. Isso sugeriu que, neste caso, a integridade da célula foi importante para manter sua capacidade de reter o corante.

Comparando células vivas e autoclavadas de *P. chrysosporium* para tratar o corante “Congo Red”, Tatarko e Bumpus (1998) observaram que a remoção era 90% no caso das células vivas e 70% de remoção para as autoclavadas.

VITOR (2005) apresentou os resultados da interação da levedura *Candida albicans*, isolada de um efluente industrial, em processos de remoção de corantes azóicos. Neste estudo o corante escolhido foi da classe dos diretos, o “Direct Violet 51” em solução aquosa. A levedura selvagem foi utilizada na forma de suspensão no estudo da biossorção do corante e o valor de pH 2,5 foi o que melhor se mostrou ativo quanto a capacidade de remover o corante frente às biomassas não autoclavadas e autoclavadas de *Candida albicans*. Em todos os experimentos de interação biossorbitiva realizados entre a biomassa e o corante, as células autoclavadas foram as que apresentaram uma maior capacidade biossorbitiva em relação às células não autoclavadas.

Polman e Breckenridge (1996) através de estudos com outras 28 espécies de microrganismos, inferiram que a alta capacidade de adsorção das células autoclavadas pode estar relacionada com o aumento da superfície celular, o que ocorre depois da ruptura da membrana.

Há casos em que o oposto acontece, o que pode estar relacionado com as características químicas do corante e suas afinidades com a do microrganismo utilizado. As vantagens da biomassa morta é que ela não precisa de um meio de cultura com características específicas, pode ser armazenada e utilizada posteriormente, podendo ser obtida de restos de tanques de fermentação (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995).

### **3.2. - Biodegradação de corantes têxteis.**

A ação dos microrganismos como agentes efetivos na destruição e reciclagem de materiais orgânicos na biosfera é aceita de forma incontestável. As reações de biodegradação podem quebrar as cadeias dos compostos orgânicos mineralizando-os e, muitas vezes, alterando sua toxicidade (PAINTER, 1995).

Portanto, segundo Koncan e Somen (1999), o conhecimento do mecanismo da síntese enzimática é extremamente importante, pois é o elemento chave na busca de respostas para uma degradação mais rápida objetivando a diminuição do impacto ambiental causado por efluentes tóxicos.

Relata-se na literatura a biodegradação de corantes azóicos sob condições anaeróbias e aeróbias, entretanto, muitos corantes azóicos apresentam-se resistentes à degradação por bactérias aeróbias (RAZO-FLORES et al., 1997). A presença de um mecanismo de “repulsão eletrônica” do grupo azo contra o ataque das oxigenases (PLUMB et al., 2001) seria a responsável pela resistência da degradação em condições aeróbias.

Esses corantes são reduzidos e descolorizados quando atuam como aceptores de elétrons para a cadeia de transporte microbiana (CARLIELL et al., 1996). A redução das ligações azo gera aminas primárias (FITZGERALD; BISHOP, 1995) que, com algumas exceções, não são degradadas aerobicamente (BROWN; HAMBURGER, 1987).

Essas aminas aromáticas são mineralizadas por pela ação de enzimas não específicas através de hidroxilação e abertura do anel aromático (EASTON, 1995; ZISSI; LYBERATOS, 1996).

Desta forma, os corantes azóicos são degradados a aminas aromáticas preferencialmente em condições anaeróbias e seus subprodutos são degradados geralmente em condições aeróbias (SPONZA; IŞiK, 2005). Corantes geralmente não são citotóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos, mas as aminas aromáticas formadas podem possuir estas indesejáveis características (HARMER et al., 1992).

Grande variedade de organismos anaeróbios, incluindo alguns da flora intestinal humana, possui a habilidade de produzir aminas aromáticas a partir de corantes como a tartrazina, por exemplo. Tal processo pode se realizar dentro do sistema digestório humano e produzir moléculas carcinogênicas como o benzidino e a 4-aminoanilina (CHUNG e STEVENS, 1992; BROWN; DE VITO, 1993).

Field et al. (1995) demonstraram que o tratamento aeróbio e anaeróbio combinado de efluentes têxteis podem eliminar a Demanda Química de Oxigênio (DQO) adicional atribuída à presença de aminas aromáticas. Componentes como ácido-6-aminonaftaleno-2-sulfônico mostraram-se totalmente degradados por uma cultura mista de microrganismos aeróbios (ROZGAJ; GLANCER-SOLJAN, 1992).

Um exame da literatura destaca ação de alguns microrganismos que despertaram o interesse pelo estudo de fungos e bactérias nos processos de biorremediação de inúmeros xenobióticos e finalmente dos corantes têxteis. No contexto da classe dos têxteis, o versátil fungo de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium*, com capacidade de mineralizar além da lignina, pelo menos parcialmente e em alguns casos completamente, uma variedade de poluentes resistentes à degradação. O sistema lignolítico deste fungo é representado principalmente pelas enzimas lignina-peroxidase e manganês peroxidase, as quais são produzidas em meios contendo fontes limitadas de carbono e nitrogênio. Estas enzimas têm a capacidade de despolimerizar a lignina e uma grande variedade de outros compostos. Especialmente para efluentes têxteis, alguns estudos têm sido realizados explorando sua capacidade de degradar e mineralizar corantes (KUNZ et al., 2002).

JESUS (2005) descreveu a utilização do fungo *Neurospora crassa* 74A para avaliar a remoção por bioissorção e biodegradação de doze corantes, entre ácidos, diretos, reativos e xantenos. Os resultados demonstraram que o processo inicial de remoção deu-se por bioissorção, na qual a parede celular do fungo funcionou como um filtro atrativo para as moléculas de corante do meio, o que ocorreu com maior intensidade em valores de pH mais baixos. A autora analisou também o nível de biodegradação dos corantes através das análises em Infravermelho com transformada de Fourier.

VITOR (2005), trabalhando com a interação entre *Candida albicans* e “Direct Violet 51”, conseguiu resultados semelhantes nos valores inferiores de pH. O estudo comparativo realizado entre as leituras das amostras pelo aparelho UV-VIS e pelo FTIR mostraram que ocorreram alterações na estrutura do corante, um relevante indício de biodegradação demonstrando o potencial enzimático da levedura, capaz de alterar as estruturas químicas destes pigmentos coloridos que são encontrados em efluentes industriais.

Considerando-se que os corantes azóicos são predominantemente degradados em condições anaeróbias, com clivagem das ligações azo por enzimas não-específicas e atuando como receptores de  $H^+$  na cadeia de transporte microbiana, e que em condições aeróbias geralmente são persistentes, o trabalho desta dissertação foi realizado em condições de anaerobiose.

#### **4 - Biodigestores.**

Biodigestores são ambientes artificiais usados para tratamento *ex-situ* de resíduos orgânicos, água ou solos contaminados que podem ser transferidos de seu local original para o sistema.

Um biodigestor pode ser definido como um “container” dentro do qual se cria um sistema trifásico (sólido-líquido-gás) com as condições necessárias para o aumento da taxa de digestão de moléculas poluentes pelos microrganismos. Tais sistemas, podem ser empregados para o tratamento de resíduos orgânicos sólidos, esgotos domésticos e efluentes industriais (VIDALI, 2001).

Qualquer material orgânico submetido a um processo de biodigestão anaeróbia (através de um biodigestor) produzirá biogás e um resíduo orgânico na forma de lodo estabilizado. A aplicação desses resíduos e de outros diversos, como as sobras alimentares, é particularmente importante, na medida em que os biodigestores anaeróbios têm como objetivo a redução do impacto ambiental, causado pelos grandes centros geradores de resíduos orgânicos, em termos de saneamento e reciclagem de parte da energia nele contida sob a forma de biogás (COSTA, 1995).

A digestão anaeróbia consiste basicamente na degradação da matéria orgânica por uma flora microbiana mista, na ausência de oxigênio livre, que através da fermentação produz metano ( $CH_4$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Ocorre naturalmente em diversos ecossistemas naturais, como pântanos, sedimentos de rios e lagos, aparelho digestivo dos animais superiores e nas camadas profundas do solo (RUIZ, 1992).

Este processo possui quatro fases predominantes: a hidrólise, acidogênese (formação de  $H_2$  e  $CO_2$ , acetato e ácidos orgânicos maiores que o acetato), acetogênese e metanogênese, determinados a partir de critérios bioquímicos e microbiológicos (GERMANO, 1990; BARANA, 2001; SEGHEZZO, 2004).

A utilização de biodigestores para estabilizar matéria orgânica residual ou poluente assume estratégica posição na redução do impacto ambiental produzido pelos grandes centros geradores de resíduos orgânicos, em termos de saneamento e otimização da produção de

insumos na forma de fertilizantes, ou de energia na forma de biogás (BORJA e BANKS, 1996).

Há diversas aplicações do lodo estabilizado de biodigestores, pois estes, quando resultantes de processos bem regulados, conservam produtos nobres como nitrogênio, fósforo e potássio, potencialmente utilizáveis na adubação. A própria produção de biogás converte diversos tipos de biomassa poluidora em combustível, economizando petróleo e álcool (GERMANO, 1990).

Os efluentes dos biodigestores podem constituir importante fonte de fertilizantes para a agricultura, poupa-se matéria-prima, encontrando-se um destino apropriado para resíduos orgânicos. Fries e Aitas (1990) concluíram que a quantidade de nitrogênio absorvido e o rendimento de matéria seca foram maiores nos tratamentos com efluente de biodigestor no cultivo de sorgo, enquanto Mastrocola (1983) e Valeriano (1987) verificaram que a aplicação de efluente de biodigestores foi benéfica para a produção de milho.

Villela Junior et al. (2003) demonstraram que o acréscimo parcial de efluente da biodigestão anaeróbia de estrume de vaca, provocou o crescimento vegetativo mais rápido e o aumento da produtividade do meloeiro (*Cuculis melo L.*).

Embora a experiência prática com o tratamento anaeróbio de efluentes de indústrias seja recente, o potencial de aplicabilidade do processo pode ser avaliado a partir do conhecimento de algumas características do rejeito a ser tratado. Uma avaliação preliminar dessas características auxiliará na escolha do processo de tratamento mais adequado, permitindo estimativas da produção de sólidos biológicos, de requisitos de nutrientes, de produção de metano, etc. (MORAES e PAULA JÚNIOR, 2004).

Além disso, o consórcio de microrganismos, produzido durante a fermentação de resíduos orgânicos, pode apresentar capacidades bioassortivas e biodegradativas para diversos tipos de poluentes. Tal idéia foi utilizada na verificação das potencialidades de um Inóculo Líquido Residual, produzido por um biodigestor anaeróbio de alimentos, na biodegradação de corantes têxteis.

Resultados parciais desse estudo foram analisados sob a espectrofotometria UV-VIS (ALMEIDA, 2005) e motivaram a continuidade da pesquisa, realizada com a implementação dos métodos analíticos FTIR e HPLC-UV, culminando na presente Dissertação de Mestrado.

Desta forma, foi proposto primeiramente, o reaproveitamento de sobras alimentares do Restaurante Universitário da Unesp (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA) Campus de Rio Claro, para abastecimento de um biodigestor anaeróbio do tipo fluxo contínuo.

O biodigestor foi desenvolvido pelo Prof. Dr. Gilson Coutinho Junior, para produção de um inóculo utilizado na bioissorção e biodegradação dos corantes azóicos “Acid Yellow 25” e “Direct Violet 51”. Posteriormente, o trabalho seguiu com a reprodução do biodigestor em escala laboratorial e a produção de um novo estoque de inóculo para degradar os corantes escolhidos.

## MATERIAL E MÉTODOS - PARTE 1

### 1. - Funcionamento do biodigestor.

#### 1.1. Tipo de modelo e regime de abastecimento.

O modelo do biodigestor do tipo “Fluxo Contínuo” foi construído e desenvolvido pelo Prof. Dr. Gilson Coutinho Junior com o intuito de reaproveitar as sobras alimentares das refeições realizadas diariamente no Restaurante Universitário (R.U.) da UNESP Campus Rio Claro **Figura 3**.



**Figura 3.** Biodigestor anaeróbico de alimentos utilizado para a produção do I.L.R.

## 1.2. Estabilização e produção do inóculo.

Após serem colocadas na abertura superior do biodigestor, as sobras alimentares passaram por um processo de fermentação (com duração de 30 dias).

Para dar a “partida” do processo, uma cultura mista de bactérias foi acrescentada às sobras, antes destas serem bombeadas para dentro do reator (**Figura 4**).



**Figura 4.** Inoculação das sobras alimentares com E.M. (Microrganismos Exógenos) antes de serem bombeadas para dentro do biodigestor anaeróbio. E.M. produzido pela Fundação Mokiti-Okada.

Esse consórcio de microrganismos recebeu a denominação de E.M. (Microrganismos Exógenos)<sup>1</sup>. Desenvolvida pela Fundação Mokiti-Okada, foi adquirida pela Prof. Dra. Dejanira de Fransceschi de Angelis para aplicação em experimentos na área de biodegradação, principalmente de compostos derivados do petróleo, por sua equipe de trabalho junto ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Unesp de Rio Claro.

Após este período, através de uma pequena torneira localizada na parte inferior do aparelho, o **Inóculo Líquido Residual (I.L.R.)**, resultante da fermentação foi coletado, armazenado em frasco opaco e mantido sob refrigeração a 10° C em câmara fria, até ser utilizado como agente biossortivo e biodegradativo dos corantes.

---

<sup>1</sup> (Informação Verbal 2) Consórcio microbiano composto essencialmente por leveduras e bactérias segundo a Prof. Dra. Dejanira de Fransceschi de Angelis.



### **1.3. Análise espectrofotométrica do inóculo no UV-Vis.**

**1.3.1. Aparelhos:** Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453. Estufa de Secagem Fanem modelo CB2, Agitador magnético modelo Fisatom 752, Balança Analítica Mettler modelo H6T, Refrigerador Cònsul 280 Litros, Agitador de Tubo modelo Phoenix AP56, pHmetro Digimed modelo DMPH2, autoclave Fabbe modelo 104C, centrífuga Fanem modelo Excelsa 2.

**1.3.2. Materiais:** tubos de vidro, beakers, espátulas, pipetas, luvas de borracha, balões volumétricos, beakers, bastão de vidro, conta-gotas, pissetas e outros materiais de uso comum em laboratório.

**1.3.3. Método:** Foram realizadas leituras espectrais das soluções de inóculo entre os comprimentos de onda 190 e 800nm. Foram diluídos 0,125mL do I.L.R. em 4,875mL de água destilada ajustada nos valores 2,50; 4,50 e 6,50. Uma quarta diluição contemplou o pH 3,40, o mesmo que o inóculo possuía ao ser retirado do biodigestor. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

### **1.4. Análise Química e Biológica do Líquido Residual.**

Através de análises químicas (pH, condutividade, sólidos totais) e biológicas (plaqueamento microbiológico com contagem de Unidades Formadoras de Colônias).

#### **1.4.1. Análises químicas (Sólidos Totais, pH e Condutividade).**

As determinações dos Sólidos Totais Suspensos (SST), Sólidos Totais Voláteis (STV) e Sólidos Suspensos Fixos (SSF) do substrato (sobras de alimentos) e do I.L.R. foram realizadas dentro das normas do “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (AWWA, 1999).

As medidas de pH foram realizadas diretamente no inóculo com introdução do eletrodo do medidor de pH, modelo Digimed DMPH2, em 100mL do líquido homogeneizado sobre o agitador magnético modelo Fisatom 752. A condutividade foi medida em seguida, através do condutivímetro TecnoPan CA150.

#### **1.4.2. Análises Microbiológicas (Contagem das Unidades Formadoras de Colônias).**

Através da técnica de “*Pour Plate*” (semeadura em profundidade), foram realizadas diluições seriadas decimais do inóculo em solução de NaOH 0,85% m/v.

Alíquotas de 1mL do inóculo puro foram transferidas para 9ml de solução salina estéril e homogeneizado por agitação. Desta forma obteve-se a diluição  $10^{-1}$ .

As diluições subseqüentes foram realizadas transferindo-se 1mL da solução  $10^{-1}$  para 9mL de solução salina, obtendo-se  $10^{-2}$ . Desta forma, foram realizadas diluições em série até a  $10^{-8}$ . A partir de cada uma das diluições, alíquotas de 1mL foram pipetadas em placas de Petri esterilizadas.

Os meios de cultura utilizados foram os PCA (*Plate Count Agar*) para contagem de bactérias e PDA (*Potato Dextrose Agar*) para contagem de fungos.

Os meios foram colocados sobre as alíquotas do I.L.R., tampados e homogeneizados delicadamente com a palma da mão sobre a placa, movimentando-se o conjunto sobre a bancada na forma de “8”.

As placas contendo o Meio PCA (*Plate Count Agar*) foram mantidas a  $36^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, após este período as colônias foram contadas sob lupa.

As placas contendo o Meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) foram mantidas em estufa de incubação a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. Após este período foi realizada a contabilização das Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C.).

Todos os plaqueamentos foram realizados em triplicatas, contemplando diluições entre  $10^{-2}$  e  $10^{-8}$ . Foram consideradas para contagem as placas que apresentaram entre 30 e 300 U.F.C.

## MATERIAL E MÉTODOS - PARTE 2

A segunda parte da pesquisa foi realizada no **Instituto de Análise Instrumental Analítica e Bioanalítica** (Instrumentelle Analytik und Bioanalytik), na **Universidade de Ciências Aplicadas de Mannheim** (Hochschule Mannheim), Alemanha, sob supervisão do **Prof.Dr. Jürgen Backhaus**.

### 1.5. Reprodução do Biodigestor em escala laboratorial

Para permitir a continuidade e a repetibilidade do método e a reprodução do experimento, o biodigestor foi remodelado em escala laboratorial e novo estoque de inóculo foi produzido a partir deste.

Este biodigestor do tipo batelada, foi desenvolvido pelo Prof. Dr. Carlos Renato Corso e montado no Instituto Instrumental Analítico e Bioanalítico da Universidade de Ciências Aplicadas de Mannheim. (HOCHSCHULE MANNHEIM), Alemanha. **Figuras 5a, b,c,d.**



**Figura 5a.** Vista superior com esfera metálica para coleta do I.L.R. **b.** Vista frontal. Recipiente metálico utilizado na disposição de resíduos. Na confecção do biodigestor foi utilizado um recipiente estéril e novo. **5c.** Peça montada para retirada do I.L.R.: tampa plástica do recipiente com furo para passagem de uma mangueira de PVC posteriormente conectada a um tubo de alumínio oco. Extremidade do tubo de alumínio dentro da esfera de peneira metálica, compondo o aparato de extração do líquido. **5d.** “Vista superior do “container” de metal”.

### 1.5.1. Alimentação do Biodigestor.

Após serem colocadas na abertura superior do biodigestor, as sobras alimentares foram misturadas a 100mL do I.L.R. produzido pelo primeiro biodigestor. Essa inoculação foi necessária para dar a “partida” no processo fermentativo. O I.L.R. produzido pelo primeiro biodigestor foi concentrado com remoção de 90% da água.

### 1.5.2. Extração e purificação do inóculo.

**1.5.2.1. Materiais:** Estufa de Secagem Heraeus automática, Refrigerador Liebeherr Profiline 450L, Agitador de Tubo modelo Phoenix AP56, Centrífuga Sigma 6K15, pipeta Pasteur, seringa de plástico 10mL, mangueira de PVC, funil de plástico, papel filtro, tubos cônicos de centrífuga com rosca (50mL).

**1.5.2.2. Método:** Após o período de 30 dias, o biodigestor, mantido em estufa de crescimento à 25° C, produziu uma pasta de alimentos que, para ser extraída, foi bombeada através de uma mangueira de PVC por uma seringa. O material extraído foi purificado para produção do I.L.R.

Um volume de 50mL da pasta foi colocado em tubos de centrífuga e submetido a uma centrifugação por 20 minutos, 894 x g. O líquido intermediário, entre a camada de gordura e o sedimentado, foi extraído com um conta-gotas e filtrado. As impurezas restantes foram retidas através de uma filtração com papel filtro convencional. Este líquido foi utilizado como novo I.L.R.

## **1.6. Análises espectrofotométricas do inóculo no UV-Vis.**

Repetindo o procedimento descrito no item 1.3., o “novo” I.L.R. passou pela análise do UV-Vis, entretanto pela similaridade dos gráficos obtidos, apenas os resultados do item 1.6. foram apresentados.

**1.6.1. Aparelhos:** Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453. Estufa de Secagem Heraeus automática, Agitador magnético modelo Heizen, Balança Analítica Adventure Pro OHAUS, Refrigerador Liebeherr Profiline 450L, Agitador de Tubo modelo Phoenix AP56, pHmetro Calimetric Knick 766, Centrífuga Sigma 6K15.

**1.6.2. Materiais:** cubetas de quartzo de 1,0cm, tubos de vidro, pipetas 10, 100 e 1000µL eppendorf, beakers, espátulas, pipetas, luvas de borracha, balões volumétricos, beakers, bastão de vidro, conta-gotas, pissetas e outros materiais de uso comum em laboratório.

**1.6.3. Método:** Realizaram-se leituras espectrais das soluções de I.L.R., entre os comprimentos de onda 190 e 800nm, na diluição de 4,875mL de água com pH ajustado (2,50; 4,50; 6,50 e 3,40) para 0,125mL de I.L.R., com o objetivo de observar eventuais mudanças nas absorções do inóculo frente às variações do pH. O valor 3,40 refere-se à leitura da solução de inóculo no pH de saída do biodigestor.

## **2. - Critérios para escolha dos corantes.**

- Constituição molecular e química dos corantes deveria ser conhecida, como parâmetro necessário às análises de comparação espectral antes e após o tratamento.
- Em virtude da análise proposta, que visou determinar se as possíveis modificações na molécula de corante em interação com os microrganismos do I.L.R., resultaram exclusivamente da ação microbiana ou foi influenciada por alterações no pH, o comportamento pH estável foi uma exigência na seleção dos corantes trabalhados.

## **3. - Análise espectrofotométrica dos corantes no UV-Vis.**

### **3.1. Calibração dos corantes.**

A partir de solução-estoque de concentração-padrão de 1mg de corante/mL (para os dois corantes) foram preparadas diversas diluições e feita a calibração do AY25 e do DV51 nos valores de pH 2,50, 4,50 e 6,50.

- A calibração dos corantes foi realizada nos comprimentos de onda máximos:
- $-\lambda=389\text{nm}$  para o AY25 e  $\lambda=550\text{nm}$  para o DV51.
- -Nas Concentrações: 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/ml}$ , pH 2,50, 4,50 e 6,50.
- -Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo.
- -Leitura em Espectrofotômetro HP UV-Vis 8453.

## **4. - Teste de Biossorção e Biodegradação nos diferentes valores de pH-Avaliação no UV-Vis.**

### **4.1. Teste de atividade do novo inóculo produzido a partir do biodigestor em batelada.**

Observações preliminares da atividade do novo inóculo produzido pelo biodigestor em batelada foram realizadas. Entretanto apenas os resultados observados entre o corantes AY25 no pH 2,50 foram demonstrados.

Iniciou-se o experimento em 50µg/mL (concentração do corante) e os ensaios foram observados após diferentes tempos de contato para verificação da remoção visual da cor e do crescimento da biomassa.

#### **4.2. Inoculação das soluções de corante (50µg corante/mL de solução), em diferentes valores de pH.**

##### **4.2.1. Método:**

Para este estudo, a concentração inicial da solução do corante foi de 50µg de corante por mL de solução. Em cada tubo acrescentaram-se 0,250mL de solução-padrão do corante, 0,125mL de inóculo e 4,625mL de água destilada com o pH ajustado.

As amostras dos tratamentos foram coletadas em diferentes tempos de contato (20min., 3h, 6h, 24h, 48h, 96h, 7 e 10dias) a partir do início da inoculação. Após uma centrifugação de 894 x g por 20 minutos, o sobrenadante foi separado para análise. Cerca de 3mL foram necessários para as leituras no UV-Vis. Deste volume 0,5mL foram depositados nos tubos de análise para HPLC. A parte restante da amostra lida no UV-Vis, foi imediatamente colocada para secagem e preparo das pastilhas de KBR para execução das leituras em FTIR. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

#### **4.3. Cálculo das Absorbâncias Relativas.**

##### **4.3.1. Método:**

Após os tempos de contato, as amostras foram centrifugadas e lidas em espectrofotômetro UV-Vis HP 8453. Para se verificar quais as tendências dos corantes a sofrerem um processo de bioadsorção ou biodegradação, durante o período de interação com os microrganismos existentes no I.L.R., o método de avaliação das absorbâncias relativas de Glenn e Gold (1983) foi utilizado. Observaram-se desta forma, a variação das taxas de absorbâncias relativas dos corantes ( $Abs \lambda^{\text{máximo}}/Abs \lambda^{\text{máximo}/2}$ ). Quanto mais constantes os valores encontrados, maior a tendência de o corante ser bioadsorvido, se os valores se alteram, a biodegradação é o processo predominante.

#### **5. -Teste de Bioadsorção e Biodegradação nos diferentes valores de pH. Análises no FTIR.**

## **5.1 Análise dos controles dos corantes e das soluções após o tratamento.**

**5.1.1. Aparelhos:** O funcionamento do Espectrofotômetro Bru pôde ser acessado através do Software OPUS ® da Bruker, janela para discos de KBr. Estufa de Secagem Heraeus automática, Agitador magnético modelo Heizen, Balança Analítica Adventure Pro OHAUS, Refrigerador Liebeherr Profiline 450L, Agitador de Tubo modelo Phoenix AP56, pHmetro Calimetric Knick 766, Centrífuga Sigma 6K15.

**5.1.2. Materiais:** Tubos de vidro com rosca, pipetas, cadinhos, provetas, luvas de borracha, beakers, bastão de vidro, conta-gotas, pissetas e outros materiais de uso comum em laboratório.

**5.1.3. Método:** Confeccionaram-se pastilhas dos controles do AY25 e do DV51 nos diferentes valores de pH e com concentração de 50µg de corante por mL e dos tratamentos dos corantes, nos diferentes valores de pH, após os diferentes tempos de contato com o I.L.R.

No primeiro caso, apenas o corante seco foi raspado do cadinho e misturado ao KBr (149mg). No segundo, a solução deveria antes de ser seca para compor a pastilha, ser centrifugada a 894x g por 20 minutos, para retirada do excesso de biomassa que havia se desenvolvido, evitando a interferência nos resultados do infravermelho. Desta forma, o material remanescente no cadinho foi coletado para análise.

O KBr e o material de análise foram homogeneizados em almofariz e pistilo e prensados por 4 minutos a 20KN. A pastilha obtida foi imediatamente colocada na janela para discos de KBr e lida no intervalo de 4000 a 400cm<sup>-1</sup>, “scan” de 16 varreduras e resolução de 4cm<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos foram avaliados para verificar possíveis mudanças ocorridas na estrutura molecular dos corantes após o tratamento.

## **6. - Teste de Biossorção e Biodegradação nos diferentes valores de pH. Análises no HPLC-UV:**

Objetivando-se a confirmação dos resultados encontrados no FTIR e no UV-Vis, foram realizadas as leituras dos corantes pelo método do HPLC-UV nos diferentes valores do pH, em seu tempo controle e após a interação com o I.L.R.

A metodologia abordada foi baseada na análise do Procion Red HE7B por O'Neill (2000).

## 6.1. Leitura dos controles.

Das análises de UV-Vis e FTIR, extraíram-se alíquotas de 1mL para a leitura em HPLC-UV.

## 6.2. Leitura dos tratamentos.

**6.1.1. Instrumento:** HP 1090 Diode Array HPLC.

**6.1.2. Materiais:** Metanol 100%, água destilada, tampão-fosfato. Tubos de análise para HPLC, pipetas eppendorf 100 $\mu$ L e 50  $\mu$ L ponteiras, pissetas, pipetas, provetas graduadas, balão volumétrico, agitador magnético e outros materiais de uso comum de laboratório.

**6.1.3. Métodos:** As análises foram realizadas utilizando o instrumento HP 1090 Diode Array HPLC, uma bomba de gradiente equipada com coluna cromatográfica equipada com detector UV-Vis. A coluna utilizada é muito difundida na análise de aminas aromáticas (MN-Nucleosil ET 250/8/4 (Macherey-Nagel, Easton, Pa., USA, i.d. 3,0mm, 25cm comprimentos, diâmetro das partículas na fase estacionária 5 $\mu$ m). É especialmente indicada na identificação dos metabólitos gerados durante a degradação de compostos azóicos.

As condições experimentais foram aquelas recomendadas pelo fabricante: metanol (A) e uma solução de tampão-fosfato 5mM pH 7 (B) constituíram a fase móvel. O volume de injeção foi de 50 $\mu$ L. No gradiente A/B (25/75) em 40 minutos (85/15), com um fluxo de 0,6ml/min<sup>-1</sup>, a leitura do eluente foi monitorada entre 210-600nm, 230nm e 254nm, para detecção das aminas; 389nm para o AY25 e 550nm para o DV51.



## RESULTADOS E DISCUSSÕES-PARTE 1.

### 1. - Funcionamento do Biodigestor.

#### 1.1. Tipo de modelo e regime de abastecimento.

O biodigestor modelo fluxo-contínuo, com estrutura tubular em “U”, com 40 cm de diâmetro e **Tempo de Retenção Hidráulica (TRH)** de 30 dias, apresentou capacidade e abastecimento estimada em 46L diariamente. As cargas, constituídas de sobras alimentares, foram colocadas em um triturador e depositadas em um recipiente conectado a uma bomba a vácuo. Desta forma, transferiu-se a pasta de alimentos para dentro do reator.

#### 1.2. Estabilização e padronização do inóculo:

Após o 30º dia de experimento, o Inóculo Líquido Residual (I.L.R) foi retirado para análise (**Figura 6**).



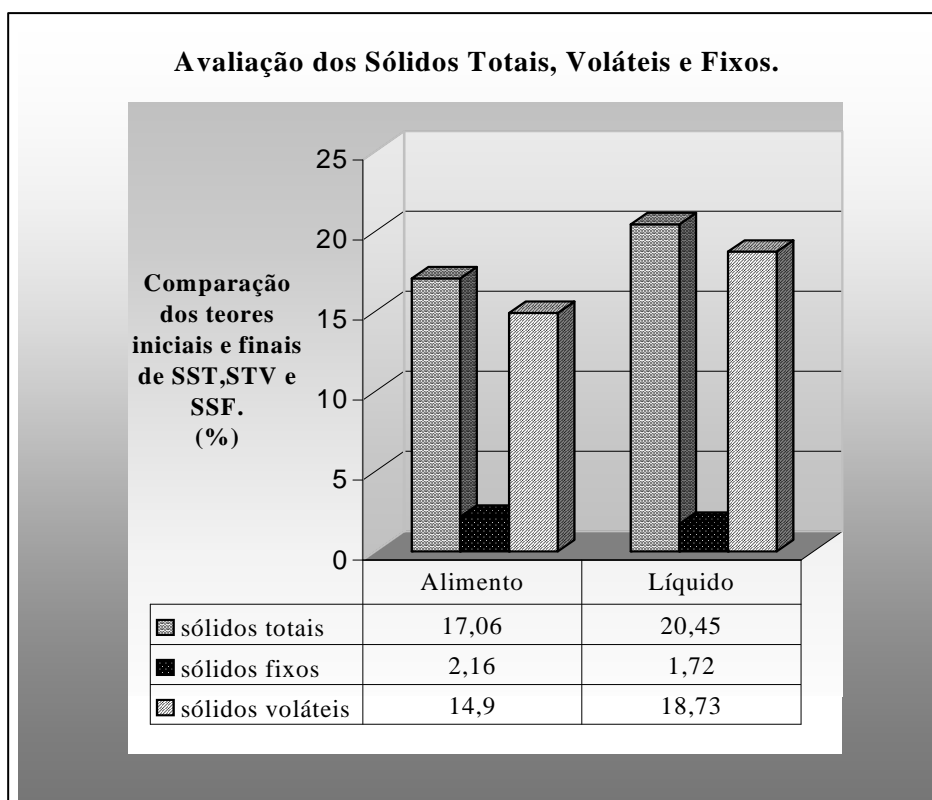
**Figura 6.** Retirada do I.L.R. após o 30º dia da inoculação, observar o aspecto alaranjado do líquido.

### 1.3. Análise Espectrofotométrica do Inóculo no UV-Vis. Resultados apresentados no item 1.6.

### 1.4. Análise Química e Biológica do Inóculo Líquido Residual.

#### 1.4.1. Análises químicas (Sólidos Totais, pH, Condutividade).

A medição dos sólidos totais dos afluentes e efluentes das estações de tratamento de esgoto é um importante parâmetro na determinação da remoção dos mesmos pelo tratamento adotado (CORSO, 1982). Na comparação entre a pasta de alimentos e o I.L.R., observou-se um pequeno aumento dos Sólidos Suspensos Totais e Voláteis (**Figura 7**).



**Figura 7.** Gráfico da avaliação entre a matéria orgânica e mineral inicial da pasta de alimentos em comparação com o I.L.R. SST (Sólidos Totais:matéria orgânica e mineral), STV (Sólidos Voláteis-matéria orgânica), SSF (Sólidos Fixos -minerais).

Os resultados das análises da condutividade e do pH podem ser vistos na Tabela 3:

Houve concentração da biomassa neste resíduo, que apresentou um pH de 3,43, indicando sua acidificação provável, em função da produção de ácidos orgânicos pelas bactérias fermentativas e acidogênicas (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Determinação das medidas de pH e condutividade das amostras de alimento e do I.L.R. Temperatura de 25<sup>0</sup>C, 1 atm.

	Condutividade mS/cm	pH
<b>Alimento</b>	14,1	5,6
<b>Líquido</b>	11,83	3,43

A quantificação dos sólidos fixos (resíduo mineral) apontou para uma redução aproximada de 20,5% das cinzas do alimento em relação ao líquido.

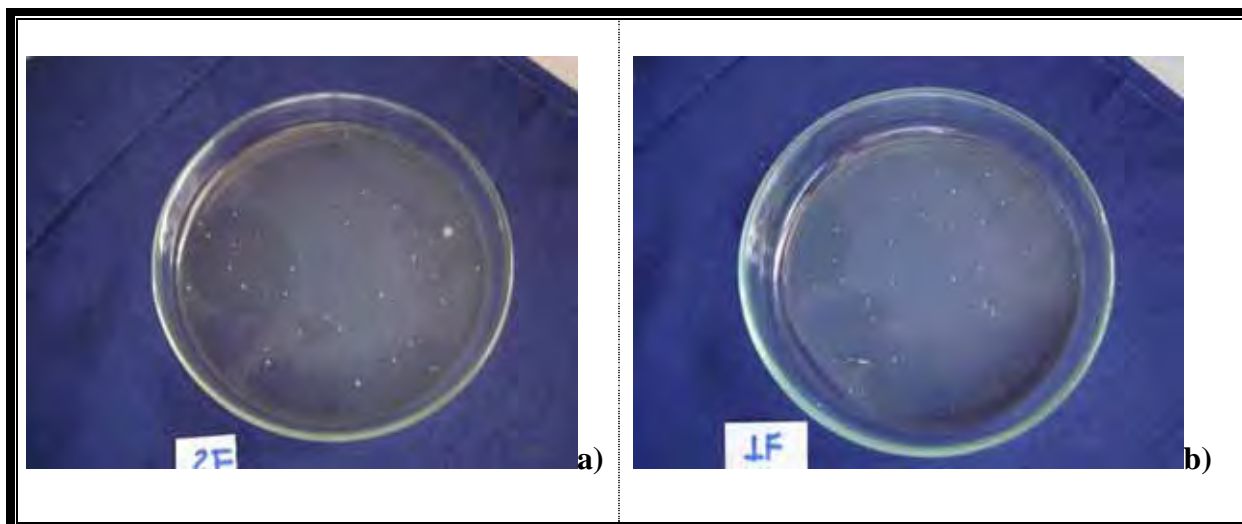
A condutividade das amostras apresentou queda de 14,10mS/cm para 11,83mS/cm (**Tabela 3**), indicando uma provável assimilação de íons pelo metabolismo microbiano, que no caso das bactérias fermentativas, é dependente razoavelmente de sais de sódio (NOVAES, 1986).

**1.4.2. Análises Microbiológicas** (Contagem de Unidades Formadoras de Colônias).

Realizou-se a contagem de UFC/mL em meio PCA (*Plate Count Agar*) para quantificação de bactérias e PDA (*Potato Dextrose Agar*) para quantificação de fungos, através do método de diluições seriadas. Para cada diluição, foram feitas triplicatas.

As melhores diluições para contagem de bactérias foram encontradas no plaqueamento das diluições 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup>. Para o meio PDA, as colônias de fungos e leveduras não apresentaram um número suficiente para contagem.

Um exame da população microbiana revelou a presença de 8,45 x 10<sup>7</sup> UFC/mL de bactérias no I.L.R. ilustrado pelas figuras 8a,b.



**Figura 8a.** Cultivo do efluente em Meio PCA. Contagem de bactérias diluição  $10^{-4}$  do I.L.R. **b.** Cultivo do efluente em Meio PCA. Contagem de bactérias diluição  $10^{-5}$  do I.L.R.

Apenas poucas colônias isoladas de fungos filamentosos e leveduras desenvolveram-se em meio PDA, não atingindo um valor mínimo para contagem, em nenhuma das diluições realizadas. Tal estimativa de contagem foi esperada, pois em um ambiente anaeróbio a ácido haverá predominância abundância de bactérias e leveduras em menor quantidade.

### **Conclusões Parciais.**

Os biodigestores anaeróbios aceleram a degradação de resíduos orgânicos e devem ser estudados para o aprimoramento de técnicas e processos que degradem poluentes produzidos pelas atividades humanas e produzam indiretamente novos insumos para a indústria ou diretamente na forma de combustíveis.

O I.L.R. é rico em flora bacteriana mista que pôde ser utilizado como agente biodegradante para os corantes azóicos. A redução dos SSF (Sólidos Suspensos Fixos) e da condutividade ocorreu, provavelmente, em função da assimilação de nutrientes minerais pelo metabolismo microbiano.

O aumento dos SST (Sólidos Suspensos Totais) e STV (Sólidos Suspensos Voláteis) no efluente do biodigestor revelou um processo de concentração de matéria orgânica, constituída de ácidos orgânicos, aminoácidos e monossacarídeos resultantes do processo de hidrólise e fermentação somadas a alta população de bactérias encontradas no I.R.L. A partir disso, Infere-se que a fase bioquímica predominante na base do sistema tubular do reator, da qual foi retirado o I.L.R., foi a acidogênica.

O biodigestor anaeróbio, modelo fluxo-contínuo, além do I.R.L. produziu também uma pasta sólida denominada N.O.R (nutriente orgânico reciclado), que pode coletada pela extremidade oposta do reator. Sua produção estava diretamente relacionada ao T.R.H.(Tempo de Retenção Hidráulica). Sua constituição fibrosa sugeriu a aplicação para recobrimento de solos agrícolas, como fertilizante e camada protetora. Entretanto um estudo aprofundado desse material seria necessário para delinear quais as aplicações mais indicadas para este insumo produzido pela fermentação anaeróbia do biodigestor.

## RESULTADOS E CONCLUSÕES - PARTE 2

A segunda parte da pesquisa, realizada no **Instituto de Análise Instrumental Analítica e Bioanalítica**, Alemanha, na **Universidade de Ciências Aplicadas de Mannheim**, contemplou a reprodução do Biodigestor em escala laboratorial para que o experimento fosse realizado novamente a partir de um estoque novo de I.L.R. A análise instrumental baseada nos métodos UV-Vis, HPLC-UV e FTIR foi utilizada para a análise de bioissorção e biodegradação e das amostras.

### 1.5. Reprodução do Biodigestor em escala laboratorial.

Seguindo o procedimento descrito no Material e Métodos, foi possível produzir um novo I.L.R. aplicado como agente biodegradador e bioissorvente para os corantes estudados Figura 9.



**Figura 9.** Biodigestor anaeróbico de alimentos do tipo “batelada” Extração do novo inóculo produzido.

Conservou-se o I.L.R contendo os microrganismos sob refrigeração em câmara fria a aproximadamente 10 ° C Figura 10, até o momento de ser utilizados como I.L.R. para iniciar a biossorção e biodegradação dos corantes.



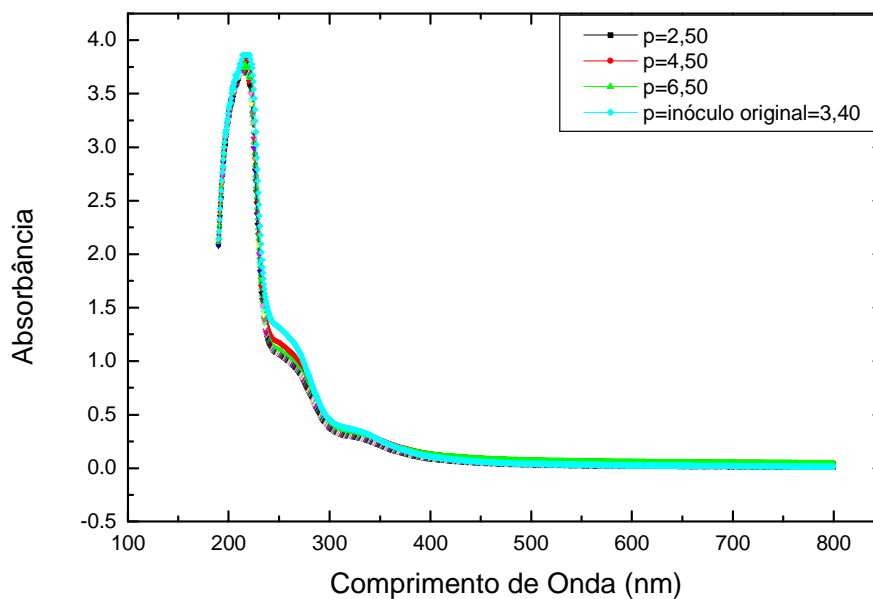
**Figura 10.** Novo I.L.R, produzido a partir do Biodigestor Anaeróbio em batelada.

### **1.6. Análises espectrofotométricas do inóculo no UV-Vis.**

Resultado referente também ao item 1.3 do Material e Métodos parte 1.

A análise espectrofotométrica do I.L.R. no UV-VIS mostrou que a banda principal próxima a 220  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 11) não se altera. A identificação de compostos ou grupos individualmente é dificultada pela extensiva sobreposição de bandas que ocorre no UV-Vis, entanto, segundo Silverstein et al. (1979), entre 200 e 300 nm grupos cromóforos como a carbonila, amido, acetilênicos podem ser encontrados.

A análise dos tratamentos na região do visível pôde ser realizada sem a preocupação da interferência das bandas do I.L.R. sobre as bandas do corante.



**Figura 11.** Espectros do inóculo em diferentes valores de pH: 2,50; 4,50; 6,50 e 3,40 (pH original). Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leituras em espectrofotômetro UV-Vis HP 8456.

## 2. - Critérios para escolha dos corantes:

Foram escolhidos dois corantes têxteis azóicos existentes no mercado e que apresentavam formulação química conhecida e além de comportamento pH estável, DV51 e AY25.

## 3. - Análise Espectrofotométrica dos corantes no UV-Vis.

A calibração dos corantes foi realizada nos comprimentos de onda máximo  $\lambda=389\text{nm}$  para o AY25 e  $\lambda=550\text{nm}$  para o DV51. As concentrações utilizadas foram: 10, 20, 30, 40 e  $50\mu\text{g/ml}$ , **pH 2,50, 4,50 e 6,50.**

A curva-padrão dos corantes foi exposta na legenda das figuras dos tratamentos, no item 4.2 .



#### 4. - Teste de Biossorção e Biodegradação nos diferentes valores de pH-Avaliação no UV-Vis.

##### 4.1. Teste de atividade do novo inóculo produzido a partir do biodigestor em batelada.

Observações preliminares da atividade do novo I.L.R. produzido pelo biodigestor em batelada foram realizadas. Entretanto apenas os resultados observados do corante AY25 no pH 2,50 foram demonstrados.

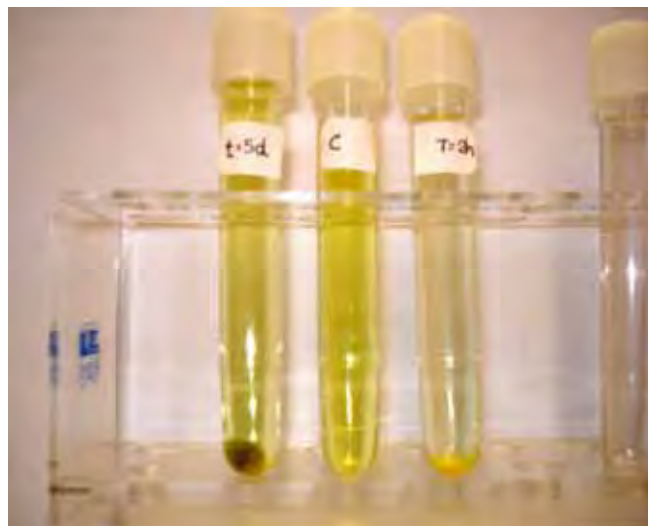
Iniciou-se o experimento em 50µg/mL (concentração do corante) e as amostras foram observadas após diferentes tempos de contato para verificação da remoção visual da cor e do crescimento da biomassa.

O teste de atividade do I.L.R. novo foi importante para comprovar a presença de uma população microbiana ativa sobre os corantes. Desta forma, foi possível inferir que o processo de fermentação das sobras no biodigestor em batelada alcançou o sucesso esperado.

A pergunta pertinente: *Como afirmar que a atividade do inóculo estaria similar àquela observada no produzido pelo primeiro biodigestor?* Foi respondida pelos resultados encontrados, explicados a seguir.

As características do novo I.L.R. (**figura 10**) como o aspecto alaranjado do líquido, seu odor acético e pH (3,40) demonstraram que estas foram exatamente as mesmas observadas no primeiro I.L.R. Os espectros apresentados na Figura 11, também não apresentaram diferenças em relação aos do primeiro inóculo.

Os testes preliminares mostraram não apenas a biossorção rápida do corante pela biomassa, mas após 5dias, a degradação do corante, a produção de metabólitos que coloriram o meio e o crescimento de colônias de bactérias aderidas sobre a superfície dos tubos de cultura nas soluções tratada, além de colônias de fungos filamentosos no fundo dos tubos (**Figura 12**).



**Figura 12** - Ação do I.L.R novo sobre o corante AY25 no pH 2,50. Da esquerda para a direita: 5dias, controle e 2horas.

#### **4.2. Inoculação das soluções de corante (50µg corante/mL de solução), em diferentes valores de pH.**

Amostras dos tratamentos foram coletadas nos diferentes tempos de contato (20min., 3h, 6h, 24h, 48h, 96h, 7 e 10dias) a partir do início da inoculação.

Através das leituras das absorvâncias de cada solução sobrenadante, estimou-se a porcentagem de remoção do corante pela biomassa para as primeiras 3horas de contato, nas quais predominou a ação biossortiva da biomassa.

A partir desta observação primária, estabeleceu-se uma relação matemática entre a descoloração e biossorção\* descrita por Cripps et al. (1990), muito utilizada em estudos de descoloração de corantes azóicos recentemente, Manjinder et al., (2005), Kalme et al., (2006), Parshetti (2006), através da qual foi possível calcular a porcentagem de remoção da descoloração das amostras após os tratamentos.

$$\text{A relação: Descoloração/Adsorção} = \frac{(\text{Absorbância Inicial}-\text{Absorbância Final}) \times 100}{\text{Absorbância Inicial}}$$

**Tabela 4.** Porcentagem de remoção dos corantes AY25 e DV51 após as primeiras horas de contato.

	<b>Acid Yellow 25</b>	<b>Direct Violet 51</b>
<b>pH 2,50</b>	75,65%	88,66%
<b>pH 4,50</b>	77,57%	80,97%
<b>pH 6,50</b>	71,96%	80,43%

De acordo com os dados dispostos na tabela 4, o AY25 teve o melhor resultado no pH 4,50 com 77,57% de remoção da cor após 3 horas de contato, o DV51 no mesmo pH, apresentou 88,66% de descoloração. Esse resultado mostra que a interação bioesortiva, predominante sobre a ação enzimática nas primeiras horas de contato, para o DV51 foi maior do que aquela existente entre o AY25 e o consórcio microbiano.

Normalmente, o equilíbrio entre a biomassa e o corante ocorre nas primeiras horas de contato (FU, VIRARAGHAVAN, 2001) e, posteriormente, o corante ligado às células é gradualmente degradado dentro de um período entre uma semana e dez dias, dependendo do tipo de microorganismo e de molécula de corante (MOU et al, 1991).

Um dos aspectos que poderiam explicar a remoção relativamente superior alcançada nos valores de pH mais ácidos, poderia ser explicada através das relações eletrostáticas entre a biomassa e os corantes. Na medida em que se diminui o pH, grupos básicos fracos presentes na superfície celular microbiana são protonados adquirindo carga positiva. Estes sítios são disponibilizados para a interação com os ânions presentes nas moléculas dos corantes (O'MAHONY, et al. 2002), no caso do AY25 e do DV52 principalmente os sulfônicos.

### 4.3. Cálculo das Absorbâncias Relativas.

Objetivando-se encontrar relações que estabelecessem a predominância de bioissorção ou biodegradação do corante com a variação na absorbância do sobrenadante, utilizou-se um método desenvolvido por Glenn e Gold (1983).

Fixam-se dois comprimentos de onda importantes da curva, o máximo e aquele em que a absorbância máxima tem seu valor reduzido à metade.

Através da divisão dos valores das absorbâncias encontradas para esses dois comprimentos de onda fixos, avaliadas entre os controles e os tratamentos, observa-se a variação das taxas encontradas.

A variação das taxas de absorbâncias relativas dos corantes ( $Abs \lambda^{\text{máximo}}/Abs \lambda^{\text{máximo}/2}$ ) revela quanto há predominância da ocorrência de bioissorção ou de biodegradação.

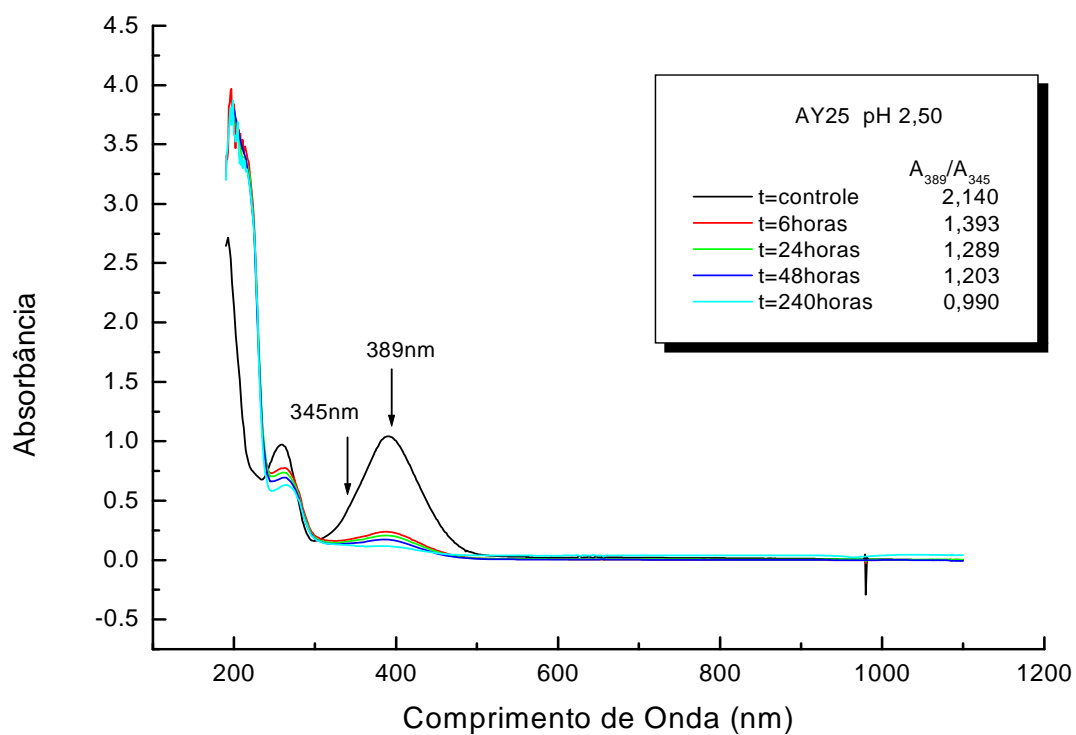
Quanto mais constante é a “**Absorbância Relativa**” encontrada, maior a tendência de o corante ser bioissorvido, se os valores se alteram, a biodegradação é o processo predominante.

Nas **figuras 13, 14 e 15** encontram-se quadros laterais com os valores das absorbâncias relativas para os corantes ao longo dos tempos de tratamento. Observa-se a alteração dos valores que oscilam entre **2,179 e 0,990**.

Esse dado revela que os grupos cromóforos do corante apresentaram absorções diferenciadas da energia radiante durante o tratamento, o que poderia significar que o corante AY25 sofreu degradação.

AY25 pH 2,50

ABSORBÂNCIAS RELATIVAS

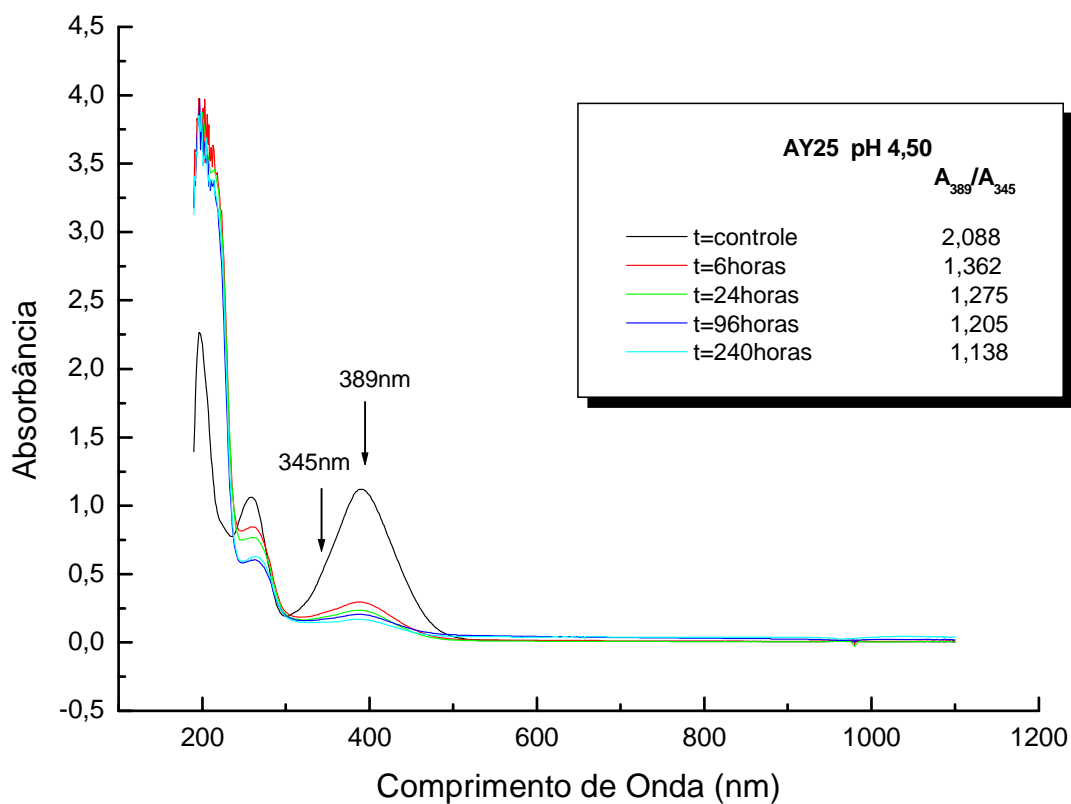


**Figura 13.** Espectros de Absorção do corante AY25 após interação com I.L.R. no pH: 2,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em. Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453.

Absorbância<sup>389</sup> = 0,14893 + 0,01352 x Concentração do Corante. r = 0,996. Na legenda, cálculo das Absorbâncias relativas dos tratamentos ( $A^{389nm}/A^{345nm}$ ).

AY25 pH 4,50

ABSORBÂNCIAS RELATIVAS

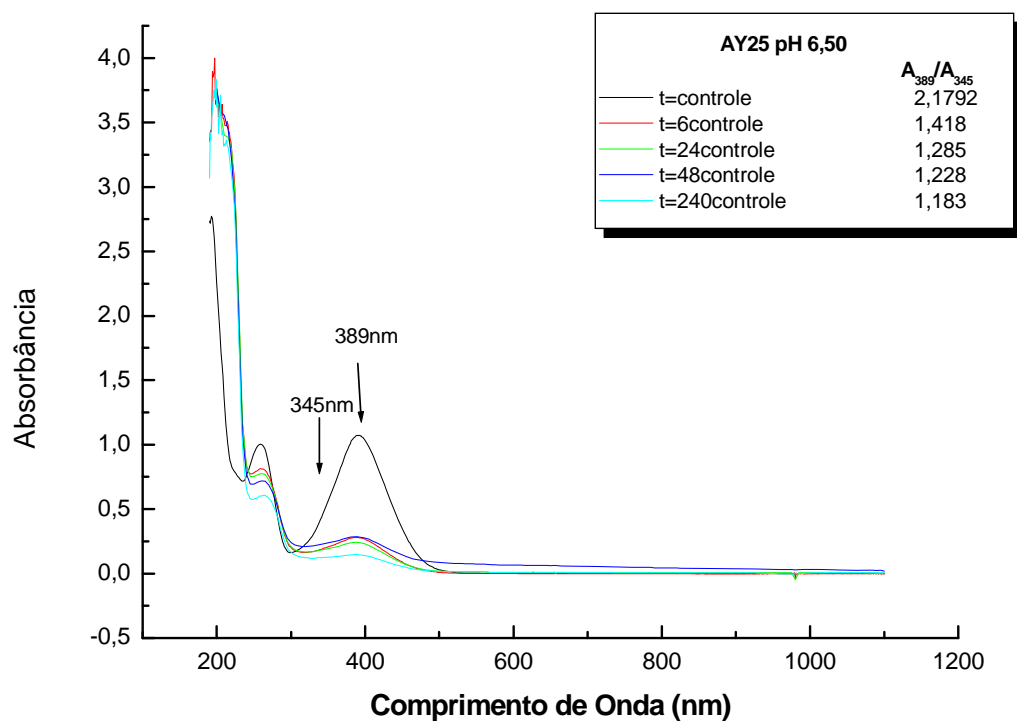


**Figura 14.** Espectro de Absorção do corante AY25 após interação com LLR. no pH: 4,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartz. Leitura em. Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453.

Absorbância<sup>389</sup> = -0,0259 + 0,02214 x Concentração do Corante. r =0,999. Na legenda, cálculo das Absorbâncias Relativas dos tratamentos ( $A^{389\text{nm}}/A^{345\text{nm}}$ ).

AY25 pH 6,50

ABSORBÂNCIAS RELATIVAS



**Figura 15.** Espectro de Absorção do corante AY25 após interação com I.L.R. no pH: 6,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em. Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453.

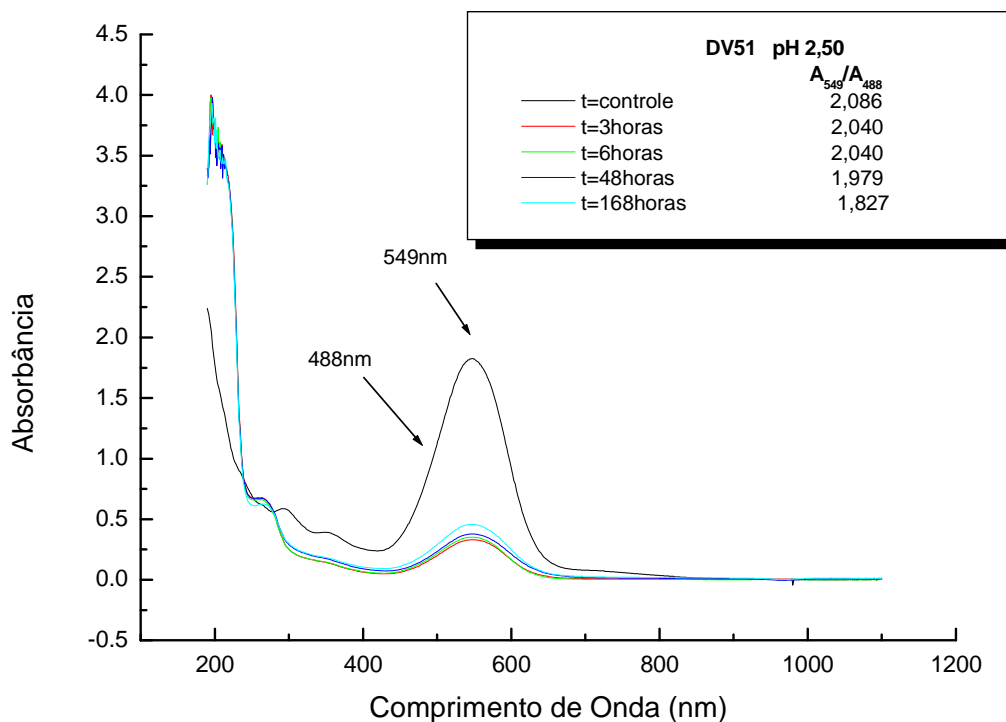
Absorbância<sup>389</sup> = 0,0531 + 0,02144 x Concentração do Corante. r = 0,999. Na legenda, cálculo das Absorbâncias Relativas dos tratamentos ( $A^{389\text{nm}}/A^{345\text{nm}}$ )

Ao observarmos as **absorbâncias relativas** do DV51 nos diferentes valores de pH, os valores oscilam entre 2,086 e 1,827. A variação foi comparativamente menor do que aquela observada para o corante AY25 (**Figuras 16, 17 e 18**).

Apesar do DV51 ser biodegradado, ele se mostrou mais resistente às enzimas do consórcio de microrganismos encontrado no I.L.R., pois a variação de suas absorbâncias relativas foi menor do que àquelas encontradas para o AY25.

### DV51 pH 2,50

### ABSORBÂNCIAS RELATIVAS



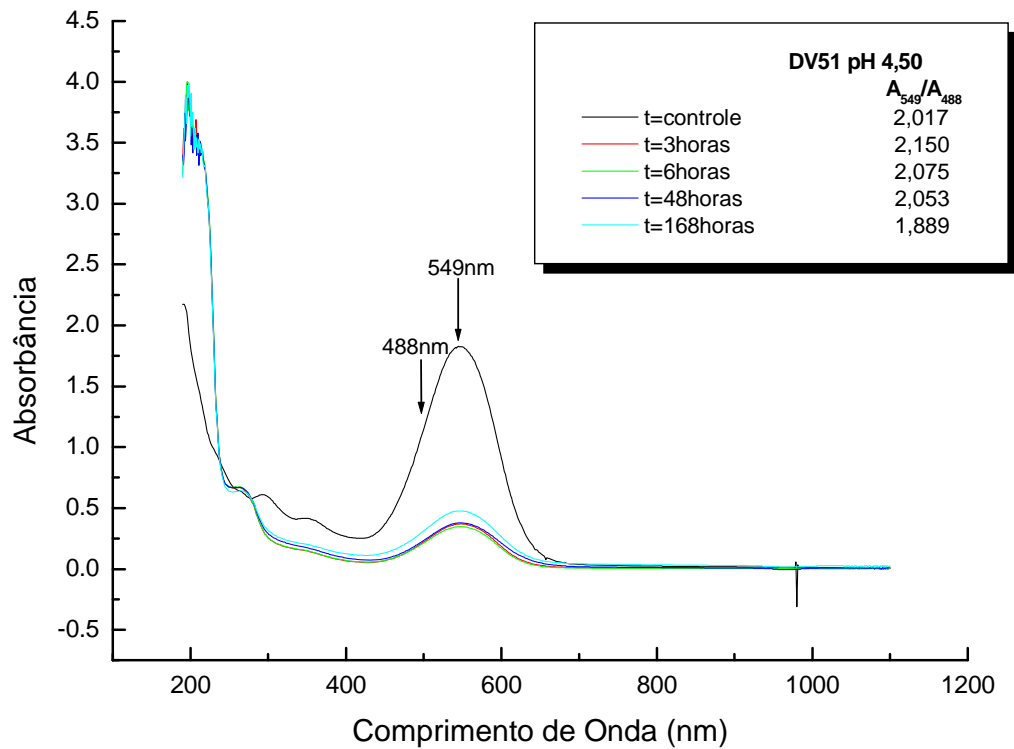
**Figura 16.** Espectro de Absorção do corante DV51 após interação com I.L.R. no pH: 2,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em. Espectrofotômetro UV UV-Vis HP 8453.

Absorbância<sup>549</sup> = 0,026 + 0,0354 x Concentração do Corante. r =0,999. Na legenda, cálculo das Absorbâncias Relativas dos tratamentos ( $A^{549nm}/A^{488nm}$ ).



pH 4,50

## ABSORBÂNCIAS RELATIVAS

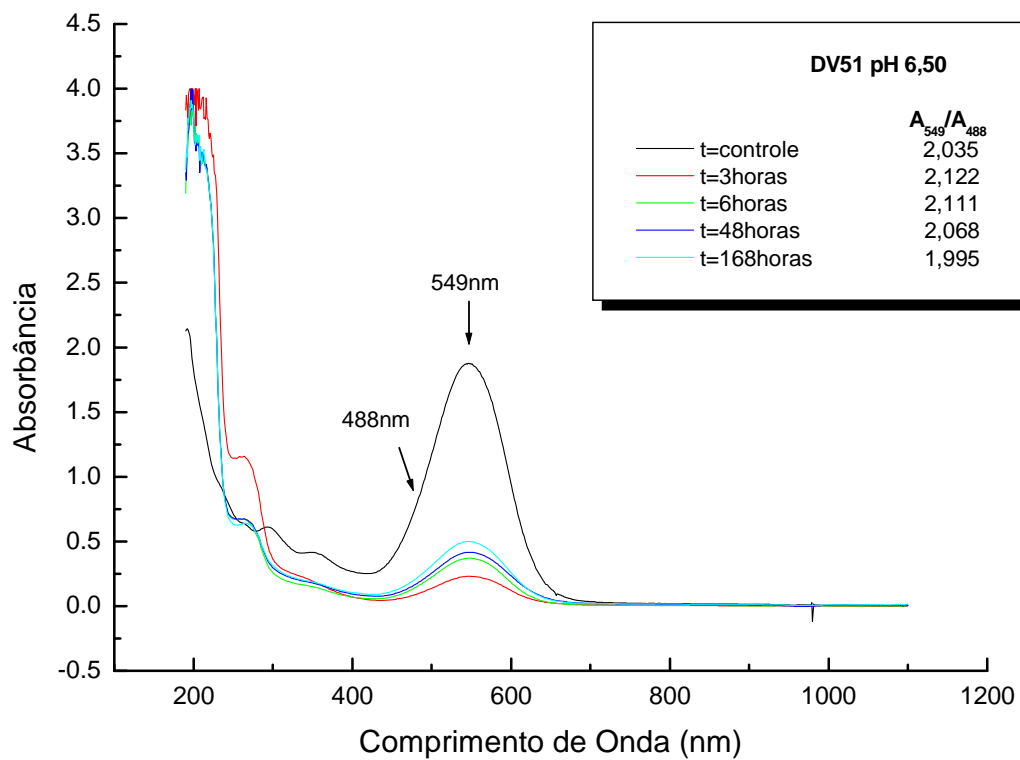


**Figura 17.** Espectro de Absorção do corante DV51 após interação com I.L.R. no pH: 4,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em. Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453.

Absorbância<sup>549</sup> = -0,00786+ 0,03805 x Concentração do Corante. r =0,999. Na legenda, cálculo das Absorbâncias Relativas dos tratamentos ( $A_{549nm}/A_{488nm}$ ).

DV51 pH 6,50

ABSORBÂNCIAS RELATIVAS



**Figura 18.** Espectro de Absorção do corante DV51 após interação com I.L.R. no pH: 6,50. Caminho Óptico: 1,0cm. Cubeta de Quartzo. Leitura em. Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453.

Absorbância =  $0,00857 + 0,03361 \times$  Concentração do Corante.  $r = 0,999$ . Na legenda, cálculo das Absorbâncias Relativas dos tratamentos ( $A^{549\text{nm}}/A^{488\text{nm}}$ ).

### **Conclusões Parciais:**

Os resultados no UV-Vis revelaram que para os dois corantes existiu uma redução similar das absorbâncias nos intervalos de pH estudados.

Entretanto, a variação das absorbâncias relativas (descrita por Glenn e Gold, 1983) foi menor para o corante DV51, um indício da remoção homogênea do corante da solução.

Quebras das ligações cromóforas poderiam ocasionar a variação das absorbâncias de maneira não proporcional, quando consideradas a mesma curva, ou seja, para o mesmo tempo de contato. Portanto, o DV51 demonstrou maior resistência à biodegradação.

A avaliação das absorbâncias relativas do corante AY25 revelou uma variação que pôde ser atribuída à acentuada degradação do corante com quebra das ligações cromóforas presentes.

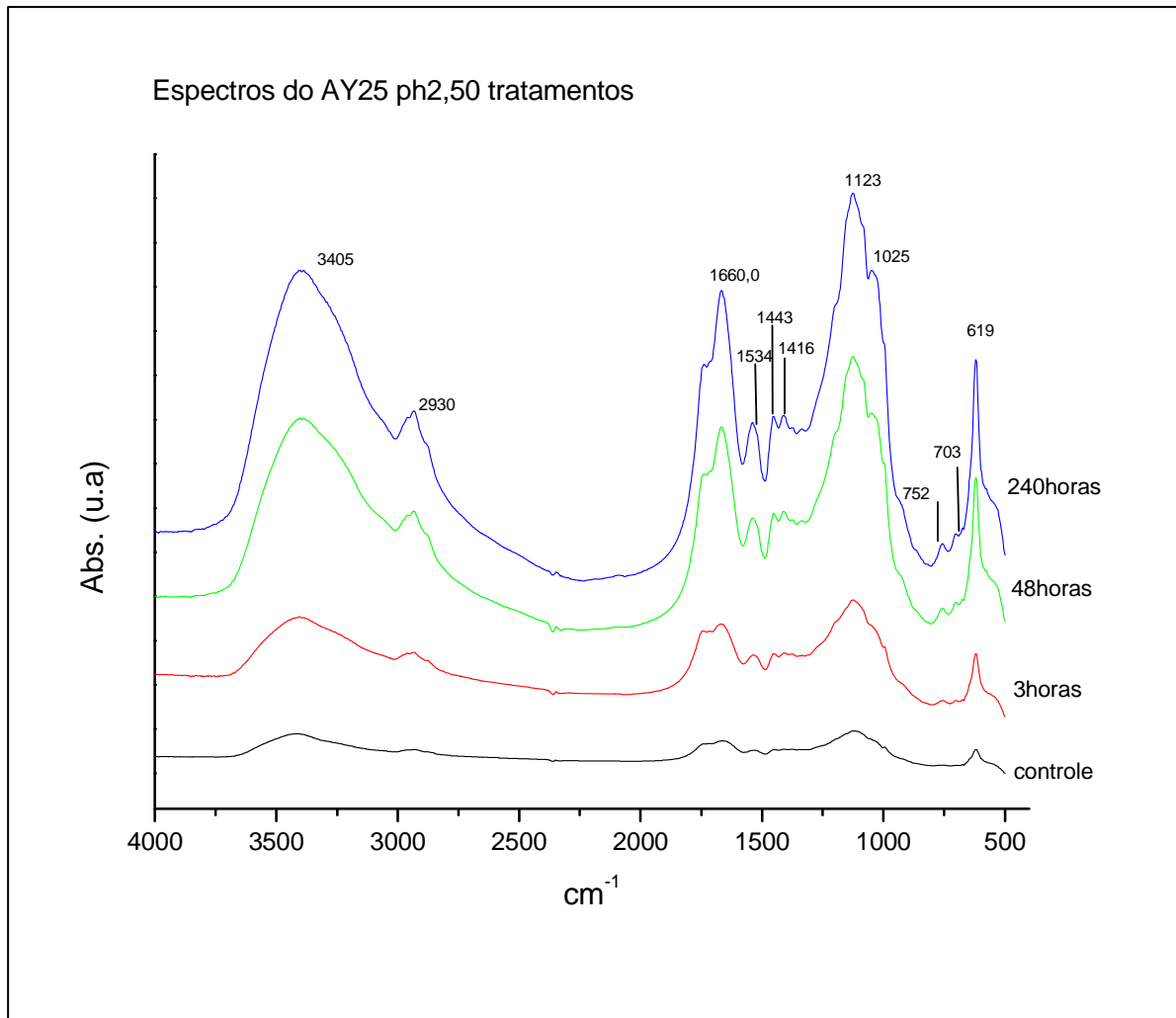
Nas primeiras horas de contato, a relação de redução da porcentagem de descoloração por biossorção, descrita por Cripps (1990) revelou que o DV51 interagiu mais com a biomassa do que o AY25, para todos os valores de pH estudados.

A porcentagem superior de descoloração, nos valores mais ácidos de pH foi explicada pela presença dos grupos sulfônicos dos corantes, em interação com grupos protonados da biomassa.

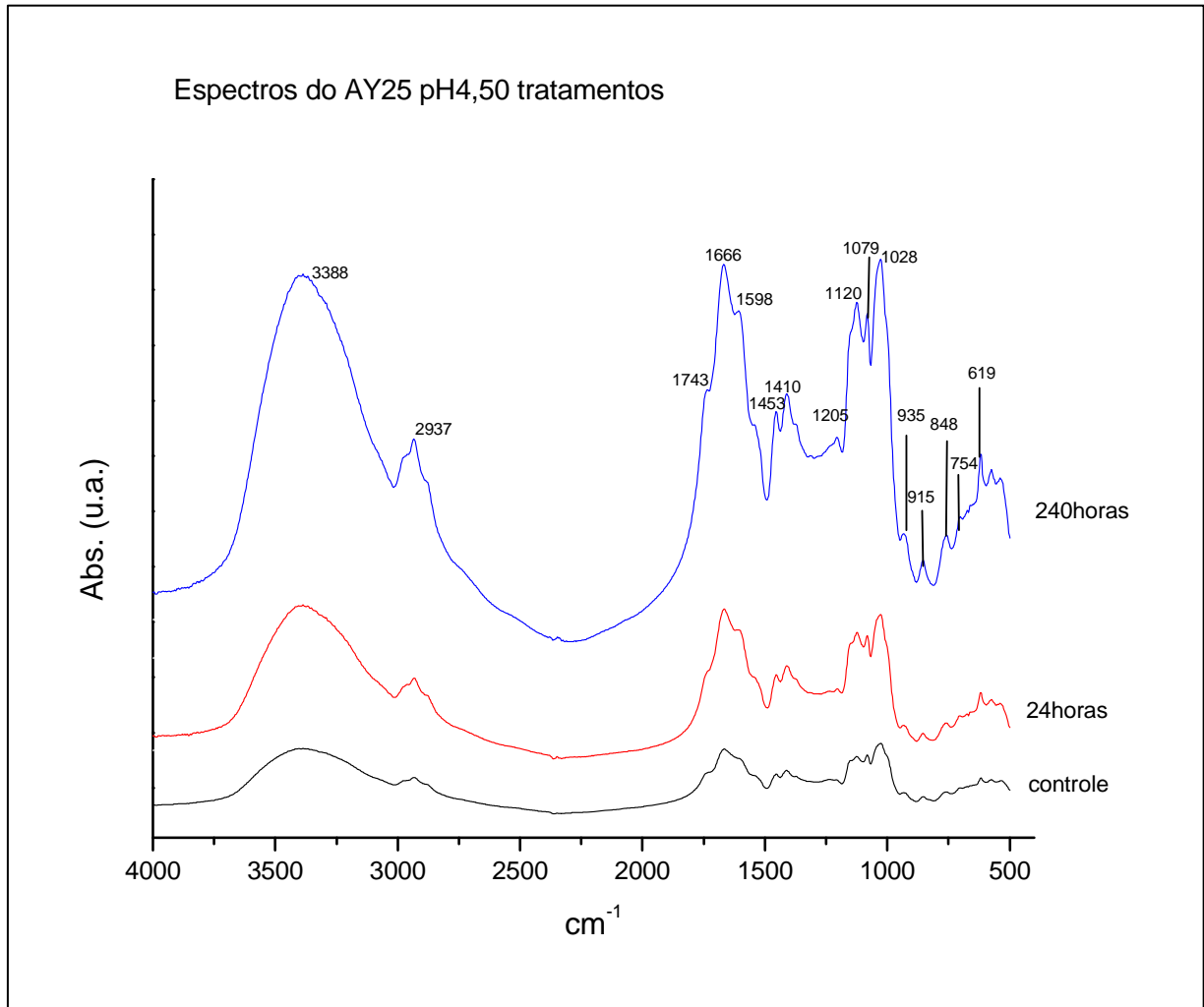
## 5. - Análises no FTIR:

Nas **figuras 19, 20 e 21** é possível observar as modificações encontradas na curva inicial do corante AY25 depois dos tratamentos com o I.L.R .

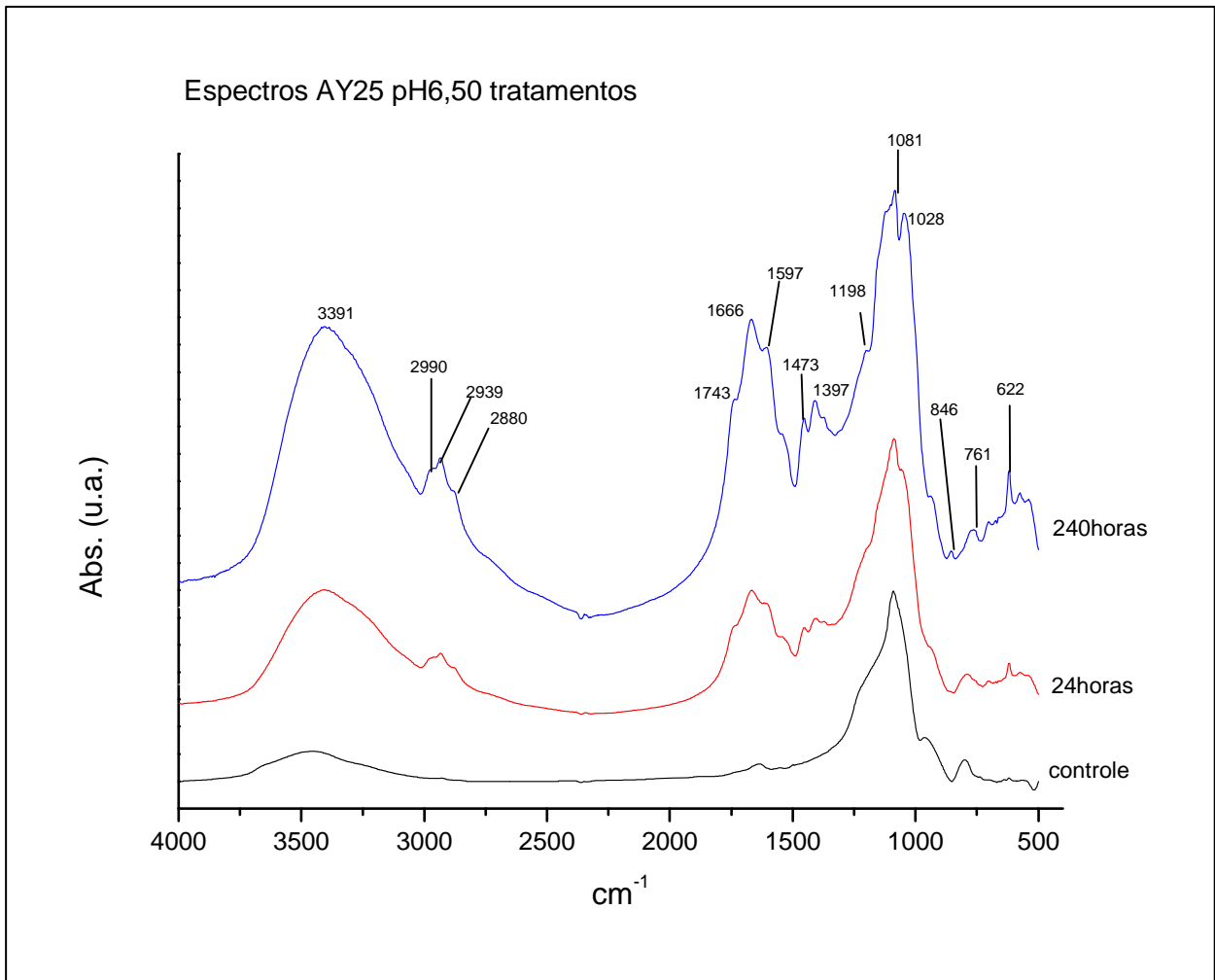
### O FTIR e a análise do corante “Acid Yellow 25”.



**Figura 19.** Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  do corante “Acid Yellow 25” no pH 2,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.

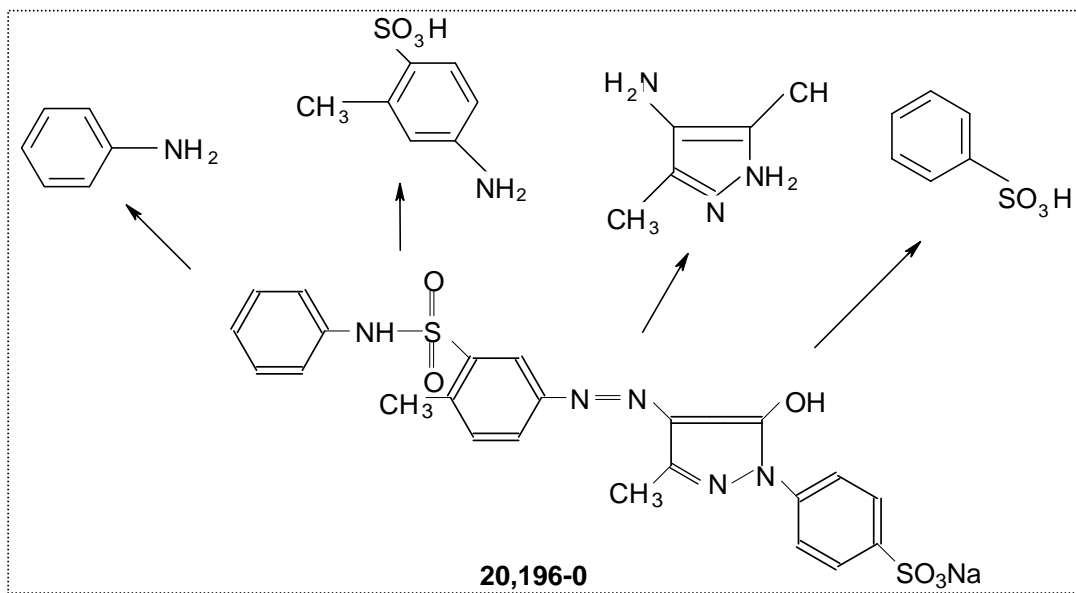


**Figura 20.** Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  do corante “Acid Yellow 25” no pH 4,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.



**Figura 21.** Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  do corante “Acid Yellow 25” no pH 6,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.

Segundo as marcações de bandas entre os controles e os tratamentos do AY25, um esquema relacionando a fórmula original do corante e seus possíveis subprodutos foi elaborado (**Figura 22**). Tais inferências foram realizadas através da literatura mais reconhecida na área que incluiu: Dyer (1969), Ewing (1972), Allinger et al. (1976), Silverstein et al., (1979) além de destacada literatura atual na área: Manjinder et al. (2005), Parshetti et al. (2006), Kalme et al. (2006), Jadhav et al. (2007).



**Figura 22.** Esquema das possíveis vias de degradação do corante AY25. Subprodutos da esquerda para a direita: benzeno sulfonado, amina aromática sulfonada, imidazol. Benzeno-sulfonado.

Aliada às técnicas de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho, além da igualmente tradicional Espectrofotometria do UV-Vis, a Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier tem obtido importante destaque como método de análise para processos de biodegradação de corantes têxteis.

Trabalhos como o de Kalme et al. (2006), Parshetti et al. (2007) e et al. (2006), estudando a biotransformação dos corantes: Direct Blue-5 por *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112, Reactive blue-25 por *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 e Methyl Red por *Saccharomyces cerevisiae*, apontam para a tendência de aliar o FTIR com técnicas mais difundidas na determinação dos produtos formados durante a degradação de compostos azóicos, revelando as potencialidades deste método na identificação dos compostos gerados pela ação microbiana.

Quando se compararam os espectros de FTIR dos controles e dos tratamentos, modificações nas bandas indicando a provável quebra dos corantes AY25 e DV51 em metabólitos provocado pelo I.L.R. podem ser observadas. Entretanto, tais mudanças no padrão de bandas foram mais evidentes nos tempos de tratamento maiores, portanto foram estes os valores utilizados para a execução da análise.

Soma-se a esta escolha o fato de que nas primeiras horas de contato o processo predominante ter sido a remoção dos corantes por biossorção, como demonstrado pela espectrofotometria do UV-Vis.

Na tentativa de determinar quais foram esses metabólitos, algumas dessas modificações mais pronunciadas foram marcadas e suas bandas apresentadas.

**Bandas originais do AY pH 2,50 :**

- 3411, 1340  $\text{cm}^{-1}$ : vibração da amina aromática.
- 1664  $\text{cm}^{-1}$ : vibração angular simétrica no plano do N-H.
- 1376  $\text{cm}^{-1}$ : assimétrica axial do  $\text{SO}_2$ .
- 2943 e 620  $\text{cm}^{-1}$ : deformação do metila aromático, vibração angular fora do plano entre o C-H do anel aromático, bandas agudas e pronunciadas.
- 1406 e 1547  $\text{cm}^{-1}$ : ligação azóica. Bandas fracas.
- 1729  $\text{cm}^{-1}$ : anéis de amidas cíclicas.
- 755 e 620  $\text{cm}^{-1}$ : C-H do anel aromático, deformação angular fora do plano.

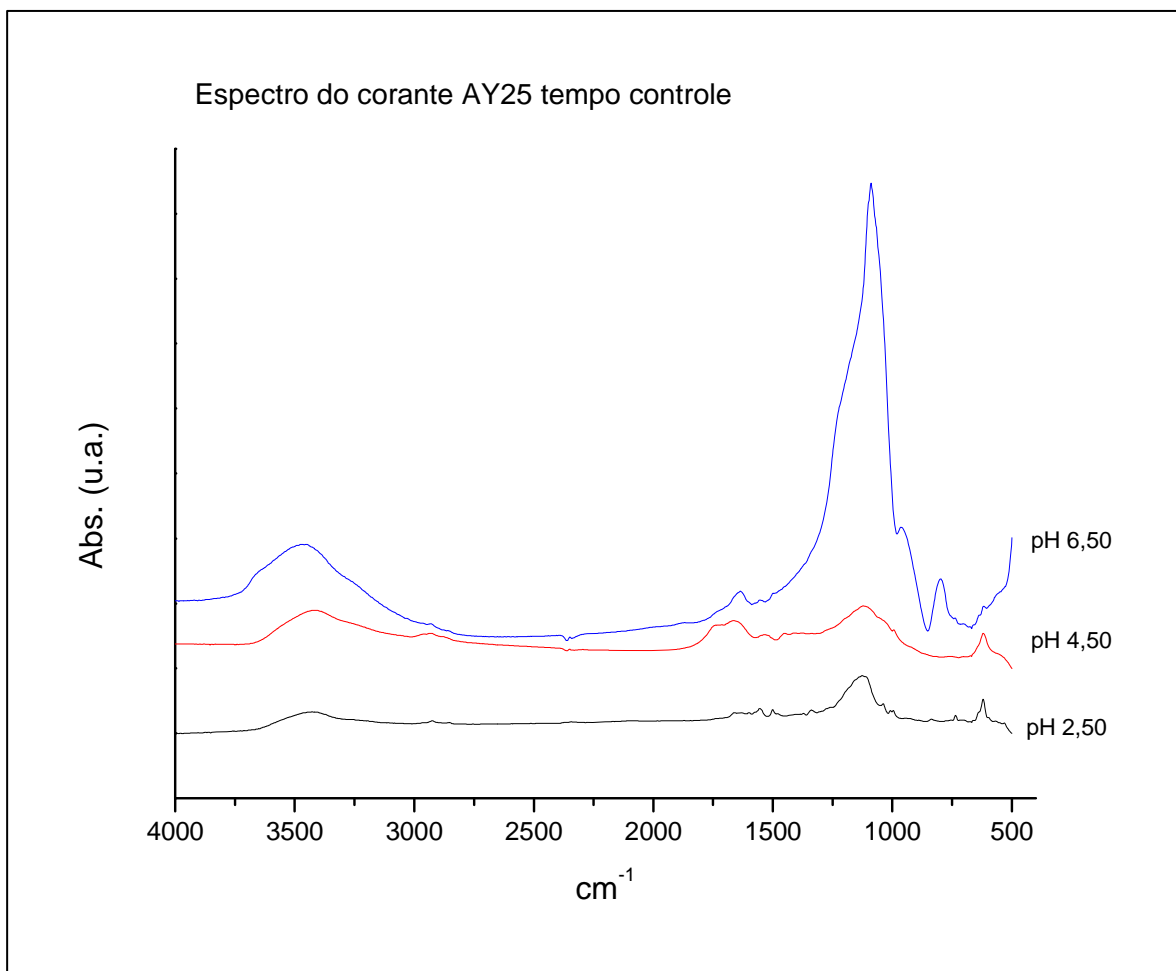
**-Bandas dos tratamentos do AY pH 2,50:**

- 3405 e 2930, 1660, 1534  $\text{cm}^{-1}$ : aminas primárias aromáticas livres, deformação angular simétrica no plano do N-H, amina aromática secundária.
- 1443 e 1416  $\text{cm}^{-1}$ : deformação angular do grupo metila ligados possivelmente ao anel aromático ou imidazólico.
- 1534 e 1660  $\text{cm}^{-1}$ : anel imidazólico.
- 1123, 1660, 1534  $\text{cm}^{-1}$ : coincidentes com grupos benzeno sulfonados.
- 752, 703, 619  $\text{cm}^{-1}$ : aumento da aromaticidade, ou seja, grupos benzênicos livres.

No Apêndice 1 encontram-se todas as modificações entre as bandas dos controles e dos tratamento dos corante. Para a discussão do trabalho, apenas as mais relevantes foram utilizadas.

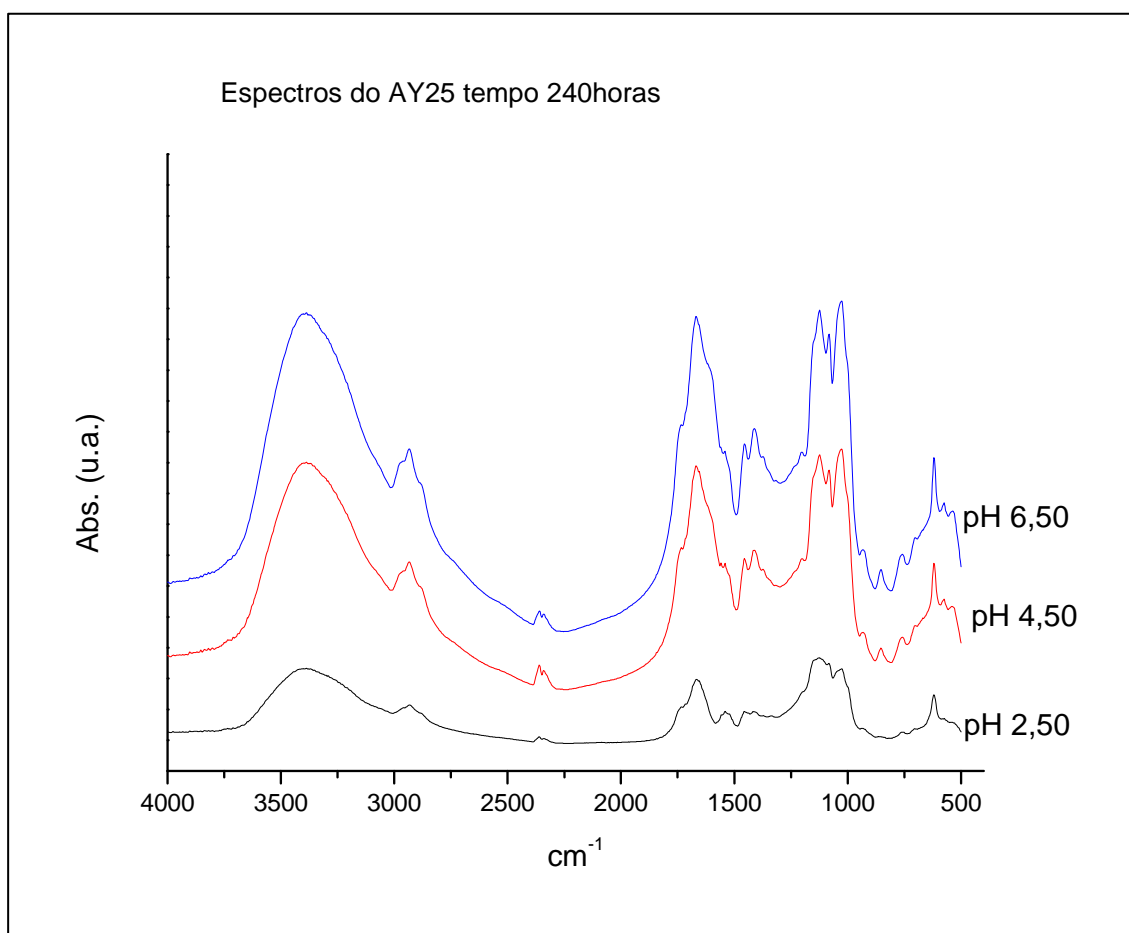


Observando a **Figura 23** nota-se que com a mudança de pH houve deslocamento sutil, “shifts”, nos comprimentos de onda dos controles e também mudanças na intensidade de algumas bandas. O protonamento de grupos disponíveis no AY25 teria causado mudanças na distribuição das cargas eletrostáticas das duas moléculas, o que poderia explicar as diferenças encontradas entre as curvas do FTIR observadas para o controle do corante.



**Figura 23.** Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> dos controles do corante “Acid Yellow 25” nos diferentes valores de pH. Preparados na forma de pastilhas, preparadas na proporção de 1mg do sobrenadante seco para 149 mg de KBr. Leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.

Uma comparação clara do resultado dos tratamentos nos três valores de pH trabalhados foi exposta na **Figuras 24**. As bandas foram muito semelhantes e as diferenças mais importantes foram atribuídas à disponibilidade do íon  $H^+$  no meio, o que certamente influenciou o metabolismo do corante pelo consórcio microbiano e a ação das enzimas disponíveis no meio de cultura.

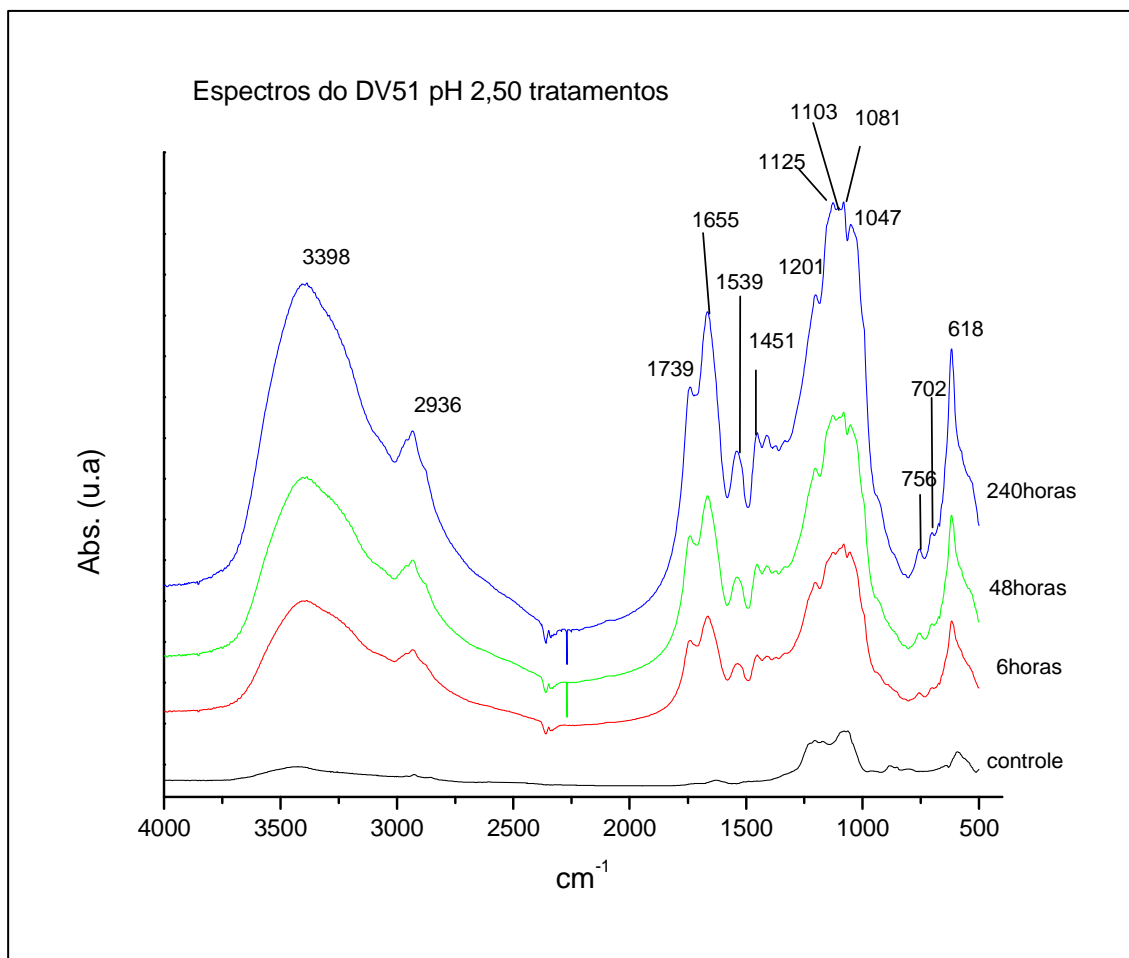


**Figura 24.** Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400cm<sup>-1</sup> dos tratamentos do corante “Acid Yellow 25”, após 240horas, nos diferentes valores de pH. Preparados na forma de pastilhas, preparadas na proporção de 1mg do sobrenadante seco para 149 mg de KBr. Leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.

Isso significaria que alterações do pH refletiriam em gráficos diferenciados no FTIR. A avaliação do UV-Vis mostrou que os grupos cromóforos dos dois corantes continuaram a absorver nos mesmos comprimentos de onda, o que representou a ausência de mudanças estruturais nas moléculas. Entretanto, a sensibilidade do FTIR identificou mudanças na polaridade das duas moléculas, quando alterado o pH.

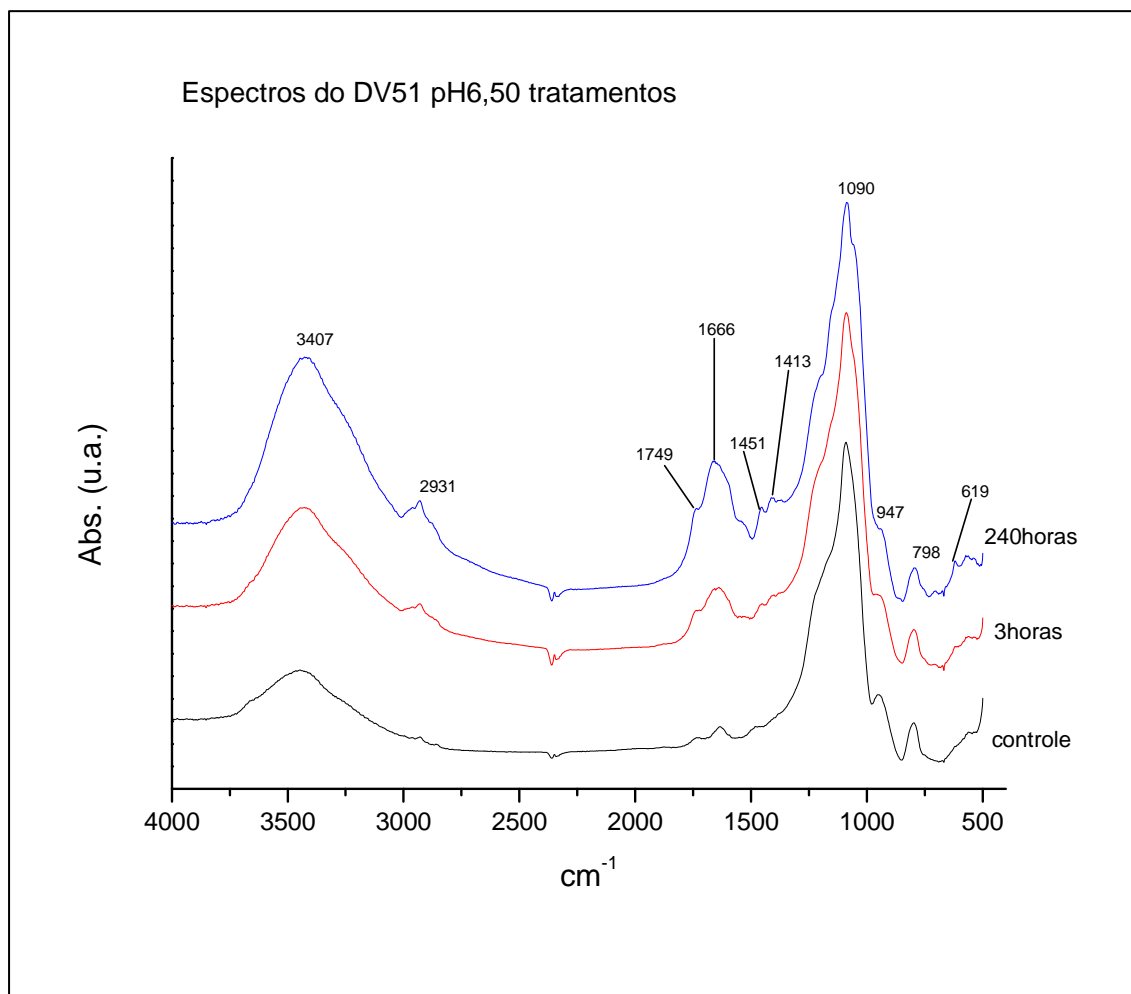
## O FTIR e a análise do corante “Direct Violet 51”.

Nas **Figuras 25, 26 e 27** é possível observar as modificações encontradas na curva inicial do corante DV51 depois dos tratamentos com o I.L.R. Alterações nas freqüências apresentadas pelos tratamentos do DV51 entre os valores 2,50, 4,50 e 6,50 de pH, podem ser observadas.

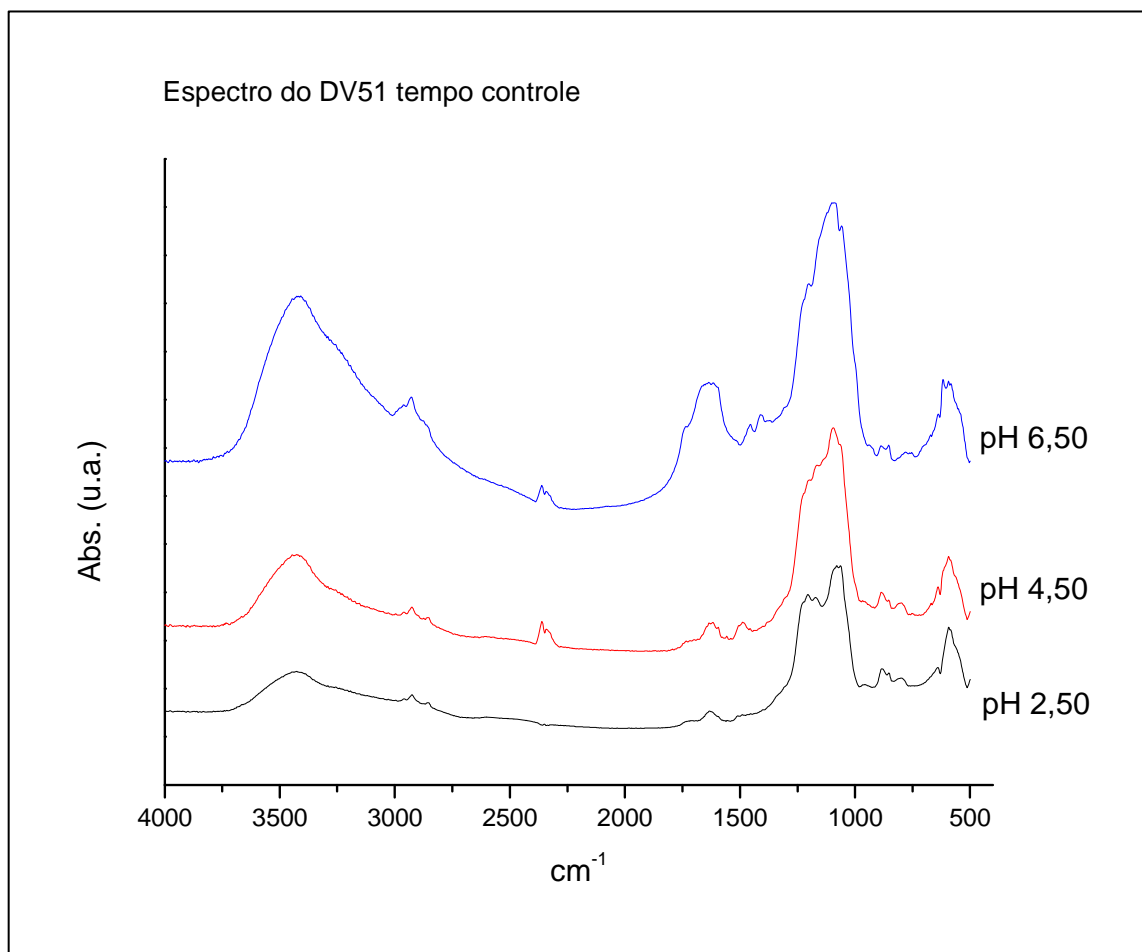


**Figura 25.** Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  do corante “Direct Violet 51” no pH 2,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.

**Figuras 26 e 27** (para os valores comparativos **vide** Apêndice 1).

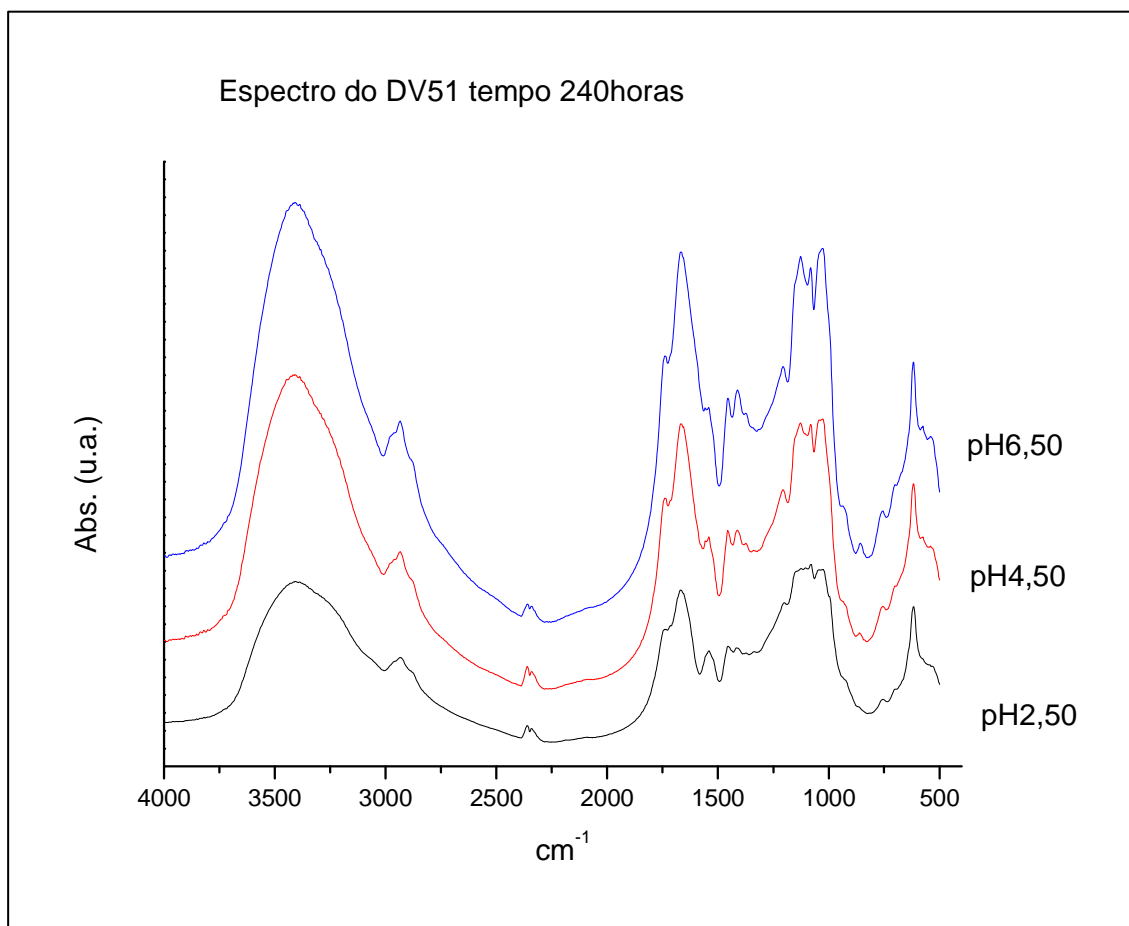


**Figura 26.** Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  do corante “Direct Violet 51” no pH 4,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.



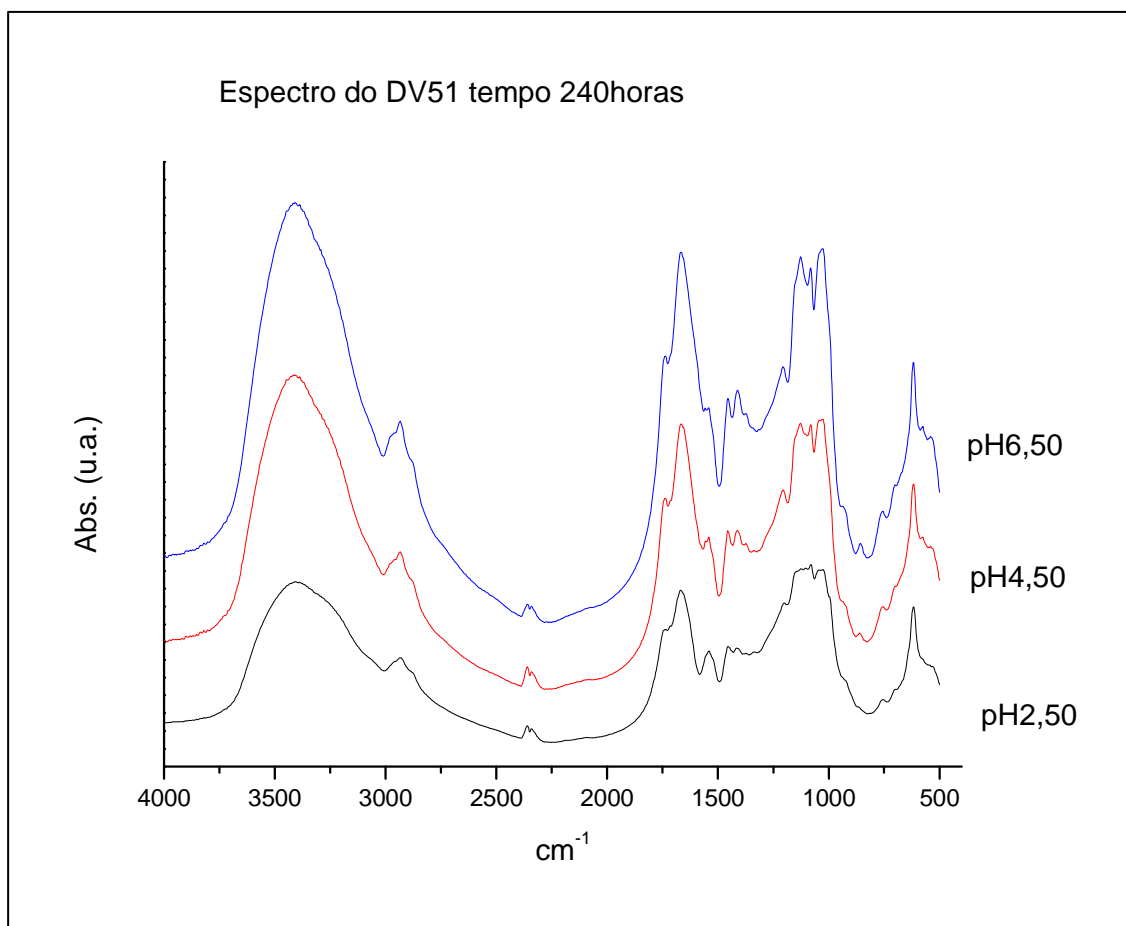
**Figura 27.** Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  do corante “Direct Violet 51” no pH 6,50 controle na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg do corante (em peso seco do sobrenadante) para 149 mg de KBr com leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.

O efeito do protonamento pôde ser observado também para o DV51, com o deslocamento das bandas quanto comparados os três controles (**Figura 28**)



**Figura 28.** Espectro de absorção em FTIR na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> dos controles do corante “Direct Violet 51” nos diferentes valores de pH. Preparados na forma de pastilhas, preparadas na proporção de 1mg do sobrenadante seco para 149 mg de KBr. Leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.

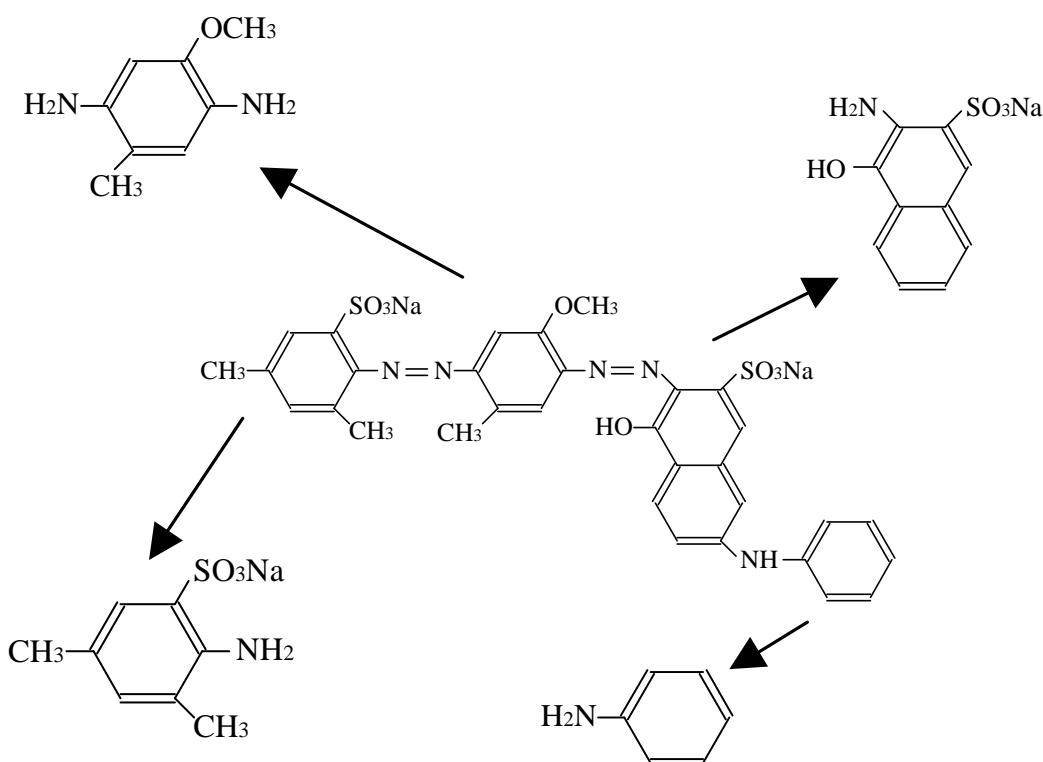
Uma comparação dos resultados dos tratamentos nos três valores de pH trabalhados foi exposta na **Figura 29**. As bandas foram muito semelhantes e as diferenças mais importantes foram atribuídas à disponibilidade do íon  $H^+$  no meio, o que certamente influenciou o metabolismo do corante pelo consórcio microbiano e a ação das enzimas disponíveis no meio de cultura.



**Figura 29.** Espectro de absorção em FTIR na região de 4.000 a 400  $cm^{-1}$  dos tratamentos do corante “Direct Violet 51”, após 240 horas, nos diferentes valores de pH. Preparados na forma de pastilhas, preparadas na proporção de 1mg do sobrenadante seco para 149 mg de KBr. Leituras feitas em espectrofotômetro Bruker Vector 22.

### O FTIR e a análise do corante “Direct Violet 51”.

A **Figura 30** esquematiza o resultado da biodegradação em condições anaeróbicas do DV51. Neste estágio houve a formação principalmente de compostos aromáticos sulfonados com aminas associadas.



**Figura 30.** Esquema das possíveis vias de degradação do corante DV51. Subprodutos no sentido horário: naftol sulfonado, amina aromática sulfonada, amina aromática sulfonada, amina aromática sulfonada +éter aromático.

#### Bandas originais do DV pH 2,50:

-2922, 2855  $\text{cm}^{-1}$ : deformação axial do grupo metila do anel aromático.

-3427; 883, 854 e 642  $\text{cm}^{-1}$ : naftol. Deformação angular da ligação entre o C-H aromático.

-1633, 1080  $\text{cm}^{-1}$ : deformação axial do N-H.

-1172  $\text{cm}^{-1}$ : grupo sulfonado ligado ao anel benzênico.

-1080  $\text{cm}^{-1}$ : ligação do éter aromático.



**Bandas dos tratamentos do DV pH 2,50:**

-756, 702, 672  $\text{cm}^{-1}$ : bandas agudas e pronunciadas C-H fora do plano do anel aromático.

-2936, 1655, 1539  $\text{cm}^{-1}$ : Aminas aromáticas primárias, deformações angulares do N-H.

-1655, 1539  $\text{cm}^{-1}$ : benzeno sulfonado.

-3398, 2936, 1201  $\text{cm}^{-1}$ : naftol ou amino benzeno, aminas primárias livres.

-1125, 1047  $\text{cm}^{-1}$ : benzeno sulfonado, ácido sulfônico.

- 1451  $\text{cm}^{-1}$ : fenol.

-1081  $\text{cm}^{-1}$ : deformação axial do C-N.

**Conclusões Parciais:**

A degradação anaeróbia causa a descoloração dos corantes azóicos (Abraham et al., 2003), produzindo aminas aromáticas que não apresentam cor e são muito resistentes à degradação anaeróbia. Contudo, sua mineralização pode ser realizada em condições aeróbias (Deleé, 1998).

Sua detecção pelo FTIR foi evidenciada com bandas principais nas regiões de 3398  $\text{cm}^{-1}$ , 3405  $\text{cm}^{-1}$ , 2930  $\text{cm}^{-1}$ , 1660-1630  $\text{cm}^{-1}$ , 1534  $\text{cm}^{-1}$  e 1080  $\text{cm}^{-1}$ , o que significa que o tratamento proposto com o uso do I.L.R. provocou a quebra do AY25 e do DV51, em condições anaeróbias.

Portanto, afirma-se que o consórcio microbiano, presente no I.L.R. e aplicado nos dois corantes azóicos, possui azo-reductases que possibilitam a redução desses corantes em condições anaeróbias, produzindo aminas aromáticas e sulfonadas que foram identificadas pelo método do FTIR.

## 6. - Análises no HPLC-UV:

A Cromatografia Líquida de Alto desempenho com Fase Reversa (RP-HPLC) opera através do princípio das interações hidrofóbicas, que resultam das forças repulsivas entre um solvente polar, um analito relativamente não polar e a fase estacionária apolar (CIOLA, 1998).

Os resultados da análise do corante AY25 (tempo controle, pH 2,50,  $\lambda=390\text{nm}$ ) mostraram um tempo de retenção longo ao redor de 27 minutos nas condições estabelecidas no Material e Métodos (**Figuras 31 a,b,c**).

A estrutura do AY25 apresenta grupos polares, tais como  $-\text{NH}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $-\text{OH}$  e  $\text{SO}_3$  e grupos apolares como o benzênico unido a um imidazol pela ligação azo ( $-\text{N}=\text{N}-$ ), além de radicais metila.

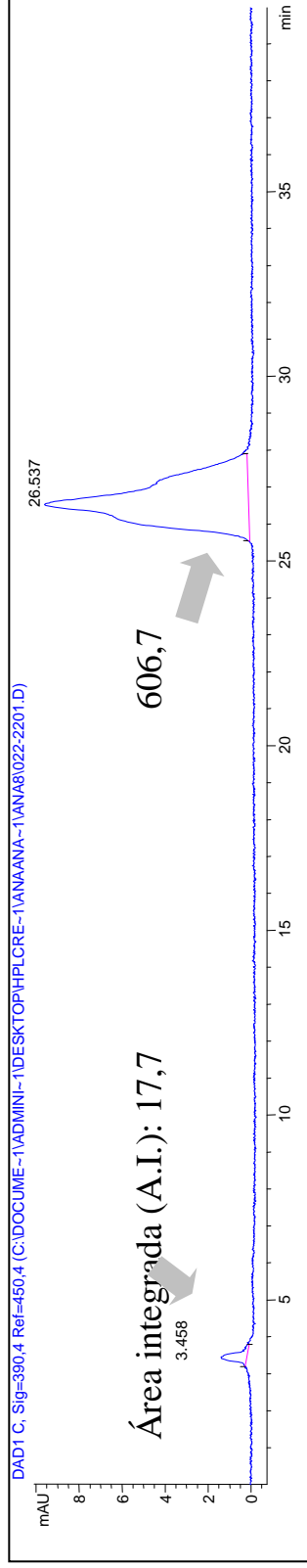
O corante DV51 (tempo controle, pH 2,50,  $\lambda=550\text{nm}$ ), apresentou um tempo de eluição baixo, ao redor de 4 minutos. Sua característica polar pode ser explicada pela presença de dois grupos  $\text{SO}_3$ , um éster ligado ao anel benzênico que separa as duas ligações azo (**Figuras 34 a,b,c**).

Entretanto, seu comportamento diferencial no pH 2,50 sugeriu uma forte mudança na polaridade da molécula em pH ácido.

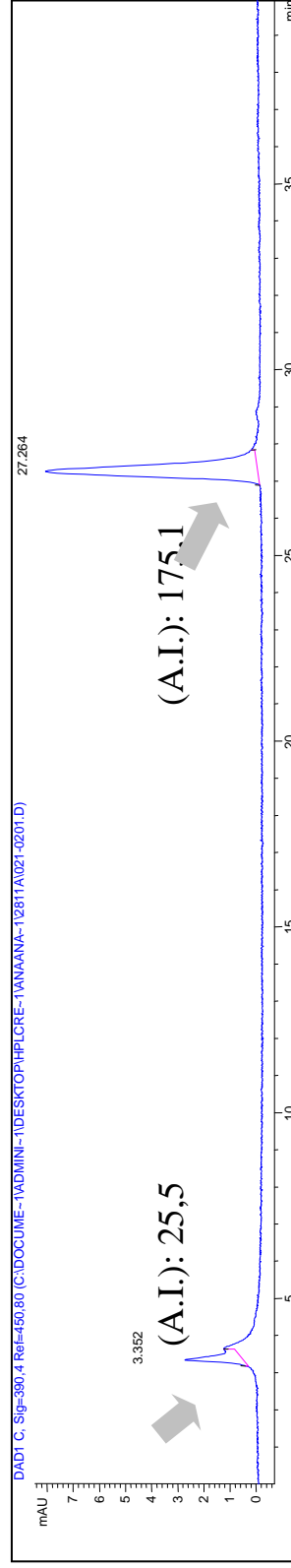
Alterando-se o pH, a estrutura e grupos cromóforos dos corantes não se modificam (como demonstrado pelo UV-Vis), mas sua polaridade pôde ser afetada. A prova disso está nos deslocamentos de bandas entre os controles dos dois corantes na análise do FTIR.

É provável que os grupos  $-\text{OH}$  do metanol tenham formado ligações de hidrogênio com prótons associados aos grupos sulfônicos ou a outros grupos disponíveis do corante,  $-\text{OH}$  do naftil ou a amina secundária aromática que une o anel inferior deste grupo ao último núcleo benzênico.

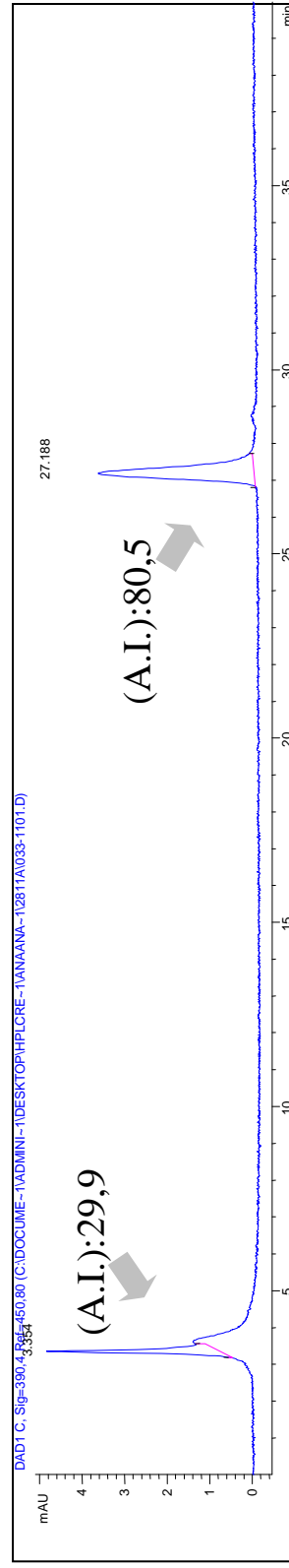
## 6. Análises no HPLC-UV:



a) controle.

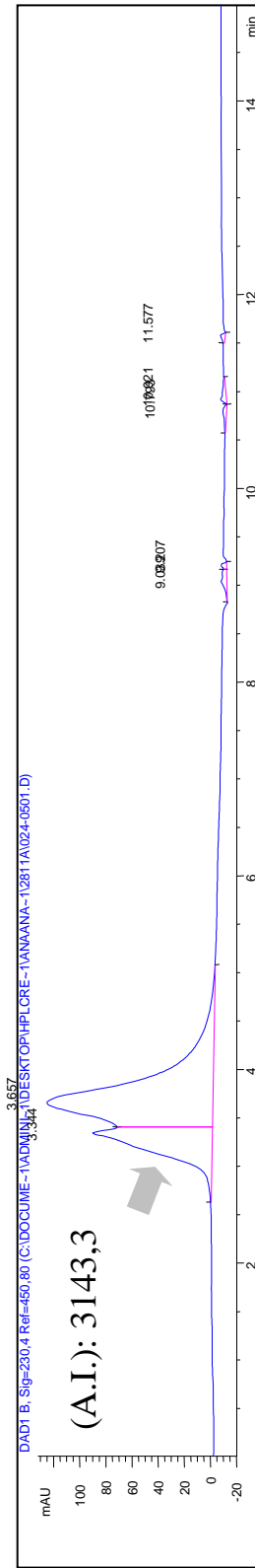


b) 48 horas.

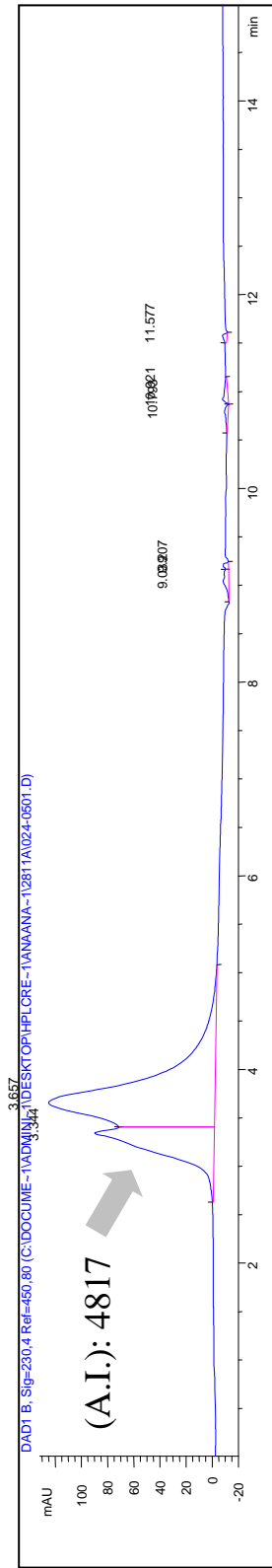


c) 240 horas.

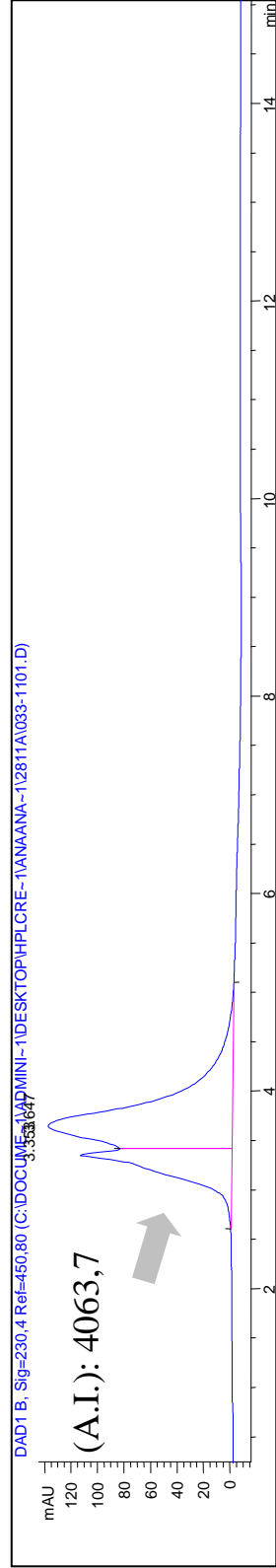
**Figura 31 a,b,c.** Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do corante AY25 no pH 2,50 a 390nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R.



a)3horas.

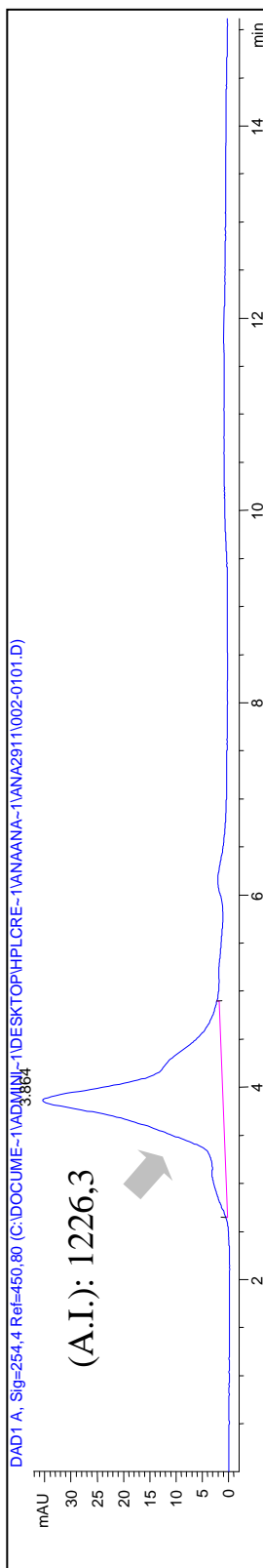


b)96horas.

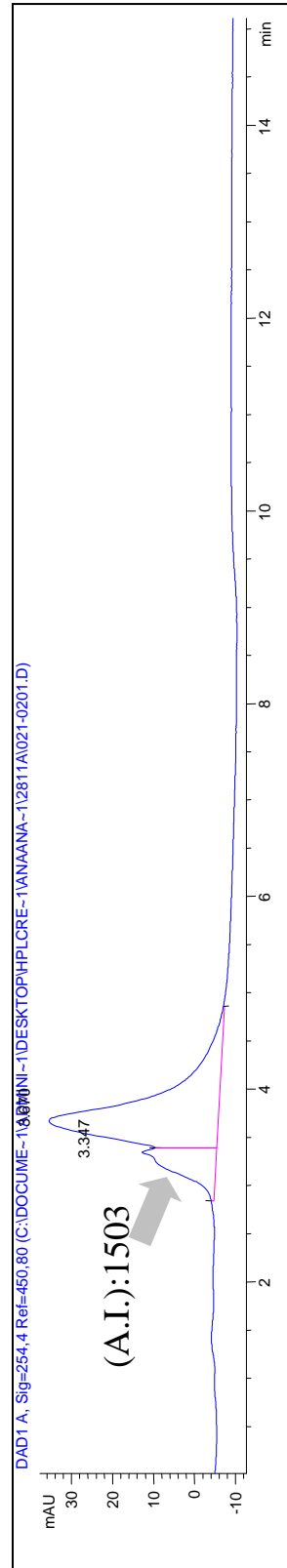


c)240horas.

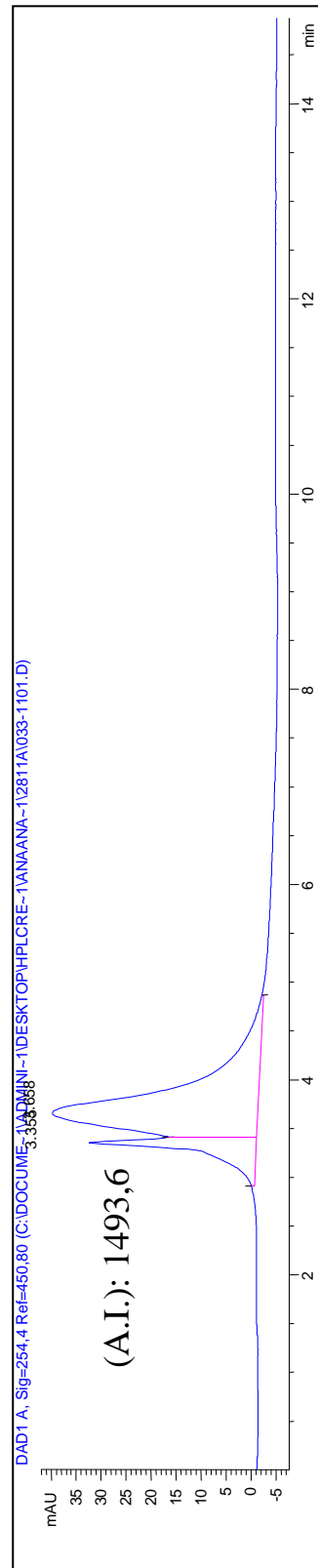
**Figura 32 a,b,c.** Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante AY25 no pH 2,50 a **230nm**, após diferentes tempos de contato com o I.L.R. Alta sensibilidade no UV.



a) 3 horas.

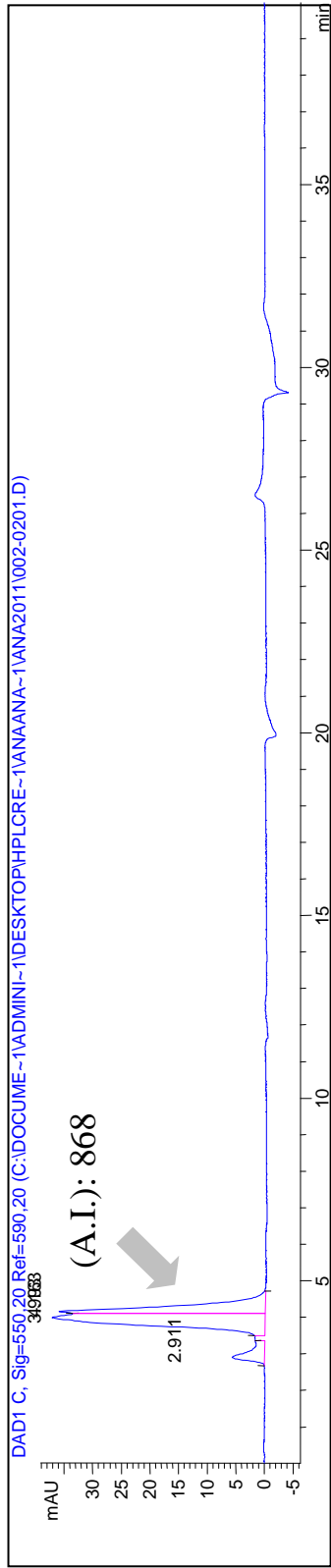


b) 96 horas.

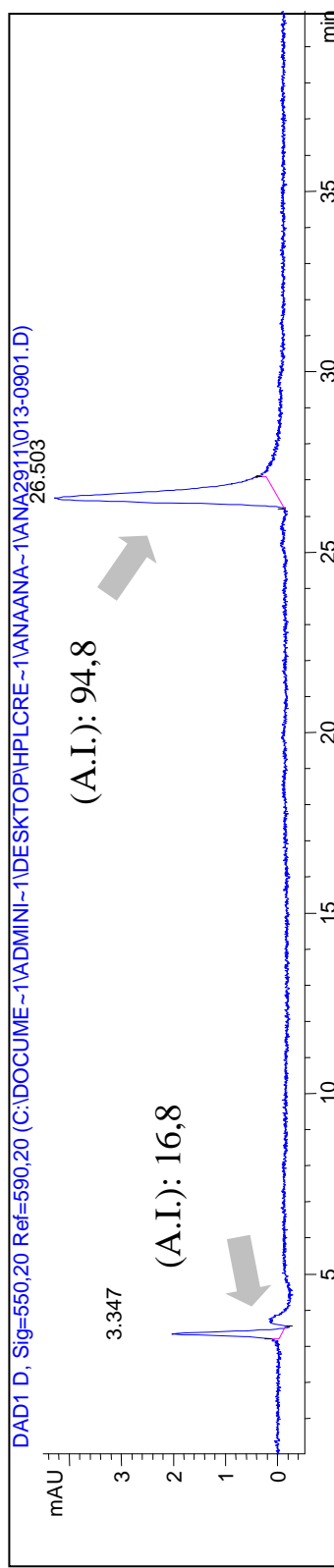


c) 240 horas.

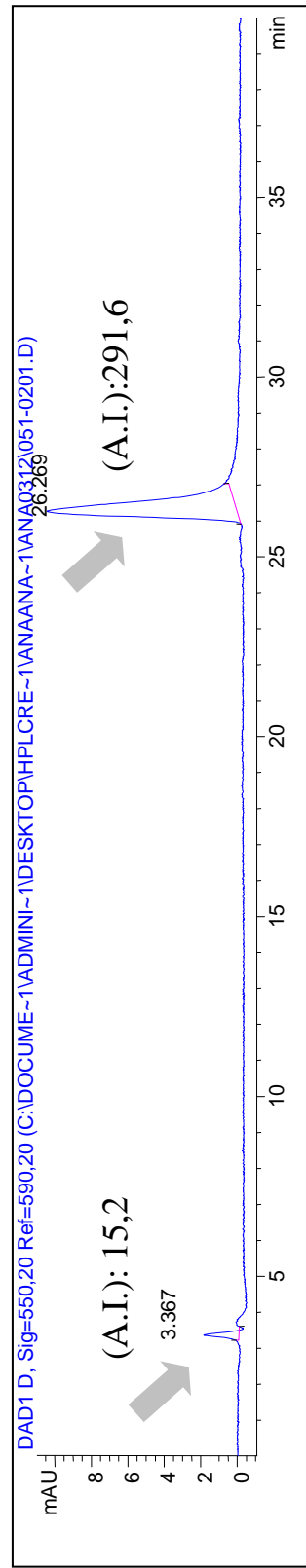
**Figura 33 a,b,c.** Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante AY25 no pH 2,50 a 254nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R. Alta sensibilidade no UV.



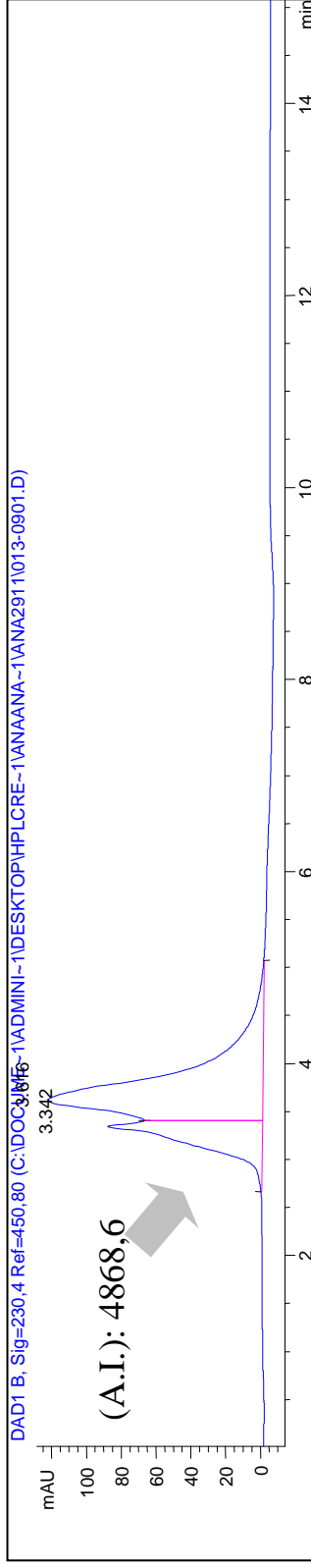
a) controle.



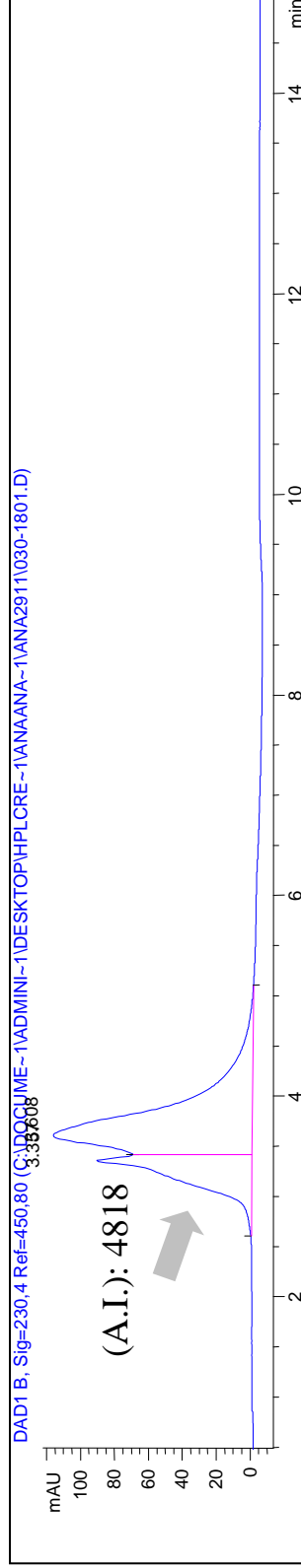
b) 6 horas.



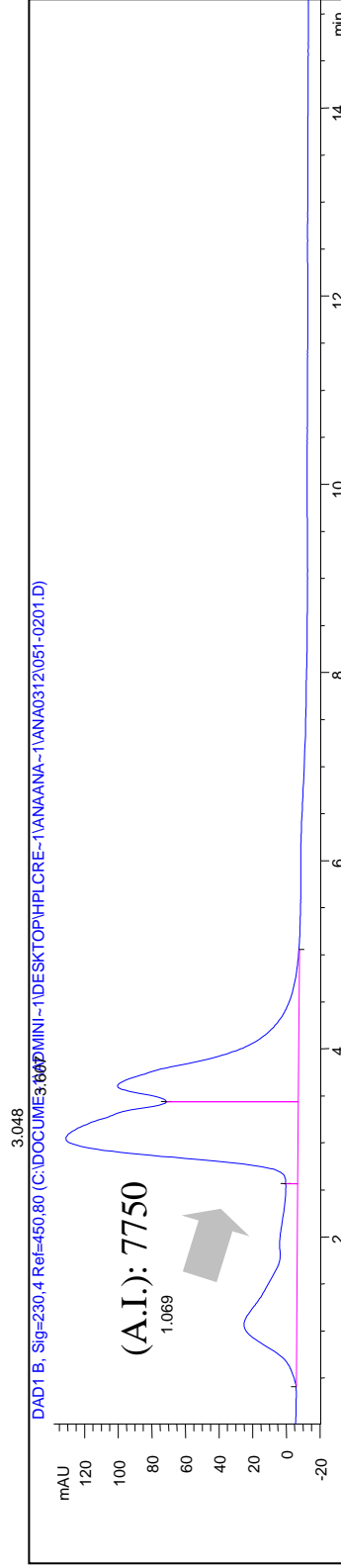
c) 168 horas. **Figura 34 a,b,c.** Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante DV51 no pH 2,50 a **550nm**, após diferentes tempos de contato com o I.L.R.



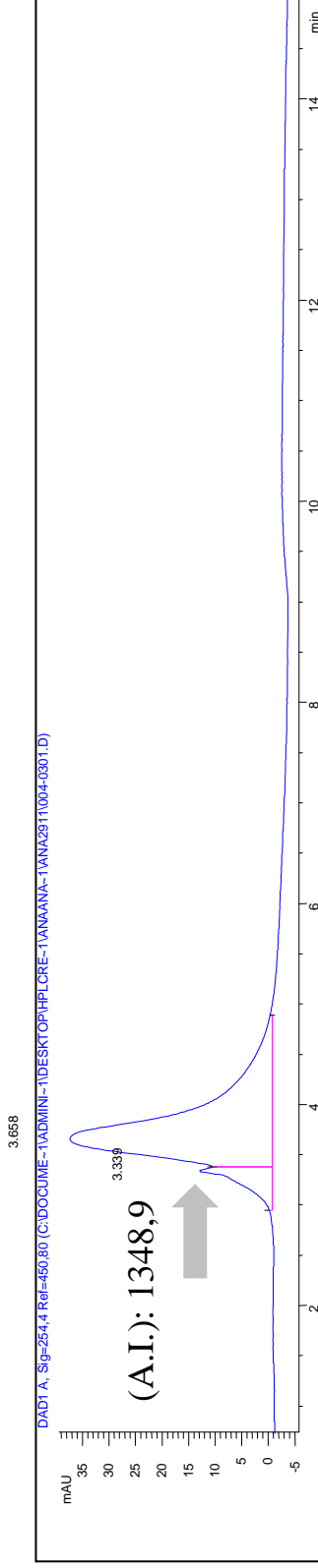
a) 6 horas.



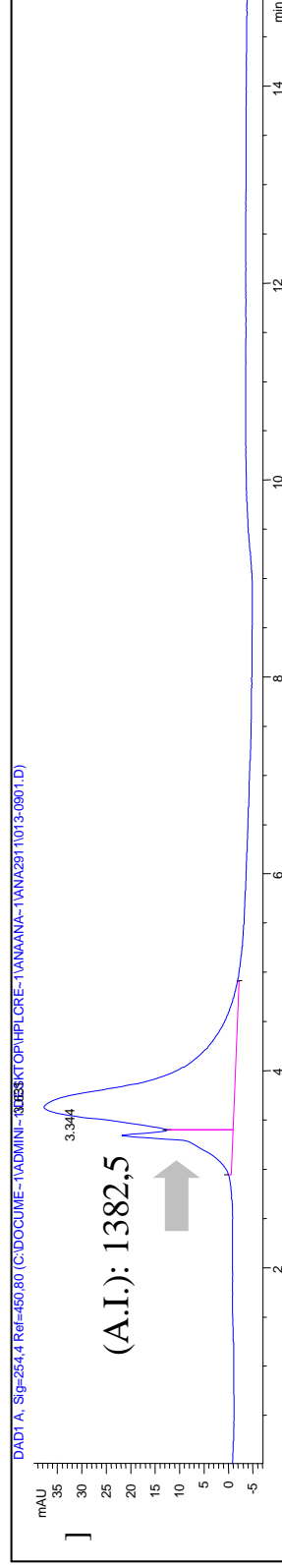
b) 96 horas.



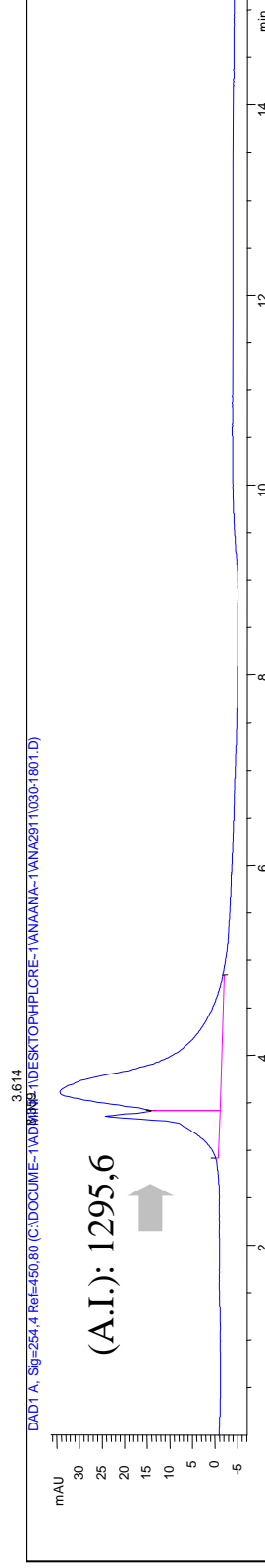
c) 168 horas. **Figura 35 a,b,c.** Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante DV51 no pH 2,50 a 230nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R. Alta sensibilidade no UV.



a) controle.



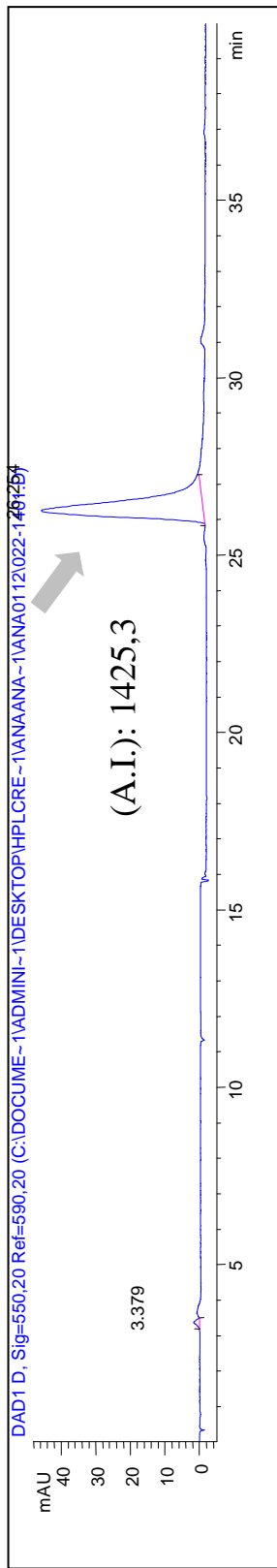
b) 6horas.



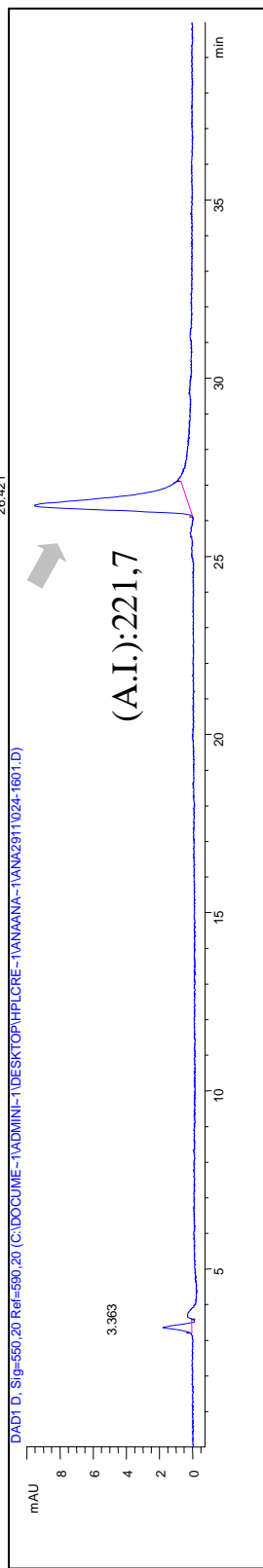
c) 96horas.

**Figura 36 a,b,c.** Comparação dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante DV51 no pH 2,50 a 254nm, após diferentes tempos de contato com o I.L.R. Alta sensibilidade no UV.

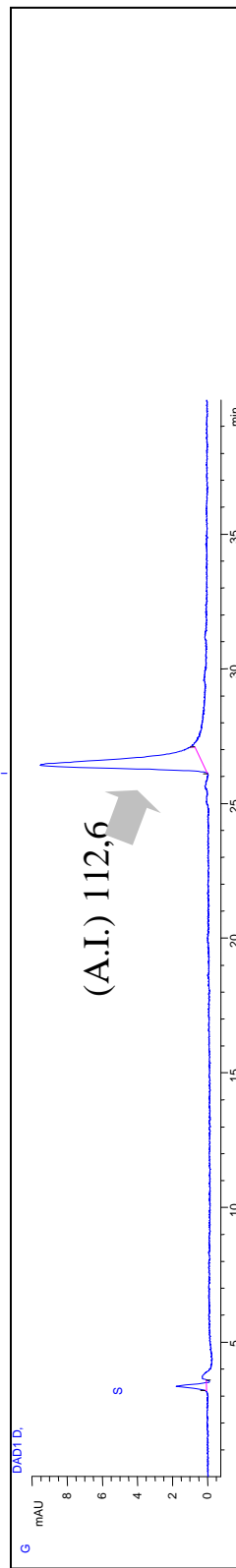




a) controle.



b) 24 horas.



c) 168 horas. **Figura 37 a,b,c** - dos HPLC-UV cromatogramas obtidos com a coluna C-18 Nucleosil. Leitura do sobrenadante dos tratamentos do corante DV51 no pH 4,50 a **550nm**, após diferentes tempos de contato com o I.L.R. Observar as diferenças com os cromatogramas do DV51 no pH 4,50.

### Análise do AY25:

Para todos os valores de pH estudados, o corante AY25 apresentou o mesmo comportamento das Figuras 31, 32 e 33.

**Tabela 5** - Áreas integradas do corante AY25, pH 2,50, comprimentos de onda 230nm, 254nm, 390nm. Tempos controle, tempo 1 (6, 24 ou 48horas) e tempo 2 (168 ou 240horas):

AY25*	230nm	254nm	390nm
Controle	-	-	606,7
Tempo 1	3143,3	1226,3	-
Tempo 2	4817,0	1503,4	175,1

Com o auxílio dos cromatogramas das Figuras 31, 32 e 33 e dos dados das áreas integradas compilados na Tabela 5, foi possível a análise dos resultados das leituras dos controles e tratamentos do AY25.

A análise dos cromatogramas resultantes da leitura no ultravioleta foi realizada nos comprimentos de onda 230nm (Pinheiro et al., 2003) e 254nm (recomendado pelo fabricante da coluna) para detecção de aminas aromáticas primárias, secundárias e sulfonadas.

O aumento das áreas integradas de compostos eluídos entre 3 e 5 minutos, detectado ao longo do experimento, além da simultânea diminuição da área detectável em 390nm, permite a afirmação de que o corante foi removido da solução, em parte por processo de biossorção, e predominantemente por processo biodegradativo, com geração de compostos aromáticos.

### Análise do DV51:

**Tabela 6** - Áreas integradas do corante DV51, pH 2,50, comprimentos de onda 230nm, 254nm, 550nm. Tempos controle, tempo 1 (6, 24 ou 48horas) e tempo 2 (168 ou 240horas):

DV51	230nm	254nm	550nm
Controle	-	-	868*
Tempo 1	4868,6	1348,9	-
Tempo 2	4818,0	1382,5	94,8*

O comportamento do corante DV51 diferencia-se do AY25 quando o experimento realiza-se no pH 2,50. A presença de dois núcleos sulfônicos na molécula confere ao corante uma maior polaridade que provavelmente foi acentuada pela exposição aos íons hidrogênio. O resultado é a eluição do DV51 em tempos de retenção menores (**Figura 34a**).

Houve a simultânea produção de metabólitos mais apolares que apresentaram maior tempo de retenção. Este fato pode ser comprovado nas **Figuras 34b e 34c**, com o aparecimento de picos significativos entre 26 e 28 minutos.

Na região do UV, verificamos que ocorreu da mesma maneira que o AY25, um aumento das áreas nos tempos de contato maiores, indicando a presença de metabólitos como aminas aromáticas e sulfonadas, tanto em 230 como em 254nm (**Figuras 35 a,b,c e 36a,b,c**), respectivamente.

Quando o experimento foi avaliado no pH 4,50, em 550nm, **Figuras 37a,b,c**, o DV51 apresentou um comportamento similar ao do corante AY25, isto é tendo um tempo de retenção do controle em torno de 27 minutos, neste pH provavelmente já não existia a concentração de prótons suficientes para alterar a polaridade do corante, como ocorreu no pH 2,50.

Nos comprimentos de onda 230 e 254nm, os resultados acompanharam aqueles observados no DV51 2,50, o mesmo acontecendo no pH 6,50.

### **Conclusões Parciais:**

A análise complementar do HPLC proveu informações valiosas a respeito dos subprodutos formados durante a ação do I.L.R. sobre os corantes.

Evidências da formação de diferentes aminas aromáticas foram confirmadas pela eluição de compostos mais polares entre 3 a 5 minutos na área de detecção do UV em conjunto com a diminuição das áreas integradas detectáveis no visível dos tratamentos.

A análise do HPLC também demonstrou que o pH em que a amostra foi preparada influenciou na polaridade do corante, mesmo quando se trabalha com uma fase líquida tamponada, como no caso do DV51 pH 2,50.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resultado das interações entre o I.L.R. e os corantes AY25 e DV51 confirmam a hipótese inicial de que os microrganismos possuem um arsenal enzimático capaz de agir sobre tais substâncias. Provavelmente, existem azo-redutases no consórcio microbiano.

A avaliação pelo UV-Vis revelou que o corante DV51 interagiu mais rapidamente com a biomassa nas primeiras horas de contato. A presença de dois grupos sulfônicos, teria influenciado tal interação.

A avaliação das absorvâncias relativas demonstrou que o DV51 foi mais resistente à biodegradação, a presença de duas ligações azo e dois grupos sulfonados, explicariam essa resistência.

Comparativamente, interação biossorbitiva do AY25 com a biomassa foi menor e este corante apresentou-se mais suscetível ao ataque microbiano, segundo as comparações realizadas pelo UV-Vis.

A avaliação pela espectroscopia do FTIR e do HPLC demonstraram claramente a quebra do corante em diversos metabólitos, principalmente com a formação de amins aromáticas e sulfonadas.

A pesquisa alcançou o objetivo estabelecido de determinar o efeito do I.L.R. como biomassa de fácil produção e rápida aplicação que, em condições anaeróbias, possui alta capacidade de remover por biossorção e reduzir por ação enzimática os compostos azo-sulfonados estudados.

Sugere-se a ampliação das escala de bancada dos biorreatores e a proposta de um processo para a mineralização das amins aromáticas formadas, além do uso dos métodos analíticos utilizados para monitoramento das substâncias formadas.

A exposição do sobrenadante a condições aeróbias seria o primeiro passo para testar a biodegradação dos sub-produtos persistentes formados após o tratamento sugerido e avaliado no presente trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ABO-ELALA, S.I.; EL-GOHARY, F.A.; ALI, H.I., WAHAAB, RshA. Treatability studies on textile wastewater. **Environmental Technology Letters**, Londres, v.9, n.2, p.101-108, 1988.
- ABRAHAM, T.E.; SENAM, R.C.; SHAFFIQU, T.S.; ROY, J.J.; POULOSE, T.P.; THOMAS, P.P. Bioremediation of textile azo dye by an aerobic bacteria consortium using a rotating biological contactor. **Biotechnology Progress**, New York, v.19, 1372-1376., 2003.
- ALLINGER, N.L.; CAVA, P.M.; DE JONGH, D.C.;LEBEL, N.A.; STEVES,C.L.C. **Química orgânica**. 2. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, LTC, 1976.
- ALMEIDA, A.C.M. **Estudo da biodegradação de corantes azóicos por inóculos provenientes de biodigestor anaeróbico de alimentos**. 2005. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2005.
- ANGELIS, D.F.; CORSO, C. R.; OLIVEIRA, J. E.; TERAMOTO, A. Hongos en la absorcion de azo-compuestos. IN: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 8., 1979, **Anais...** Chile, 1979. v.8, p. R-66.
- ANLINKER, R. Ecotoxicology and Environmental Safety. **Chemistry Abstract.**, Columbus, v.1, 211.v. 88,1977.
- AWWA/APHA,WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20.ed. Washington, 1999. 1325p.
- BARANA, A. C. Digestão anaeróbia da manipueira. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. Volume 4 – Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. Associação Brasileira de Produtores de Amido de Mandioca, jun. 2001. p .151-169. Disponível em:  
< [www.abam.com.br/livroscargil/volume4.htm](http://www.abam.com.br/livroscargil/volume4.htm)>. Acesso em: 31 ago. 2006.
- BORJA, R.; BANKS, C. J. Evaluation of instability and performance of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating high-strength ice cream wastewater. **Biotechnology Applied Biochemistry**, Duluth, v.2, p. 55-61, 1996.
- BRAHIMI-HORN, M.C.; LIM, K.K.; LIANG, S.L.; MOU, D.G. Binding of textile azo dyes by *Myrothecium verrucaria* Orange II, 10B (blue) and RS (red) azo dye uptake for textile wastewater decolorization. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.10, p. 245-261, 1992.
- BROWN, D.; HAMBURGER, B. The degradation of dyestuffs, part III. Investigations of their ultimate degradability. **Chemosphere**, Oxford, v.16, p.1539-1553. 1987.
- BROWN, M.A.; DEVITO, S.C. Predicting azo dye toxicity. **Critical Reviews. Environmental Science Technology**, Easton, v.23, p. 249-324, 1993.
- BRUNELLO,F. **The Art of Dyeing in the History of Mankind**. Brunello, Franco. The Art of Dyeing in the History of Mankind. Vincenza: Officini Grafiche, 1973.

CARLIELL, C. M.; BARCLAY, S. J.; BUCKLEY, C. A. Treatment of exhausted reactive dye bath effluent using anaerobic digestion: laboratory and full-scale trials. **Water S. A.**, Petroria, v. 22, p. 225-234, 1996.

CHUNG, K.,T.; STEVENS , S.E. The reduction of azo dyes by the intestinal flora. **Critical Review Microbiology**, Boca, Raton, v.18, p.175-190. 1992.

CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgard Blücher. 1998. 179 p.

CORSO,C.R.; ANGELIS, D.F.; OLIVEIRA,J.E.; KIYAN,C. Interaction between the diazo dye Vermelho Reanil P8B e *Neurospora crassa* Strain 74A. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 13, p. 64-66, 1981.

CORSO, C.R. Determinação de sólidos totais, voláteis, fixos, em suspensão e sedimentáveis. In: **ANÁLISES Físico-Químicas e Biológicas para Controle das Estações de Tratamento de Esgotos**. Departamento de Bioquímica e Microbiologia, UNESP, Rio Claro- S.P. 1982. p.75-88.

CORSO,C.R.; DOMINGOS,R.N.; EPIPHANIO,R.; TREVISOLI,C. Estudo da interação adsorptiva entre carvão de osso e o corante “Direct Violet 51” em solução aquosa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS, 15., 1997, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Gráfica da UFSCar, 1997. p.II-32.

CORSO, C.R. **Aplicabilidade das equações de Freundlich e Langmuir e o estudo da toxicidade, na interação biosorptiva entre *Aspergillus oryzae* Paramorfogênico e corantes azóicos em solução aquosa**. Rio Claro, S.P. 1998. 115 f. Tese (Livre-Docência em Biofísica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

COSTA, L.A.M. **Radiação solar global**: algumas considerações sobre seus efeitos no solo em que se incorporou efluente de biodigestor. 1995, 136 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J.A; AUST, S.D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p.1114-1118, 1990.

DELEÉ, W.; O’NEILL, C.; HAWKES, F.R.; PINHEIRO, H.M. Anaerobic treatment of textile effluents: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 73, p. 323-335, 1998.

DYER, J.R. **Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos**. São Paulo: Edgard Blücher,1969. 155 p.

EASTON, J. R. 1995. **The problem of colour. The dye maker’s view. Colour in Dyehouse Effluent**. Oxford.: Alden, 1995. p: 9-21.

EL-GEUNDI, M.S. Colour removal from textile effluents by adsorption techniques. **Water Research**, New York, v. 25, n.3, p.271-274, 1991.

EWING, G.W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. São Paulo: Edgard Blücher, 1972. v. 1.

FAHL, P.; VITOR, V.; JESUS, G.J., CORSO, C.R. Biossorção do corante azóico "Acid Yellow 25" por *Aspergillus oryzae* paramorfogênico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71 p. 1-749, 2004. Suplemento.

FIELD, J.A.; STAMS, A.J, M.; KATO, M.; SHARAA, G. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in co-cultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 67, p. 47-77, 1995.

FLEMMING, H.C. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v.59, p.309-315, 1998.

FITZGERALD, S.W.; BISHOP, P.L. Two stage anaerobic/aerobic treatment of sulfonated azo dyes. **Journal Environ Science Health**, New York, v.A30, p.1251-1276, 1995.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v.79, p. 251-262, 2001.

FRIES, M.R.; AITAS, C. Aplicação de esterco bovino e efluente de biodigestor em um solo podzólico vermelho-amarelo: efeito sobre a produção de matéria seca e absorção de nitrogênio sobre a cultura de sorgo. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v.20, n.1-2., p.137-145, 1990.

GERMANO, L.A.A.P. **Estudo do comportamento das meloidinas na digestão anaeróbia de vinhoto**. 1990. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química e Física Molecular, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP., 1990.

GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.45, p.1741-1747. 1983.

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

HARMER, C.; BISHOP, P.; HE, Y.; HOLDER, E.; SCARPINO, P.V. Biofilm processes for removal of azo dye from municipal wastewaters. In: 46TH PURDUE INDUSTRIAL WASTE CONFERENCE, 1992, 46., Lewis. **Proceedings...** Lewis, Michigan, 1992. p. 217-228.

HU, A.T.L.; WU, S.C. Assessment of the azo dye RP2B on the growth of a nitrogen Fixing cyanobacterium: *Anabaena* sp. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, p. 93-95, 2001.

JADHAV, J.P.; PARSHETTI, G.K.; KALME, S.D.; GOVINDWAR, S.P. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**, Oxford, v. 68, p. 394-400, 2007.

JESUS, J. G. Utilização de *Neurospora crassa* 74A para avaliação da biossorção e biodegradação dos corantes Ácidos, Xanteno, Direto e Reativo. Rio Claro, S.P., 2005, 149 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

KALME,S.D.; PARSHETTI,G.K., JADHAV,S.U., GOVINDWAR, S.P. Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue6 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. **Bioresource Technology**, Essex, v.98, p.1405-1410, 2006.

KAMMRADT, P. B. **Remoção de cor de efluentes de tinturarias industriais através de processo de oxidação avançada.** 2004. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KAPOOR, J.S., VIRARAGHAVAN, T. Fungal Biosorption – an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v.53, p.195-206, 1995.

KIMURA, I.Y.; GONÇALVES JR, A.C.; STOLBERG,J.; LARANJEIRA,M.C.M.; FÁVERE, V.T. Efeito do pH e do Tempo de Contato na Adsorção de Corantes Reativos por Microesferas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 51-57, 1999.

KONCAN, J.A.Z.; SOMEN, J. A simple test for monitoring biodegradable industrial pollution in a receiving stream. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 39, n. 10-11, p. 221–224, 1999.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis, **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p.78-82, 2002.

MANJINDER, S.K.; SAINI, H.S.; SHARMA, D.K.; CHADHA, B.S.;CHIMNI, S.S. Decolourization of azo dyes by bacterial consortium. **Dyes and Pigments**, London, v. 67, n.1.p. 55-61, 2005.

MARCANTI-CONTATO, I.; CORSO, C.R. Remoção de corantes têxteis de meio líquido por *Aspergillus niger*. In: SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA NA ÁREA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 3.,1993, Atibaia. **Anais...** Atibaia, p.175. v. 3.

MARCANTI-CONTATO, I. **Emprego de *Aspergillus niger* paramorfogênico para a avaliação do grau de interferência dos aditivos químicos na biossorção de corantes têxteis de efluentes industriais.** 1995. 173 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1995.

MASTROCOLA, P.C.B. **Efeitos das diferentes quantidades de efluente de biodigestor, no desenvolvimento inicial de cultivares de milho (*Zea mays* L.) em casa de vegetação.** 1983, 118 f. Monografia (Trabalho de Graduação) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, S.P, 1983.

MEYER, U.; OVERNEY,G.; VON WATTENWYIL, A. **Textilveredlung**, Basel, v. 14, p.15, 1979.



MORAES, L.M.; PAULA JUNIOR, D.R. Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de resíduos da bovinocultura e da suinocultura. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 445-454, maio/ago. 2004.

MOU, D.G.; LIM, K.K.; SHEN, H.P. Microbial agents for decolorization of dye wastewater. **Biotechnology Advanced**, New York, v. 9, p. 613-622, 1991.

MUELLER, J.G.; CERNIGLIA, C.E.; PRITCHARD, P.H. Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: **BIOREMEDIATION: Principles and Applications**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p.125–194.

NOVAES, R.F.V. Microbiology of anaerobic digestion. In: **SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE TRATAMENTO ANAERÓBIO EM PAÍSES TROPICAIS**, 1986, São Paulo. **Anais...** São Paulo: AWPRC-ABES, 1986.

O'MAHONY, T.; GUIBAL, E.; TOBIN, J.M. Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, p. 456–463, 2002.

O'NEILL, C.; LOPEZ, A.; ESTEVES, S.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; WILCOX, S. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 53, p. 249-254, 2000.

OS TRINTA anos da Sabesp. **Engenharia**, São Paulo, n. 558, p. 42-118, Jul./Ago. 2003. Edição Especial.

PAINTER, H.A. Guidelines for the testing of chemicals – detailed review paper on biodegradation testing. **Environment Monographs**, Paris, 98p, 1995.

PARSHETTI, G.; KALME, S. D.; GOMARE, S.S.; GOVINDWAR, S.P. Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 3638-3642, 2006.

PINHEIRO, H.M.; TOURAD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewater. **Dyes and Pigments**, London, v. 61, p. 121-139, 2003.

PLUMB, J.J.; BELL, J.; STUCKEY, D.C. Microbial population associated with treatment of an industrial dye effluent in an anaerobic baffled reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 2001, v. 67, n. 7, p. 3226-3235, jul. 2001.

POLMAN, J.K.; BRECKENRIDGE, C.R. Biomass-mediated binding and recovery of textile dyes from waste effluents. **Textile Chemist and Colorist**, v. 28, n. 4, p. 31-35, 1996.

RAMAKRISHNA K.R.; VIRARAGHAVAN, T. Dye removal using low-cost adsorbents. **Water Science Technology**, London, v. 36, n. 2-3, p.189-196, 1997.

RAZO-FLORES, E.; LUIJTEN, M.; DONLON, B.A.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Complete biodegradation of the azo dye azo-disalicylate under anaerobic conditions. **Environmental Science Technology**, Easton, v. 31, p. 2098-2103, 1997.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, p. 247-255, 2001.

ROMANE, A. **Curso d'água, SABESP**. Companhia do Saneamento Básico de São Paulo. São Paulo: Edição Antonio Romane, 1998.

ROZGAJ, R.; GLANCER-SOLJAN, M. Total degradation of 6-amino-naphthalene-2-sulphonic acid by a mixed culture consisting of different bacterial genera. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 96, p. 229-235, 1992.

RUIZ, R.L. **Microbiologia Zootécnica**. São Paulo: Roca, 1992. 314 p.

SEGHEZZO, L. **Anaerobic treatment of domestic wastewater in subtropical regions**. 2004. 172 f.. Thesis - Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2004.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MERRILL, T.C. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

SPONZA, D.T.; IŞIK, M. Toxicity and intermediates of C.I. Direct red 28 dye through sequential anaerobic and aerobic treatment. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 2735-2744, 2005.

TATARKO, M.; BUMPUS, J.A. Biodegradation of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Resource**, New York, v. 32, n. 5, p.1713-1717, 1998.

VALERIANO, M.M. **Efeito da incorporação de efluente de biodigestor no solo sobre desenvolvimento e produtividade do milho (*Zea mays* L.) em casa de vegetação**. 1987. 125 f. Monografia (Trabalho de Graduação) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1987.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001.

VILLELA JUNIOR, L.V.E; ARAÚJO, J.A.C.; FACTOR, T.L. Comportamento do meloeiro em cultivo sem solo com a utilização de biofertilizante. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 153-157, abr./jun. 2003.

VITOR, V. **Emprego de linhagem selvagem de *Candida albicans* isolada de efluente industrial para avaliação da bioadsorção/biodegradação do corante azóico “Direct Violet 51”**. Rio Claro, S.P, 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

WALLACE, T.H. **Biological Treatment of a Synthetic Dye Water and an Industrial Textile Wastewater Containing Azo Dye Compounds**. 2001. 79 f. Msc Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA, 2001.

ZISSI, U.; LYBERATOS, G. Azo-dye biodegradation under anoxic conditions. **Water Science Technology**, Oxford, v. 34, p. 495-500, 1996.

ZEE, F.P.Van der. **Anaerobic dye reduction**. 2002. 142 f. Doctoral thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2002.

ZOLLINGER, H. **Color Chemistry**. 2. ed. Nova York: V.C.H., 1991. 367p.

## APÊNDICE 1

Tabela 1 - Observações principais das bandas do corante AY25 antes e após o tratamento com o I.L.R. Em todas as análises, sempre os maiores tempos de contato foram considerados, 240horas.

Corante Analisado AY pH2,50		Corante Analisado AY pH 4,50		Corante Analisado AY pH 6,50	
Bandas Iniciais cm <sup>-1</sup>	Bandas finais cm <sup>-1</sup>	Bandas Iniciais cm <sup>-1</sup>	Bandas finais cm <sup>-1</sup>	Bandas Iniciais cm <sup>-1</sup>	Bandas finais cm <sup>-1</sup>
3411	3405	3427	3338	3467	3391
2943	2930	2923	2935	2927	2990-2939-2880
1729-1664	1660	1598-1554-1500	1743-1666	1635	1743
1547	1534	1371	1598-1453	1550	1597
1450	1443	1344	1410-1120	1086	1397-1370
1406	1416	1126-1037	1205-1079	964	1198-1081-1028
1376-1339	1025	997	935-915	796	846-761
755	725-703	837-756	848-754	626	622
620	619	621	619		

## APÊNDICE 1

**Tabela 2** - Observações principais das bandas do DV51 antes e após o tratamento com o I.L.R. Em todas as análises, sempre os maiores tempos de contato foram considerados, 240horas.

Corante Analisado DV51 pH 2,50		Corante Analisado DV51 pH 4,50		Corante Analisado DV51 pH 6,50	
Bandas Iniciais cm <sup>-1</sup>	Bandas finais cm <sup>-1</sup>	Bandas Iniciais cm <sup>-1</sup>	Bandas finais cm <sup>-1</sup>	Bandas Iniciais cm <sup>-1</sup>	Bandas finais cm <sup>-1</sup>
3427	3398	3413	3377	3446	3407
2922	2936	2961-2932	2977-2927	2935	2931
2855	1739	1656	1735	1733	1740-1666
1633	1655-1539	1538	1671	1632	1451-1413
1206	1451	1411	1549	1478	1090
1172	1201-1125	1124	1445-1405-1371	1086	947
1080	1103- 1081	1112	1033	942	854
883	1047	1081	1126	795	798
854	756	1050	1082		619
800	702	622	929-862-761		
642	672-618		614		

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)