



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RENATA AFONSO

**BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS EM EFLUENTES  
INDUSTRIAIS PELO FUNGO *Ganoderma spp*:  
UM ESTUDO CINÉTICO**

---

Londrina  
2010

RENATA AFONSO

**BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS EM EFLUENTES  
INDUSTRIAIS PELO FUNGO *Ganoderma spp.*:  
UM ESTUDO CINÉTICO**

Dissertação apresentada por Renata Afonso ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wagner José Barreto

Londrina  
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

A257b Afonso, Renata.  
Biodegradação de corantes têxteis em efluentes industriais pelo fungo  
*Ganoderma spp* : um estudo cinético / Renata Afonso. – Londrina, 2010.  
94 f. : il.

Orientador: Wagner José Barreto.  
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2010.

1. Físico-química – Teses. 2. Corantes – Biodegradação – Teses. 3. Indústria têxtil  
– Química – Teses. 4. Química têxtil – Teses. 5. *Ganoderma spp* – Teses. I. Barreto, Wagner José.  
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-  
Graduação em Química. III. Título.

CDU 547.97

RENATA AFONSO

**BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS EM EFLUENTES  
INDUSTRIAIS PELO FUNGO *Ganoderma spp*:  
UM ESTUDO CINÉTICO**

Dissertação apresentada por Renata Afonso ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Wagner José Barreto (Orientador)  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi Universidade  
Estadual de Campinas

---

Profa. Dra. Suely Mayumi Obara Doi  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 19 de março de 2010

*Aos meus pais, Laudemiro e Fátima e às minhas irmãs, Manoela e Sabrina, pelo apoio para que eu chegasse até aqui e por todo amor, carinho e confiança.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por iluminar meu caminho em todos os momentos.

A minha família, pela confiança depositada em mim, e em especial, a minha irmã Sabrina que esteve comigo me ajudando durante todo o tempo.

Ao Prof. Dr. Wagner José Barreto, pela orientação, apoio e confiança durante todo o trabalho.

A Profa. Dra. Sônia Regina Giancoli Barreto pela amizade e carinho.

A Profa. Dra. Suely Mayumi Obara Doi pelos ensinamentos e colaboração na parte microbiológica do trabalho.

A Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio pelas sugestões e ajuda nos métodos quimiométricos.

Aos professores do Programa de Mestrado em Química da UEL pela contribuição na minha formação.

Aos técnicos: Nelson Janeiro Rodriguez pela ajuda na parte microbiológica e Jurandir Pereira Pinto pela ajuda nas análises cromatográficas.

Aos meus amigos do mestrado Raquel, Elaine, Edmar, Adriana, Daniely e Ana e do laboratório Bianca, Kássio, Tarsis, Juliana e Eduardo pelo carinho e amizade, e em especial a Nathália que me ajudou em todas as análises.

Ao Fernando pelo carinho, amor e compreensão em todas as horas.

A CAPES pela bolsa concedida.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para este trabalho.

AFONSO, Renata. **Biodegradação de corantes têxteis em efluentes industriais pelo fungo *Ganoderma spp.***: um estudo cinético. 2010. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo realizar a quantificação individual e simultânea de misturas ternárias e obter os parâmetros cinéticos dos corantes Amarelo Procion HE4R 100%, Azul Procion HEGN 125% e Vermelho Procion HE7B (Grupo 1) e Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP (Grupo 2) biodegradados com o fungo *Ganoderma spp.* Efluentes de tingimento de tecidos obtidos em escala laboratorial foram analisados utilizando a espectrofotometria UV-Vis associada ao método de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), a partir de curvas de calibração utilizando um planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex triangular. A biodegradação dos corantes do Grupo 1 seguiram uma cinética de ordem fracionária entre primeira e segunda. Após 72 horas de incubação foi degradado 33,6% do corante Amarelo Procion, 43,5% do Azul Procion e 57,7% do Vermelho Procion no efluente, pelo fungo *Ganoderma spp.* A biodegradação dos corantes do Grupo 2, atribuída à enzima lacase, seguiu uma cinética de primeira ordem com  $k = 1,17$  e  $k = 2,07 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a 25°C e  $k = 0,62$  e  $k = 1,81 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a 28°C, para os corantes Remazol Brilliant Orange 3R e Azul Remazol RR, respectivamente. Para o corante Azul Remazol R ESP as constantes de velocidade foram de  $5,59 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a 25°C e  $6,22 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a 28°C, mas houve biodegradação também a 31°C, com  $k = 5,46 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a 31°C, que foi atribuída a outro tipo de enzima. As energias de ativação calculadas a partir da equação de Arrhenius foram  $175,90 \text{ kJ mol}^{-1}$  para o corante Remazol Brilliant Orange 3R,  $37,17 \text{ kJ mol}^{-1}$  para o Azul Remazol RR e  $29,58 \text{ kJ mol}^{-1}$  para o Azul Remazol R ESP. O corante Azul Remazol R ESP foi o que apresentou maior porcentagem de degradação (95,4%), após 335 horas de incubação, a 25°C. As concentrações e constantes de velocidade obtidas para o corante Azul Remazol R ESP a partir das análises de CLAE dos efluentes foram concordantes com os resultados obtidos com a metodologia PLS. Os resultados mostraram que a metodologia PLS pode ser usada para quantificação de corantes em efluentes com o objetivo de encontrar os parâmetros cinéticos de reações de biodegradações.

**Palavras-chave:** Corante têxtil. Espectrofotometria UV-vis. Biodegradação e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais.

AFONSO, Renata. **Biodegradation of textile dyes in industrial effluents by the fungus *Ganoderma spp.***: a kinetic study. . 2010. Dissertation (Master's degree in Chemical) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## ABSTRACT

This objective of this work was to make an individual and simultaneous quantification of ternary mixtures and to obtain the kinetic parameters of the dyes Yellow Procion HE4R 100%, Blue Procion HEGN 125% and Red Procion HE7B (Group 1) and Remazol Brilliant Orange 3R, Blue Remazol RR and Blue Remazol R ESP (Group 2) biodegraded by the fungus *Ganoderma spp.* Effluents from dyeing fabrics obtained at laboratory scale were analyzed using UV-Vis spectrophotometry associated with the Partial Least Squares Regression (PLS) method, from calibration curves designed by a Simplex-Centroid triangular model. The biodegradation of dyes in Group 1 followed a fractional kinetic order between first and second. After 72 hours of incubation were biodegraded 33,6% of the dye Yellow Procion, 43,5% of the Blue Procion and 57,7% of the Red Procion in effluent by the fungus *Ganoderma spp.* The biodegradation of dyes in Group 2, attributed to the enzyme laccase, followed a first order kinetics with  $k = 1,17$  and  $k = 2,07 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  at 25°C and  $k = 0,62$  and  $k = 1,81 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  at 28°C, for the dyes Remazol Brilliant Orange 3R and Blue Remazol RR, respectively. For the dye Blue Remazol R ESP the rate constants were  $5,59 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  at 25°C and  $6,22 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  at 28°C, but there was also biodegradation at 31°C, with  $k = 5,46 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , at 31°C, which was attributed to another type of enzyme. The activation energies calculated from the Arrhenius equation were 175,90  $\text{kJ mol}^{-1}$  for the Remazol Brilliant Orange 3R, 37,17  $\text{kJ mol}^{-1}$  for Blue Remazol RR and 29,58  $\text{kJ mol}^{-1}$  for Blue Remazol R ESP. The dye Blue Remazol R ESP showed the greatest percentage of biodegradation (95,4%) after 335 hours of incubation at 25°C. The concentrations and rate constants obtained for the Blue Remazol R ESP from the analysis of HPLC of the effluents were consistent with the results obtained using the PLS methodology. The results showed that the PLS methodology can be used for quantification of dyes in effluents in order to find the kinetic parameters of biodegradation reactions.

**Key-words:** Textile dye. Spectrophotometry UV-vis. Biodegradation and Partial Least Squares Regression.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química de um corante contendo a função azo como grupo cromóforo .....	16
<b>Figura 2</b> - Matriz $X$ contendo $n$ linhas e $p$ colunas.....	26
<b>Figura 3</b> - Relação da matriz $X$ com o produto das matrizes menores $T$ e $P$ .....	27
<b>Figura 4</b> - Relação das matrizes $X$ e $Y$ com os produtos das matrizes menores $T$ e $P$ e $U$ e $Q$ , respectivamente .....	30
<b>Figura 5</b> - Estrutura química dos corantes, (a) Amarelo Procion HE4R 100%, (b) Azul Procion HEGN 125%, (c) Vermelho Procion HE7B e (d) Remazol Brilliant Orange 3R .....	33
<b>Figura 6</b> - Planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex com três pontos axiais .....	34
<b>Figura 7</b> - Espectros de absorção UV-vis, de 330 a 800 nm, das soluções estoques ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) dos corantes (A) Amarelo Procion, (B) Azul Procion e (C) Vermelho Procion.....	44
<b>Figura 8</b> - Espectros de absorção UV-vis, de 350 a 800 nm, das misturas da curva de calibração (A) mistura 4 (1:1:0), (B) mistura 5 (0:1:1), (C) mistura 6 (1:0:1) e (D) mistura 7 (1:1:1) .....	45
<b>Figura 9</b> - Porcentagem de variância explicada em função do número de componentes principais para o Grupo 1 (Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion).....	47
<b>Figura 10</b> - Variação do RMSE em função do número de CP para cada corante: (A) Amarelo Procion, (B) Azul Procion e (C) Vermelho Procion .....	47
<b>Figura 11</b> - Espectros UV-vis do efluente biodegradado pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> em função do tempo (h): (A) 0, (B) 12, (C) 24, (D) 48 e (E) 72 .....	48
<b>Figura 12</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C) do corante Amarelo Procion biodegradado no efluente a $28^{\circ}\text{C}$ através dos cálculos obtidos de PLS .....	50
<b>Figura 13</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C) do corante Azul Procion biodegradado a $28^{\circ}\text{C}$ no efluente através dos cálculos obtidos de PLS .....	51

<b>Figura 14</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C) do corante Vermelho Procion biodegradado a 28°C no efluente através dos cálculos obtidos de PLS .....	52
<b>Figura 15</b> - Espectros de absorção UV-vis, de 280 a 800 nm, das soluções estoques (1000 mg L <sup>-1</sup> ) dos corantes (A) Remazol Brilliant Orange 3R, (B) Azul Remazol RR e (C) Azul Remazol R. ESP .....	55
<b>Figura 16</b> - Espectros de absorção UV-Vis, de 280 a 800 nm, das misturas da curva de calibração dos corantes de Grupo 2 (Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP.) (A) mistura 4 (1:1:0), (B) mistura 5 (0:1:1), (C) mistura 6 (1:0:1) e (D) mistura 7 (1:1:1).....	56
<b>Figura 17</b> - Variação do RMSE em função do número de CP para os corantes: (A) Remazol Brilliant Orange 3R, (B) Azul Remazol RR e (C) Azul Remazol R. ESP .....	58
<b>Figura 18</b> - Porcentagem de variância explicada em função do número de componentes principais para o Grupo 2.....	58
<b>Figura 19</b> - Espectros UV-Vis do efluente, com Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP., biodegradado pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 25°C, nos tempos (h): (A) 0, (B) 24, (C) 78 e (D) 335 .....	59
<b>Figura 20</b> - Espectros UV-Vis do efluente, com Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP., biodegradado pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 28°C, nos tempos (h): (A) 0, (B) 24, (C) 78 e (D) 335 .....	59
<b>Figura 21</b> - Espectros UV-Vis do efluente, com Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP., biodegradado pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 31°C, nos tempos (h): (A) 0, (B) 24, (C) 78 e (D) 335 .....	60
<b>Figura 22</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Remazol Brilliant Orange 3R no efluente, pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 25°C .....	64

<b>Figura 23</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Remazol Brilliant Orange 3R no efluente, pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 28°C .....	65
<b>Figura 24</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Remazol Brilliant Orange 3R no efluente, pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 31°C .....	67
<b>Figura 25</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol RR no efluente, pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 25°C .....	67
<b>Figura 26</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol RR no efluente, pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 28°C .....	68
<b>Figura 27</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol RR no efluente, pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 31°C .....	69
<b>Figura 28</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol R ESP no efluente, pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 25°C .....	70
<b>Figura 29</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol R ESP no efluente, pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 28°C .....	71
<b>Figura 30</b> - Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol R ESP no efluente, pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 31°C .....	72
<b>Figura 31</b> - Cromatogramas dos efluentes contendo os corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP., biodegradados pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , a 25°C, nos tempos (h): (A) 0, (B) 78, (C) 175 e (D) 335.....	80
<b>Figura 32</b> - Cinética de biodegradação do corante Azul Remazol R. ESP. no efluente pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> através da CLAE nas temperaturas: (A) 25°C, (B) 28°C e (C) 31°C .....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Volume de soluções estoque dos corantes adicionados às misturas.....	36
<b>Tabela 2</b> - Programa utilizado para passagem da fase móvel usando o método de gradiente .....	43
<b>Tabela 3</b> - Concentrações (mg L <sup>-1</sup> ) experimentais e calculadas dos corantes nas misturas 8 (2:1/2:1/2), 9 (1/2:2:1/2) e 10 (1/2:1/2:2) da curva de calibração do Grupo 1, usando 3, 4 e 5 CPs.....	46
<b>Tabela 4</b> - Concentrações (mg L <sup>-1</sup> ) dos corantes no efluente calculadas pelo PLS durante a biodegradação pelo fungo <i>Ganoderma spp.</i> .....	48
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros cinéticos calculados para biodegradação dos corantes do Grupo 1 (Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion), pelo fungo <i>Ganoderma spp.</i> , a 28°C, utilizando as concentrações obtidas pelo PLS .....	53
<b>Tabela 6</b> - Concentrações (mg L <sup>-1</sup> ) experimentais e calculadas pelo PLS dos corantes nas misturas 8 (2:1/2:1/2), 9 (1/2:2:1/2) e 10 (1/2:1/2:2) da curva de calibração do Grupo 2 (Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP.) usando 3, 4 e 5 componentes principais.....	57
<b>Tabela 7</b> - Concentração (mg L <sup>-1</sup> ) calculada pelo PLS para os corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP. no efluente em função do tempo de biodegradação, a 25°C .....	61
<b>Tabela 8</b> - Concentração (mg L <sup>-1</sup> ) calculada pelo PLS para os corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP. no efluente em função do tempo de biodegradação, a 28°C .....	62
<b>Tabela 9</b> - Concentração (mg L <sup>-1</sup> ) calculada pelo PLS para os corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP. no efluente em função do tempo de biodegradação, a 31°C .....	63

<b>Tabela 10</b> -Atividade enzimática da lacase e biomassa microbiana dos efluentes biodegradados com <i>Ganoderma spp</i> em diferentes tempos, a 25°C, 28°C e 31°C .....	74
<b>Tabela 11</b> -Parâmetros cinéticos obtidos para a biodegradação do corante RBO 3R pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> no efluente a 25°C, 28°C e 31°C .....	75
<b>Tabela 12</b> -Parâmetros cinéticos obtidos para a biodegradação do corante Azul Remazol RR pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> no efluente a 25°C, 28°C e 31°C .....	75
<b>Tabela 13</b> -Parâmetros cinéticos obtidos para a biobiodegradação do corante Azul Remazol R ESP pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> no efluente a 25°C, 28°C e 31°C .....	76
<b>Tabela 14</b> -Energia de ativação calculada a partir das constantes de velocidade de primeira ordem para os corantes do Grupo 2.....	78
<b>Tabela 15</b> -Parâmetros cinéticos obtidos para a reação de biodegradação do corante Azul Remazol R ESP no efluente pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> em 25°C, 28°C e 31°C usando as concentrações obtidas pela CLAE .....	83
<b>Tabela 16</b> -Concentrações calculadas para o corante Azul Remazol R ESP, biodegradado pelo fungo <i>Ganoderma spp</i> , no efluente, utilizando os métodos do PLS e CLAE.....	84

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 INDÚSTRIA TÊXTIL.....	14
1.2 FIBRAS TÊXTEIS .....	14
1.3 CORANTES TÊXTEIS.....	15
1.3.1 Corantes Reativos .....	17
1.4 Tratamento de Efluentes Têxteis .....	18
1.4.1 Tratamento Microbiológico.....	20
1.4.2 Fungos de Podridão Branca .....	21
1.4.3 Enzimas Lignolíticas .....	22
1.5 DETERMINAÇÃO DE CORANTES EM EFLUENTES.....	23
1.6 QUIMIOMETRIA .....	25
1.6.1 Análise das Componentes Principais (PCA).....	25
1.6.2 Calibração Multivariada .....	27
1.6.2.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	31
2.1 GERAL .....	31
2.2 ESPECÍFICOS .....	31
<b>3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	32
3.1 CORANTES TÊXTEIS .....	32
3.2 MICRORGANISMO .....	34
3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE DOS CORANTES .....	33
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	34
3.5 PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO .....	36
3.5.1 Grupo 1: Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion .....	36
3.5.2 Grupo 2: Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP.....	37

3.6	PREPARO DO EFLUENTE EM ESCALA LABORATORIAL PARA BIODEGRADAÇÃO .....	38
3.6.1	Grupo 1: Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion .....	38
3.6.2	Grupo 2: Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP .....	39
3.7	PREPARAÇÃO DO BRANCO .....	40
3.8	DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA .....	41
3.9	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE.....	41
3.10	OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS).....	42
3.11	Análise estatística dos dados .....	42
3.12	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
4.1	CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES, PELO PLS, DOS CORANTES AMARELO PROCION, AZUL PROCION E VERMELHO PROCION (GRUPO 1) .....	44
4.2	CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DOS CORANTES REMAZOL BRILLIANT ORANGE 3R, AZUL REMAZOL RR E AZUL REMAZOL R. ESP. UTILIZANDO O PLS (GRUPO 2) ....	55
4.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	80
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e frequentes devido ao crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. A contaminação dos corpos de água e o conseqüente comprometimento destes têm levado à realização de estudos com o intuito de desenvolver tecnologias capazes de minimizar o volume e a toxicidade dos efluentes industriais. Essa problemática ambiental associada ao efluente têxtil é bastante conhecida e merece destaque uma vez que os grandes parques industriais geram grandes volumes de efluentes contaminados (KUNZ et al., 2002; ALMEIDA et al., 2004).

Um grande número de diferentes corantes é utilizado para várias aplicações industriais e uma significativa quantidade deles aparece na forma de efluentes que são despejados nos corpos de água receptores sem o devido tratamento. Isso pode resultar em graves problemas estéticos (WONG; YU, 1999), além de alterar os ciclos biológicos afetando principalmente os processos fotossintéticos (SHEDBALKAR; DHANVE; JADHAV, 2008; NILSSON et al., 2006; MAZMANCI; ÜNYAYAR, 2005).

Uma grande quantidade de corantes é liberada no processamento têxtil como efluente devido à fixação incompleta dos corantes nas fibras, e muitos estudos têm mostrado que algumas classes desses corantes, principalmente os azocorantes e seus subprodutos, podem ser tóxicos, carcinogênicos e/ou mutagênicos (KUNZ et al., 2002; CATANHO; MALPASS; MOTHEO, 2006; SAHEL et al., 2007; SUMATHI; MANJU, 2000; SELVAM; SWAMINATHAN; CHAE, 2003; ERKURT; ÜNYAYAR; KUMBUR, 2007; MECHICHI; MHIRI; SAYADI, 2006).

A legislação sobre substâncias tóxicas, em águas residuais industriais, está se tornando cada vez mais rigorosa e, por conseqüente, um grande número de



pesquisadores está abordando uma grande variedade de problemas relacionados a essa área (SLOKAR; MARECHAL, 1998).

### **1.1 INDÚSTRIA TÊXTIL**

No Brasil cerca de 20 ton/ano de corantes são consumidos nas indústrias de tingimento, dos quais cerca de 20% são descartados como resíduos ou efluentes (DALLAGO; SMANIOTTO; OLIVEIRA, 2005). A quantidade de corantes perdidos depende da classe do corante usado e pode chegar a 50% quando utilizados corantes reativos (MCMULLAN et al., 2001).

### **1.2 FIBRAS TÊXTEIS**

As fibras têxteis podem ser divididas em fibras naturais e fibras não naturais. As fibras naturais podem ser de origem animal, vegetal ou mineral. As mais utilizadas são baseadas em celulose (cadeias poliméricas lineares de glucose) e proteína (polímero complexo composto de diferentes aminoácidos) presentes na lã, seda, algodão e linho (GARATINI; ZANONI, 2000).

O algodão, usado há mais de 7000 anos, é a fibra mais utilizada na indústria têxtil brasileira e é constituído basicamente de celulose, ceras naturais e proteínas. O grande número de grupos hidroxilas da celulose do algodão propicia grande capacidade de absorver água (ALCÂNTARA; DALVIN, 1996).

As fibras não-naturais podem ser classificadas em fibras artificiais e fibras sintéticas. As fibras artificiais são comercializadas como viscose (xantato de celulose obtido da madeira) e acetato de celulose (triacetato de celulose obtido da madeira).

As fibras sintéticas são produzidas a partir de matérias primas da indústria petroquímica como poliamida, poliéster e acrílico (GARATINI; ZANONI, 2000; ALCÂNTARA; DALVIN, 1996).

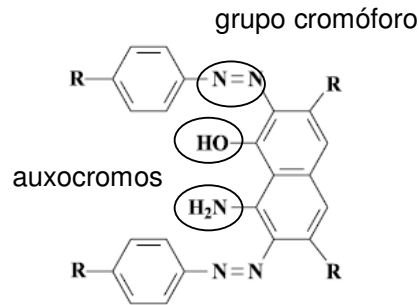
### **1.3 CORANTES TÊXTEIS**

As estruturas moleculares dos corantes utilizados para tingimento da fibra têxtil podem ser divididas em duas partes principais, o grupo cromógeno e o auxocromo.

O grupo cromógeno é a parte aromática da molécula que possui o grupo cromóforo que é o radical químico responsável pela coloração do corante (WONG; YU, 1999). O auxocromo é o grupo auxiliar da molécula responsável pela fixação do corante à fibra têxtil (KUNZ et al., 2002).

A fixação da molécula do corante à fibra é realizada através de reações químicas, geralmente em solução aquosa, e envolvem basicamente as ligações iônicas, covalentes, interações de van de Waals e de hidrogênio. (GARATINI; ZANONI, 2000).

Os corantes usados para tingimento da fibra podem ser classificados pelos grupos cromóforos presentes na molécula, como antraquinona, azo, nitro, entre outros (EICHLEROVÁ; HOMOLKA; NERUD, 2007), ou pelo método de fixação à fibra têxtil, tais como, reativos, diretos, azóicos, ácidos, à cuba, de enxofre, dispersivos, pré-metalizados e branqueadores (MECHICHI; MHIRI; SAYADI, 2006). Cerca de 60% dos corantes utilizados em indústrias têxteis são corantes azos, que se caracterizam pelo grupo -N=N- ligado a sistemas aromáticos (Figura 1).



**Figura 1.** Estrutura química de um corante contendo a função azo como grupo cromóforo.

Os corantes diretos caracterizam-se como compostos solúveis em água capazes de tingir fibras de celulose (algodão, viscose, etc.) através de interações de van der Waals.

Os corantes azóicos são compostos coloridos, insolúveis em água, que são realmente sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento.

Os corantes ácidos correspondem a um grande grupo de corantes aniônicos contendo de um a três grupos sulfônicos. Estes grupos substituintes ionizáveis tornam o corante solúvel em água, e têm vital importância no método de aplicação do corante em fibras protéicas (lã, seda) e em fibras de poliamida sintética.

Os corantes à cuba são baseados nos índigos, tioindigóides e antraquinóides. Quando aplicados são praticamente insolúveis em água, porém durante o processo de tintura eles são reduzidos com ditionito, em solução alcalina, transformando-se em um composto solúvel.

Os corantes de enxofre são corantes que após a aplicação se caracterizam por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos (-S<sub>n</sub>-), os quais são altamente insolúveis em água.

Os corantes dispersivos são insolúveis em água e aplicados em fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas através de suspensões.

Os corantes pré-metalizados são caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao cromóforo azo, permitindo a formação de complexos com íons metálicos.

Os corantes branqueadores são utilizados para diminuir a tonalidade amarelada das fibras têxteis no seu estado bruto que são compostas primariamente por materiais orgânicos.

A classe mais importante de corantes têxteis é a classe dos corantes reativos, pois são os mais utilizados no Brasil para tingimento do algodão (GARATINI; ZANONI, 2000).

### 1.3.1 Corantes Reativos

Os corantes reativos possuem um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas (HARAZONO; NAKAMURA, 2005), com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas (GARATINI; ZANONI, 2000). Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos (HARAZONO; NAKAMURA, 2005).

Esses corantes são particularmente problemáticos porque apresentam pouca fixação na fibra e, aproximadamente, de 10 a 20% do total de corantes usados no processo de tingimento são descartados como efluentes (MURUGESAN et al., 2007; RODRÍGUEZ; PICKARD; VAZQUEZ-DUHALT, 1999).

#### 1.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS

Devido a sua própria natureza, a presença dos corantes é facilmente detectada em efluentes, sendo visíveis mesmo em concentrações baixas (ZHAO; HARDIN, 2007). Este comportamento apresenta vantagens e desvantagens, pois uma pequena quantidade lançada em efluentes aquáticos pode afetar a vida aquática e causar uma acentuada mudança de coloração dos rios, mas pode também ser facilmente detectada pelo público e autoridades que cuidam dos assuntos ambientais. Desse modo, métodos para remoção da cor das águas de rejeito têm recebido enorme atenção nos últimos anos (GUARATINI; ZANONI, 2000). É importante salientar que a remoção da cor é o foco principal do tratamento desses efluentes.

Os tratamentos desses efluentes têxteis são difíceis e ineficientes com processos convencionais porque os corantes apresentam estruturas complexas (GARCÍA-MONTAÑO et al., 2008), natureza sintética, além de serem estáveis à luz e temperatura (EICHLEROVÁ; HOMOLKA; NERUD, 2007). Com isso, a legislação vem exigindo tratamentos eficientes, o que tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias que buscam o melhor e mais adequado tratamento, considerando custos, tempo e eficiência dos processos existentes na reciclagem e eliminação de toxicidade (KAMIDA et al., 2005). Nesses processos de tratamento de efluentes têxteis é importante que seja estudada a degradação dos mesmos em condições (de pH, condutividade, etc.) semelhantes àquelas dos efluentes que são descartados. Ou seja, são necessários estudos laboratoriais reproduzindo as condições encontradas nas indústrias de forma que a metodologia possa vir a ser aplicada (CATANHO; MALPASS; MOTHEO, 2006).

Há três formas básicas de tratamento para os efluentes têxteis: físicos, químicos e biológicos (KAMIDA et al., 2005).

Diferentes métodos físico-químicos têm sido usados na remoção da cor de efluentes têxteis nos últimos 20 anos, apesar de possuírem uso limitado e alto custo operacional (SHEDBALKAR; DHANVE; JADHAV, 2008). Os métodos físico-químicos de tratamento de efluentes incluem diferentes métodos de precipitação (coagulação, floculação, decantação) (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004), adsorção em carvão ativado (SLOKAR; MARECHAL, 1998) e biosorção (AKAR et al., 2008). O método físico-químico mais comum para a remoção de corantes é a adsorção em carvão ativado, que é adequado para alguns tipos de efluentes, mas ineficiente para outros, além de ser um método caro (ROBINSON et al., 2001).

Os tratamentos químicos são aqueles em que produtos químicos são necessários para a descoloração de águas residuais, e incluem redução (GHOREISHI; HAGHIGHI, 2003), processos oxidativos (GARCÍA-MONTAÑO et al., 2008), métodos complexométricos e eletroquímicos (KÖRBAHTI, 2007), troca iônica e neutralização (SLOKAR; MARECHAL, 1998). Dentre os métodos químicos para descoloração de efluentes têxteis, os processos oxidativos são os mais comuns, incluindo reagentes de Fenton e fotoquímica (na presença de  $H_2O_2$  ou  $TiO_2$ ) (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004), e ocorrem a partir da clivagem do anel aromático da molécula do corante (ROBINSON et al., 2001).

Os tratamentos biológicos diferem de acordo com a presença (aeróbico) (GARCÍA-MONTAÑO et al., 2008) ou ausência (anaeróbico) (SPONZA; ISIK, 2004) de oxigênio. A degradação biológica é de grande utilidade, pois não tem custo elevado (ROMERO et al., 2006). O sucesso dos tratamentos biológicos para remoção de cor de efluentes depende da utilização de microrganismos que

descolorem efetivamente corantes sintéticos de diferentes estruturas químicas (MACHADO et al., 2006). Atualmente, uma extensa pesquisa está focada em encontrar biomassas microbianas que atendam esse requisito, que possuam baixo custo e que sejam úteis para a remoção de corantes em grandes volumes de água contaminada (SHEDBALKAR; DHANVE; JADHAV, 2008).

#### 1.4.1 Tratamento Microbiológico

Apesar de existir uma grande variedade de tratamentos de efluentes têxteis, o tratamento biológico ainda é visto como uma solução atraente por apresentar baixo custo no processo, além de não ser agressivo ao meio ambiente (MCMULLAN et al., 2001).

Na bioremediação podem ser empregados diferentes microrganismos, incluindo bactérias e fungos, pois eles são fáceis de manipular, tem velocidade de crescimento rápida e alta capacidade de adaptação (SHEDBALKAR; DHANVE; JADHAV, 2008). A habilidade das bactérias para metabolizar corante azo tem sido investigada por numerosos grupos de pesquisadores (ROBINSON et al., 2001).

Estudos de biotecnologia mostraram que os fungos basidiomicetos que degradam a lignina são eficientes na degradação de vários compostos, incluindo os corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (ZHAO; HARDIN, 2007). Os fungos basidiomicetos denominados fungos “da podridão branca da madeira” têm sido apontados como eficientes na descoloração de efluentes têxteis (KAMIDA et al., 2005), pois os mesmos têm a habilidade não só de descolorir, mas também de degradar e mineralizar vários corantes têxteis (MACHADO et al., 2006).

### 1.4.2 Fungos de Podridão Branca

Os fungos de podridão branca é um grupo heterogêneo de organismos capazes de degradar a lignina bem como outros compostos (EICHLEROVÁ; HOMOLKA; NERUD, 2007). Pertencem a esse grupo, por exemplo, os fungos *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma spp* (ZHAO; HARDIN; HWANG, 2006), *Schizophyllum commune*, *Ganoderma lucidum* (ASGHER et al., 2008), *Irpex lacteus* (SVOBODOVÁ et al., 2008), *Corioloopsis polyzona*, *Perenniporia ochroleuca*, *Perenniporia tephropora*, *Trametes versicolor* (VANHULLE et al., 2008), *Pycnoporus sanguineus* (TROVASLET et al., 2007), *Dichomitus squalens*, *Daedalea flavida*, *Irpex flavus* (CHANDER; ARORA, 2007), entre outros. Dessa forma, a possibilidade de usar esses fungos para descolorir efluentes contaminados tem recebido muita atenção já que tais fungos produzem enzimas lignolíticas (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004) que têm a habilidade de degradar uma ampla classe de poluentes, como, por exemplo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), fenóis clorados, bifenil policlorado, dioxinas, pesticidas e principalmente corantes (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003; KIRBY; MARCHANT; MCMULLAN, 2000).

O fungo de podridão branca *Ganoderma* apresenta uma grande capacidade em produzir a enzima lacase (REVANKAR; LELE, 2007; SILVA; MELO; OLIVEIRA, 2005) e é eficiente na degradação de corantes têxteis como, por exemplo, o Remazol Brilliant Orange 3R (REVANKAR; LELE, 2007), Remazol Brilliant Blue R (SILVA; MELO; OLIVEIRA, 2005), Remazol Brilliant Yellow 3GL (ASGHER et al., 2006), Solar Golden Yellow R (ASGHER et al., 2008).

O mecanismo de descoloração de corantes poliméricos por fungos da podridão branca envolve as enzimas lignina peroxidases (LiPs), as manganês peroxidases (MnPs) (HARAZONO; NAKAMURA, 2005) e as lacases (ZHAO;



HARDIN, 2007). Entretanto, estes fungos diferem entre si na habilidade e capacidade de degradar corantes com base nas diferenças qualitativas e quantitativas dessas enzimas (MACHADO et al., 2006).

#### 1.4.3 Enzimas Lignolíticas

As enzimas são proteínas que agem como catalisadores biológicos e diminuem a energia de ativação das reações. Elas podem operar em um amplo intervalo de pH (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004) e em temperatura moderada e são ativas na presença de solventes orgânicos (ATKINS; DE PAULA, 2006).

As enzimas produzidas pelos fungos de podridão branca têm sido muito utilizadas para bioremediação de poluentes recalcitrantes, como os corantes têxteis, devido ao potencial que essas enzimas têm em degradar esses compostos (ZHAO; HARDIN; HWANG, 2006; SILVA; MELO; OLIVEIRA, 2005), além de ter baixo custo energético no processo, serem fáceis de controlar e ter pouco impacto nos ecossistemas (PALA; TOKAT, 2002; MICHNIEWICZ et al., 2008). Essas enzimas lignolíticas são muito utilizadas na degradação de corantes de indústrias têxteis e de branqueamento de papel (SILVA; MELO; OLIVEIRA, 2005).

Na degradação de corantes sintéticos têm sido usadas as enzimas manganês peroxidase e lignina peroxidase *in vitro*. Muitos estudos têm focado a capacidade da lacase em degradar corantes e têm mostrado que essas enzimas são, na verdade, as enzimas mais importantes de muitos fungos de podridão branca (SVOBODOVÁ et al., 2008), pois pertencem ao grupo de enzimas oxidativas que catalisam a oxidação de compostos fenólicos, polifenóis, aminas aromáticas e algumas

substâncias não-fenólicas (MECHICHI; MHIRI; SAYADI, 2006; MURUGESAN et al., 2007; TAVARES et al., 2009; PALMIERI; CENNAMO; SANNIA, 2005).

O interesse em usar a lacase como potencial biocatalisadores industriais tem aumentado, em especial após a descoberta da capacidade dela oxidar a lignina em compostos recalcitrantes não fenólicos (MURUGESAN et al., 2007; MICHNIEWICZ et al., 2008). Essa característica tem sido útil para resolver uma série de problemas biotecnológicos, todos eles relacionados à degradação química ou modificação de compostos estruturalmente diversos, quer se trate de xenobióticos, ou compostos aromáticos que ocorrem naturalmente (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003). A lacase está sendo muito usada, atualmente, na mineralização (MICHNIEWICZ et al., 2008), desintoxicação (TROVASLET et al., 2007) e descoloração (WONG; YU, 1999; MECHICHI; MHIRI; SAYADI, 2006; RODRÍGUEZ; PICKARD; VAZQUEZ-DUHALT, 1999) de corantes.

### **1.5 DETERMINAÇÃO DE CORANTES EM EFLUENTES**

Um dos mais importantes problemas na química analítica é a estimativa do número e concentração das espécies em misturas através de espectros eletromagnéticos ou cromatogramas (PERALTA-ZAMORA et al., 1998). Diferentes métodos têm sido usados para a determinação de misturas de corantes em diferentes matrizes. Os métodos analíticos geralmente utilizados para determinação quantitativa de corantes em misturas podem ser: espectrofotometria UV-Vis (GARCÍA-MONTAÑO et al., 2008) cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (AL-DEGS et al., 2008), cromatografia gasosa associada com espectrometria de massa (ZHAO; HARDIN, 2007) e eletroforese capilar (VANHULLE et al., 2008). Com

exceção da espectrofotometria UV-Vis, estes métodos necessitam de instrumentos sofisticados e conseqüentemente possuem um custo operacional elevado.

Os métodos cromatográficos são bastante eficientes na análise de multi-elementos, mas necessitam equipamentos caros e as análises são demoradas.

A determinação espectrofotométrica UV-Vis é preferível, pois possibilita rapidez na análise, alta precisão e reprodutibilidade para matrizes complexas usando procedimentos relativamente simples e econômicos quando comparados a outras técnicas (SAHIM; DEMIR; GÜÇER, 2007).

Esse método está baseado na medida da transmitância ( $T$ ) ou absorvância ( $A$ ) de soluções contidas em cubetas transparentes, tendo caminho óptico de  $b$  cm. Dessa forma a concentração de um analito absorvente está relacionada linearmente à absorvância, sendo expressa a partir da Lei de Beer (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002):

$$A = -\log T = \log \frac{P_o}{P} = \epsilon bc \quad (1)$$

Em que  $P_o$  é a energia radiante,  $P$  a energia transmitida,  $c$  a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $b$  o caminho óptico (cm) e  $\epsilon$  a absorvidade molar ( $\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

A determinação espectrofotométrica de misturas de corantes orgânicos é um problema muito complexo em química analítica e tem sido objeto de numerosos estudos quimiométricos devido às interferências espectrais, que resultam em bandas de absorção amplamente sobreposta (NEVADO; FLORES; LLERENA, 1998). Nessas condições de determinação, o método convencional de calibração univariada é inviável, devido à contribuição de sinais de outras espécies na absorção da amostra (PERALTA-ZAMORA et al., 1998).

## 1.6 QUIMIOMETRIA

Nos últimos anos, com o desenvolvimento de métodos analíticos instrumentais, tem sido muito usadas técnicas estatísticas como ferramenta para solucionar problemas cada vez mais complexos. São extraídas informações a fim de identificar e quantificar as espécies químicas presentes em uma grande variedade de amostras, auxiliando na interpretação da grande quantidade de dados obtidos pelos métodos instrumentais. Surgiu assim a Quimiometria que é uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada, que pode ser definida como:

“Uma área da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar procedimentos experimentais de forma otimizada, para fornecer o máximo de informação química relevante com a análise dos dados obtidos e para obter conhecimentos sobre sistemas químicos” (HOPKE, 2003).

A resolução espectrofotométrica de misturas de componentes com espectros parcialmente sobrepostos tem sido objeto de muitos estudos quimiométricos (NEVADO; FLORES; LLERENA, 1998). Diferentes modelos matemáticos podem ser aplicados aos dados analíticos para obter os parâmetros do modelo e aplicar esse modelo para estimar a concentração da amostra. Diversos trabalhos descrevem a aplicação de procedimentos analíticos para determinação e quantificação de corantes em várias matrizes, como os efluentes industriais (AL-DEGS et al., 2008).

### 1.6.1 Análise das Componentes Principais (PCA)

A Análise das Componentes Principais tem como objetivo reduzir as variáveis originais, gerando uma nova representação destas variáveis através das

componentes principais (KOKOT et al., 1997). O começo da análise de dados multivariados é uma matriz de dados  $X$ , onde as  $n$  linhas são denominadas objetos que correspondem às amostras e as  $p$  colunas são denominadas variáveis que correspondem às medidas feitas nos objetos (Figura 2) (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987).

$$X = \begin{pmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1p} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2p} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{np} \end{pmatrix}$$

**Figura 2.** Matriz  $X$  contendo  $n$  linhas e  $p$  colunas.

A ACP constitui a base para a análise dos dados multivariados e oferece uma aproximação de um conjunto de dados, uma matriz de dados,  $X$ , em termos do produto de duas matrizes menores,  $T$  e  $P'$ . Essas matrizes menores relacionam os dados essenciais da matriz  $X$ .

$$X = TP' + E \quad (2)$$

em que  $T$  é a matriz dos escores,  $P'$  é a matriz transposta dos loadings e suas colunas são combinações lineares das colunas originais de  $P$  e  $E$  é a matriz dos resíduos.

$$\begin{array}{c} p \\ \boxed{X} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} m \\ \boxed{T} \\ n \end{array} \begin{array}{c} p \\ \boxed{P} \\ m \end{array} + \begin{array}{c} p \\ \boxed{E} \\ n \end{array}$$

**Figura 3.** Relação da matriz  $X$  com o produto das matrizes menores  $T$  e  $P$ .

A primeira CP é uma combinação linear das variáveis originais que descrevem a máxima variância contida no conjunto de dados. Quando toda variação no conjunto de dados não puder ser descrita usando apenas uma CP, uma segunda componente, ortogonal a primeira, pode ser encontrada sendo definida como a máxima variância entre todas as componentes que não estão correlacionadas com a primeira CP e assim sucessivamente (CARVALHO et al., 2006).

### 1.6.2 Calibração Multivariada

Dentro da química analítica e áreas relacionadas, o campo da calibração tem evoluído para se tornar uma disciplina própria, devido ao grande avanço na instrumentação e à crescente disponibilidade dos computadores nos laboratórios químicos. A calibração na química analítica é o procedimento que relaciona as respostas do instrumento à concentração da espécie de interesse, denominada analito (THOMAS, 1994). O processo consiste nas etapas de calibração e previsão. A etapa de calibração consiste na investigação das características de um método de análise ou instrumento na tentativa de encontrar o melhor modelo para sua atuação, sendo o modelo uma relação  $Y = f(X)$  entre dois grupos de variáveis, frequentemente chamados de dependente  $Y$  e independente  $X$ . As medidas instrumentais são então, obtidas de várias amostras para determinar a quantidade

de analito em cada amostra. O conjunto de dados desta etapa é chamado de conjunto de calibração. Na etapa de previsão, um segundo conjunto de medidas é obtido para uma ou mais amostras e junto com os coeficientes de regressão é utilizado para prever as concentrações das referidas amostras, isto é, os valores das variáveis dependentes. Esse conjunto de amostras é chamado de conjunto de previsão (GELADI; KOWALSKI, 1986).

Uma série de técnicas estatísticas tem sido utilizada para se desenvolver metodologias multivariadas e para extrair informações dos espectros e cromatogramas, com o objetivo de identificar as espécies presentes e determinar quantitativamente as concentrações de algumas ou todas elas. A aplicabilidade de cada metodologia depende do conjunto de dados submetidos a análise (SCARMINIO et al., 1998).

As vantagens da análise de multicomponentes usando calibração multivariada é a velocidade na determinação das concentrações do analito, evitando a separação preliminar (NEVADO; FLORES; LLERENA, 1998).

Existem vários métodos estatísticos utilizados nos processos de calibração para analisar espectros de misturas como a Regressão pelos Mínimos Quadrados Clássicos (CLS), Regressão Linear Múltipla (MLR) ou Regressão pelo Inverso dos Mínimos Quadrados (ILS), Regressão nas Componentes Principais (PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Entre estes, a regressão por mínimos quadrados parciais e a regressão nas componentes principais (SAHIM; DEMIR; GÜÇER, 2007) têm sido usadas com sucesso em determinações complexas (HOPKE, 2003).

A aplicação de métodos quimiométricos, particularmente regressão nas componentes principais e regressão por mínimos quadrados parciais para dados

químicos multivariados estão se tornando mais difundidos devido à disponibilidade de dados espectroscópicos digitalizados e software comercial para computadores (NEVADO; FLORES; LLERENA, 1998).

#### 1.6.2.1 Regressão por mínimos Quadrados parciais (PLS)

Este método consiste em estimar simultaneamente as componentes principais em ambas as matrizes  $X$  e  $Y$ . O modelo consiste em uma regressão entre os escores das matrizes  $X$  e  $Y$  (SCARMINIO, 1989). Isto é realizado usando as colunas da matriz  $Y$  para estimar os fatores de  $X$ . Do mesmo modo, as colunas de  $X$  são usadas para estimar os fatores de  $Y$ . O PLS pode ser considerado como consistindo de relações externas que podem ser descrita como (GELADI; KOWALSKI, 1986):

$$X = TP + E \quad (3)$$

$$Y = UQ + F \quad (4)$$

Em que os elementos de  $T$  e  $U$  são chamados de escores de  $X$  e  $Y$ , respectivamente, e os elementos de  $P$  e  $Q$  são chamados de loadings. As matrizes  $E$  e  $F$  são os erros associados à modelagem com o modelo PLS.

Graficamente tem-se:



$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{ccc}
 \begin{array}{|c|} \hline X \\ \hline \end{array} & = & \begin{array}{|c|} \hline T \\ \hline \end{array} \begin{array}{|c|} \hline P \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline E \\ \hline \end{array} \\
 \begin{array}{ccc}
 n & & n
 \end{array}
 \end{array}
 \end{array}$$
  

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{ccc}
 \begin{array}{|c|} \hline Y \\ \hline \end{array} & = & \begin{array}{|c|} \hline U \\ \hline \end{array} \begin{array}{|c|} \hline Q \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline F \\ \hline \end{array} \\
 \begin{array}{ccc}
 n & & n
 \end{array}
 \end{array}
 \end{array}$$

**Figura 4.** Relação das matrizes  $X$  e  $Y$  com os produtos das matrizes menores  $T$  e  $P$  e  $U$  e  $Q$ , respectivamente.

Os métodos PCR e PLS são considerados mais eficientes para lidar com ruídos experimentais, colinearidades e não linearidades. Um ponto importante no método PLS é o design completo das amostras de calibração (matriz de calibração) que compreende todas as possíveis interferências que influenciam nos espectros das amostras de predição. Isso inclui as interações entre os componentes a serem determinados e a influência de componentes de amostras naturais nos espectros do analito (CARVALHO et al., 2006).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Estudar os parâmetros cinéticos da biodegradação individual e simultânea de cada corante na mistura do efluente utilizando o método de calibração multivariada, PLS.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Estudar os processos de degradação microbiológica, pelo fungo *Ganoderma spp*, dos corantes Amarelo Procion, Vermelho Procion e Azul Procion (Grupo I) e Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP (Grupo II) em efluentes obtidos em escala laboratorial.

- Aplicar a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) usando a espectrofotometria UV-Vis para a análise quantitativa individual e simultânea dos corantes em amostras de efluentes obtidos em escala laboratorial.

- Encontrar as constantes de velocidade e as energias de ativação das reações de biodegradação para cada corante nas misturas.

### 3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Os corantes e reagentes industriais utilizados neste trabalho foram cedidos por indústrias têxteis da região de Maringá (PR) e Londrina (PR).

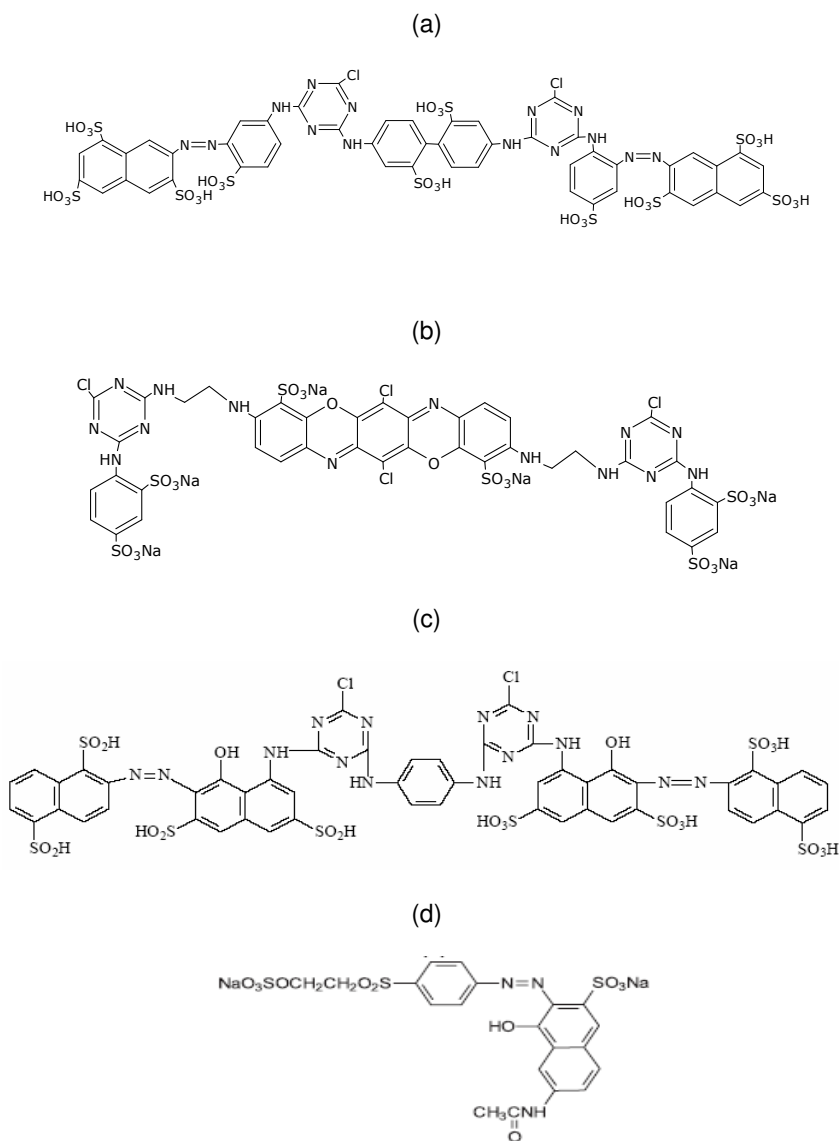
Os reagentes e soluções empregados para o preparo do meio de cultivo eram de grau analítico e os reagentes usados como fase móvel, na análise cromatográfica, de grau HPLC.

As massas dos corantes foram medidas utilizando balança analítica (Adventurer OHAUS) e dos reagentes, balança semi-analítica (Gehaka BG 2000).

Todas as soluções utilizadas para preparação dos efluentes e soluções dos corantes foram preparadas com água destilada e as soluções para análise cromatográfica foram preparadas com água ultrapura (Millipore Plus).

#### 3.1 CORANTES TÊXTEIS

Os corantes reativos utilizados neste estudo foram: Amarelo Procion HE4R 100% (seu nome genérico no Colour Index (CI) é Reactive Yellow 84), Azul Procion HEGN 125% (CI Reactive Blue 198), Vermelho Procion HE7B (CI Reactive Red 141), Remazol Brilliant Orange 3R (CI Reactive Orange 16), Azul Remazol RR (CI Blue RR) e Azul Remazol R ESP. As estruturas dos corantes (a) Amarelo Procion HE4R 100%, (b) Azul Procion HEGN 125%, (c) Vermelho Procion HE7B e (d) Remazol Brilliant Orange 3R são apresentadas na Figura 5.



**Figura 5.** Estrutura química dos corantes (a) Amarelo Procion HE4R 100%, (b) Azul Procion HEGN 125%, (c) Vermelho Procion HE7B e (d) Remazol Brilliant Orange 3R.

Os corantes Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP não possuem estruturas moleculares conhecidas. Os corantes da linha Procion possuem como grupo reativo o grupo funcional mono ou diclorotriazinílicos e nos da linha Remazol o grupo funcional é o vinil sulfônico.

### 3.2 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado no trabalho foi o fungo filamentososo, da classe dos basidiomicetos, *Ganoderma spp*, isolado pela Profa. Dra. Suely Mayumi Obara Doi, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e mantido em meio de ABD (ágar-batata-dextrose) a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

O fungo *Ganoderma spp* foi transferido do meio de manutenção para uma placa de Petri contendo meio de ABD, sendo mantido em estufa a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 10 (dez) dias.

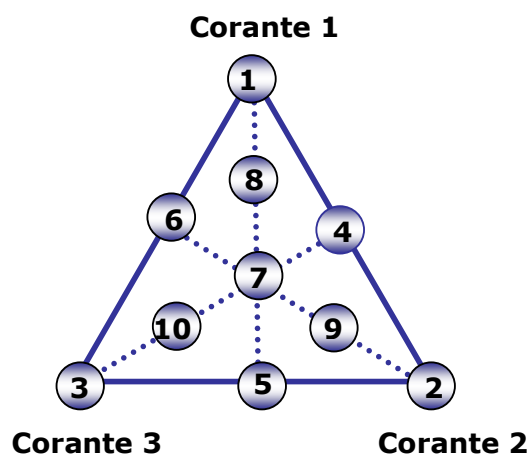
### 3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE DOS CORANTES

Para cada corante do Grupo I e do Grupo II, foram preparadas soluções aquosas estoques, dissolvendo 0,1000 g do corante em água destilada para obtenção de 100,00 mL de solução, obtendo, assim, uma solução de concentração  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As proporções das misturas dos corantes para a obtenção da curva de calibração foram determinadas seguindo o planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex. Este planejamento é representado por um triângulo equilátero (Figura 6), que equivale a uma mistura de três componentes, no qual os vértices (1), (2) e (3) correspondem às soluções de corantes puros, as arestas (4), (5) e (6) às

misturas binárias de mesma proporção e o ponto central (7) à uma mistura ternária de mesma proporção. Misturas ternárias axiais (8), (9) e (10) foram incluídas no planejamento, totalizando 10 composições diferentes de misturas das soluções dos corantes (Tabela 1). Em todas as preparações foram usados os mesmos reagentes e nas mesmas proporções que as indústrias de tingimento têxtil normalmente usam, tornando os dados cinéticos obtidos mais próximos daqueles que se obteriam usando efluentes reais.



**Figura 6.** Planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex com três pontos axiais.

**Tabela 1.** Volumes de soluções estoque dos corantes adicionados às misturas.

Misturas	Corante 1	Corante 2	Corante 3
1	3 mL	0	0
2	0	3 mL	0
3	0	0	3 mL
4	1,5 mL	1,5 mL	0
5	0	1,5 mL	1,5 mL
6	1,5 mL	0	1,5 mL
7	1 mL	1 mL	1 mL
8	2 mL	0,5 mL	0,5 mL
9	0,5 mL	2 mL	0,5 mL
10	0,5 mL	0,5 mL	2 mL

### 3.5 PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

#### 3.5.1 Grupo 1: Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion

As misturas de corantes da curva de calibração foram preparadas em 100 mL de água destilada, misturando-se respectivamente, 5 gotas de Quimerol 535, soluções dos corantes, Amarelo Procion 1000 mg L<sup>-1</sup> (corante 1), Azul Procion 1000

mg L<sup>-1</sup> (corante 2) e Vermelho Procion 1000 mg L<sup>-1</sup> (corante 3) seguindo as proporções em volumes conforme o planejamento experimental (Tabela 1), 1 gota de Quimerol 535, 3 g de sal refinado (NaCl) e 1 g de barrilha leve (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

Em seguida, 23,25 mL dessas misturas da curva de calibração foram adicionadas a erlenmeyers de 125 mL com 0,5 ml de meio de Vogel e 0,05 g de extrato de levedura. O pH de cada mistura do conjunto de calibração foi ajustado para 5,0 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M e 0,1M e NH<sub>4</sub>OH 1M e 0,1M (Hanna instruments, HI 9321). Todos os frascos de Erlenmeyers foram autoclavados à temperatura de 121 °C por 20 minutos. Uma solução de glucose 10% foi preparada e autoclavada separadamente do meio de cultivo e 1,25 mL dessa solução foram adicionados de forma estéril a cada frasco das misturas da curva de calibração em uma câmara de fluxo laminar.

Para a determinação das concentrações usando curvas analíticas a partir das medidas de absorvância, nos comprimentos de onda de máxima absorção 412 nm, 544 nm e 627 nm, para os corantes Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion, respectivamente, foram construídas curvas de calibração usando-se concentrações de 24,185 mg L<sup>-1</sup> à 4,031 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.5.2 Grupo 2: Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP.

Para os corantes do Grupo 2 foram realizados os mesmos procedimentos para a preparação das soluções de misturas dos corantes usadas para a obtenção da curva de calibração descrito no item 3.5.1. Para esse grupo as misturas da curva



de calibração foram realizadas em triplicata. Para a curva de calibração desse grupo, o corante 1 corresponde ao Remazol Brilliant Orange 3R, o corante 2 ao Azul Remazol RR e o corante 3 ao Azul Remazol R ESP.

### **3.6 PREPARO DO EFLUENTE EM ESCALA LABORATORIAL PARA BIODEGRADAÇÃO**

#### **3.6.1 Grupo 1: Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion**

Para o preparo do efluente em escala laboratorial adicionou-se 6 gotas de Quimerol 535, 0,05 g de cada corante (Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion), 3 g de sal refinado (NaCl) e 1 g de barrilha leve ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) em 100 mL de água destilada.

Foram transferidos 12,5 mL desse efluente para cada erlenmeyer de 125 mL e adicionado 10,75 mL de água destilada, 0,5 mL de meio de Vogel e 0,05g de extrato de levedura. O pH do meio foi ajustado para 5,0 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1M e 0,1M e  $\text{NH}_4\text{OH}$  1M e 0,1M (Hanna instruments, HI 9321). Todos os frascos de erlenmeyers foram autoclavados à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Uma solução de glucose 10% foi preparada e autoclavada separadamente do meio de cultivo e 1,25 mL foram adicionados de forma estéril a cada frasco de erlenmeyer contendo o efluente, em uma câmara de fluxo laminar.

Após a adição da glucose foram inoculados três discos de micélio fúngico de 0,5 cm de diâmetro, preparados de acordo com o item 3.2. Os meios foram colocados em incubadora rotatória orbital (Cientec CT-712) à temperatura de 28 °C

sob agitação de 180 rpm, e permaneceram incubados durante 0, 12, 24, 48 e 72 horas.

Após cada tempo os efluentes foram retirados da incubadora, centrifugados (Centrífuga Presvac DCS-16-RV) por 20 min com velocidade equivalente a 1607,9 g e filtrados à vácuo com membrana de éster de celulose com poro de 0,45 µm (Millipore). Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para o estudo cinético.

Foi preparado um efluente controle seguindo o mesmo procedimento descrito acima, mas sem a adição dos três discos de micélio fúngico.

### 3.6.2 Grupo 2: Remazol Brilliant Orange, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP

Para os corantes do Grupo 2 foi realizado o mesmo procedimento para a preparação dos efluentes para biodegradação pelo fungo *Ganoderma spp* descrito no item 3.6.1.

Os efluentes preparados com os corantes do Grupo 2 foram mantidos em incubadora rotatória orbital sob agitação de 180 rpm, a 25°C, 28°C e 31°C, incubados por 0, 24, 49, 78, 143, 175, 215, 246 e 335 horas.

Após cada tempo os efluentes foram retirados da incubadora, centrifugados (Centrífuga Presvac DCS-16-RV) por 20 min com velocidade equivalente a 1607,9 g e filtrados à vácuo com membrana de éster de celulose com poro de 0,45 µm (Millipore). Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para o estudo cinético e determinação da atividade da enzima lacase. Os precipitados depositados nos tubos de fundo cônico foram empregados para determinação de biomassa por gravimetria.

Foi preparado um efluente controle seguindo o mesmo procedimento descrito acima, mas sem a adição dos três discos de micélio fúngico.

De acordo com Kunz; Reginatto; Durán (2001), quando os micélios fúngicos entram em contato com o efluente nas primeiras horas após a inoculação ocorre primeiro a adsorção dos corantes nos micélios para depois de algum tempo começar o processo de biodegradação desses corantes pelas enzimas. Devido a esse fato, utilizou-se o seguinte procedimento: foram adicionados os micélios fúngicos do fungo *Ganoderma spp* ao meio e homogeneizados por 6 (seis) horas para a adsorção do corante, sendo então atribuído o tempo 0 (zero) horas para o início dos estudos cinéticos.

### **3.7 PREPARAÇÃO DO BRANCO**

O branco foi preparado em 100 mL de água destilada, misturando-se respectivamente, 6 gotas de Quimerol 535, 3 g de sal refinado (NaCl), 1 g de barrilha leve ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Para o preparo do meio de cultivo retirou-se 23,25 mL da solução e a esse volume foram adicionados 0,05g de extrato de levedura, 0,5mL do meio de Vogel em um erlenmeyer de 125 mL. O pH da solução foi ajustado para 5,0 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1M e 0,1M e  $\text{NH}_4\text{OH}$  1M e 0,1M. O frasco de Erlenmeyer foi autoclavado à temperatura de 121 °C por 20 minutos e após, de forma estéril em câmara de fluxo laminar, foram adicionados 1,25 mL de solução de glucose esterilizada, obtendo-se um volume final de 25 mL. Este procedimento foi realizado para cada repetição da curva de calibração e efluente.

### **3.8 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA**

Os precipitados depositados nos tubos de fundo cônico, obtidos após a centrifugação e filtração dos meios de cultivo, foram secos em estufa a 70°C para determinação da biomassa por análise gravimétrica.

### **3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE**

A atividade da lacase foi determinada utilizando-se como substrato o 2,6-dimetoxifenol 10 mM (DMP) e como solução enzimática o sobrenadante do meio de cultivo após centrifugação e filtração. O ensaio enzimático foi preparado com 150 µL de tampão McIlvaine (pH 5,0), 200 µL de água destilada, 150 µL de substrato 2,6-dimetoxifenol 10 mM (DMP) e 500 µL de solução enzimática diluída quando necessário. O ensaio foi incubado em banho-maria termostaticado a 50°C por 5 min e as leituras de absorvâncias foram realizadas em 468 nm (espectrofotômetro Femto 700s) (PASZCZYNSKI; HUYNH; CRAWFORD, 1985). O controle da enzima foi preparado com 150 µL de tampão McIlvaine (pH 5,0), 350 µL de água destilada e 500µL de solução enzimática diluída com água destilada 1:10. O controle do substrato foi preparado com 150 µL de tampão McIlvaine (pH 5,0), 700 µL de água destilada e 150 µL de substrato 2,6-dimetoxifenol 10 mM (DMP). As absorvâncias obtidas nos controles da enzima e do substrato foram descontadas nas absorvâncias dos ensaios. Os ensaios enzimáticos foram obtidos para os tempos de biodegradação de 0, 24, 143, 175 e 335 horas para os efluentes dos corantes do Grupo 2. A unidade de atividade da lacase foi definida como o número de µmoles de DMP oxidados por minuto por mL de extrato enzimático nas condições de ensaios descritas através da equação:

$$\frac{U}{mL} = \frac{A}{\varepsilon} \times \frac{1}{V} \times Fd \times \frac{1}{t} \times 1000 \quad (5)$$

Onde:

$\frac{U}{mL}$  = unidade de lacase por mL de substrato

A = absorvância

$\varepsilon$  = coeficiente de extinção molar do substrato (DMP = 10000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

V = volume da enzima utilizado no ensaio (mL)

Fd = fator de diluição

t = tempo de incubação (min)

### 3.10 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis)

Os espectros de absorção UV-Vis (Thermo Scientific Evolution 60) das soluções do conjunto de calibração e do efluente obtido em escala laboratorial foram registrados à temperatura ambiente de 200 a 800 nm utilizando cubeta de quartzo de um centímetro de caminho óptico e utilizando um branco preparado conforme descrito no item 3.7. Para obtenção dos espectros UV-Vis os efluentes foram diluídos com água (1 mL do efluente : 10 mL de solução final).

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para a análise estatística dos dados, utilizando o método da Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), foi usado o programa Parles\_V2. 1A (ROSSEL, 2008).

### 3.12 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A análise cromatográfica (Thermo Electron Corporation Finnigan Surveyor Plus) foi realizada com bomba quaternária e detector de arranjo de fotodiodo (PDA) operando nos comprimentos de onda de 254, 494, 594 e 605 nm. Uma coluna cromatográfica C18 Zorbax ODS com 5  $\mu\text{m}$  de empacotamento (Agilent Technologies, 250 x 4.6 mm) foi utilizada na análise e uma pré-coluna foi instalada para proteger a coluna cromatográfica. Foi empregada na separação uma fase móvel usando o método de gradiente (Tabela 2) com tampão fosfato pH 3,0 / acetonitrila. O Software ChromQuest 4.2 foi usado para o processamento dos dados. O volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$  e o fluxo de 1 mL/min a 25°C na coluna de separação. As amostras para análise foram filtradas em nylon 0,22  $\mu\text{m}$  antes da injeção.

**Tabela 2.** Programa utilizado para passagem da fase móvel usando o método de gradiente.

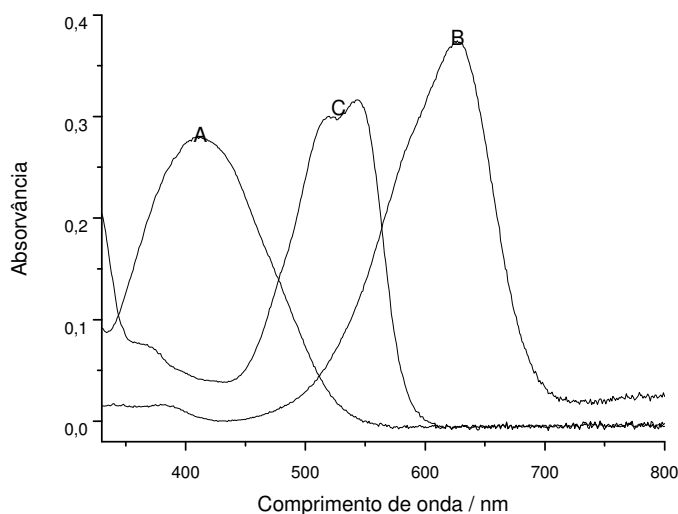
Tempo (min)	Fluxo ( $\text{mL min}^{-1}$ )	% acetonitrila	% tampão fosfato pH 3.0
0.0	1.0	5.0	95.0
20.0	1.0	25.0	75.0
30.0	1.0	40.0	60.0
40.0	1.0	40.0	60.0
45.0	1.0	5.0	95.0

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

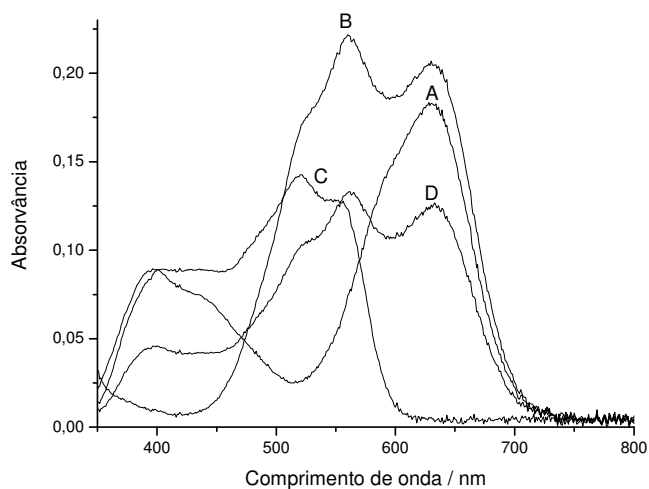
### 4.1 Cálculo das Concentrações, pelo PLS, dos Corantes Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion (Grupo 1)

Os espectros UV-Vis de cada um dos corantes puros são apresentados na Figura 7. Esses corantes apresentam bandas de absorção em 412 nm, 627 nm e 544 nm para o Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion, respectivamente.

Os espectros das misturas da curva de calibração, conforme planejamento experimental descrito no item 3.4, são apresentados na Figura 8. Nesta figura, as letras A-C identificam os espectros das misturas binárias (4, 5 e 6) da curva de calibração e a letra D, o espectro da mistura ternária de mesma proporção (7). Os espectros UV-Vis das 10 misturas da curva de calibração (Figura 1A, em anexo) cujas concentrações das misturas são mostrados na Tabela 1A, em anexo.



**Figura 7.** Espectros de absorção UV-Vis, de 330 a 800 nm, das soluções estoques ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) dos corantes (A) Amarelo Procion, (B) Azul Procion e (C) Vermelho Procion.



**Figura 8.** Espectros de absorção UV-Vis, de 350 a 800 nm, das misturas da curva de calibração (A) mistura 4 (1:1:0), (B) mistura 5 (0:1:1), (C) mistura 6 (1:0:1) e (D) mistura 7 (1:1:1).

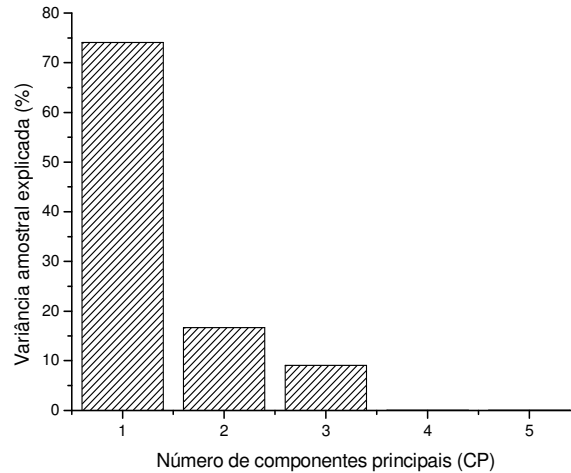
Para a validação do método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) pelo programa PARLES foram calculados os pontos axiais da curva de calibração. Pode-se notar que as concentrações calculadas são muito próximas dos valores experimentais (Tabela 3).



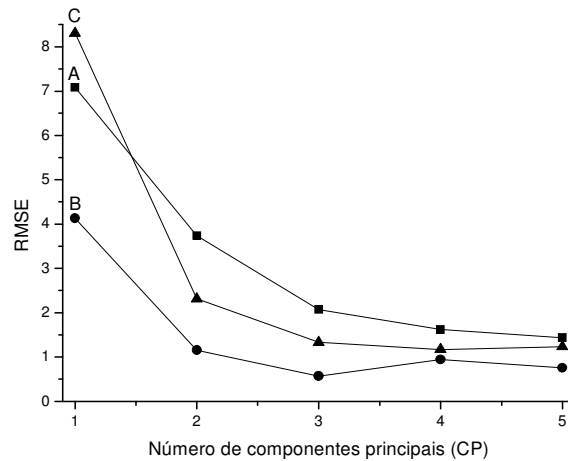
**Tabela 3.** Concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) experimentais e calculadas dos corantes nas misturas 8 (2:1/2:1/2), 9 (1/2:2:1/2) e 10 (1/2:1/2:2) da curva de calibração do Grupo 1, usando 3, 4 e 5 CPs.

Misturas	Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )			
	Experimental	Calculada		
		3 CP	4 CP	5 CP
Amarelo Procion				
Ponto 8	16,12	14,66	15,27	15,66
Ponto 9	4,03	2,66	3,24	3,65
Ponto 10	4,03	2,64	3,57	3,70
Azul Procion				
Ponto 8	4,03	3,89	4,35	4,40
Ponto 9	16,12	15,48	15,93	16,00
Ponto 10	4,03	3,62	3,88	3,81
Vermelho Procion				
Ponto 8	4,03	3,46	3,87	4,55
Ponto 9	4,03	3,28	3,58	4,02
Ponto 10	16,12	15,14	15,55	15,53

Para análise dos dados foram utilizadas 3 componentes principais (CP) que explicaram 99,92% da variância contida nos dados sem perda de informação relevante (Figura 9). O método PLS foi realizada com 3, 4 e 5 CP, sendo que com 3 CP apresentou valores suficientemente baixos de RMSE (raiz quadrada média do erro de previsão) para a execução dos cálculos (Figura 10).



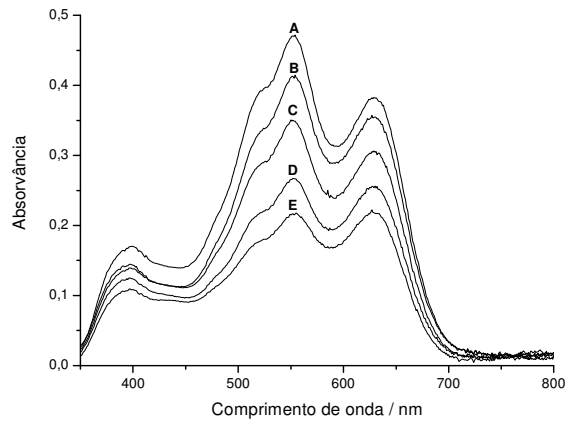
**Figura 9.** Porcentagem de variância explicada em função do número de componentes principais para o Grupo 1 (Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion).



**Figura 10.** Variação do RMSE em função do número de CP para cada corante: (A) Amarelo Procion, (B) Azul Procion e (C) Vermelho Procion.

A Figura 11 mostra os espectros UV-Vis das soluções dos efluentes após o processo de biodegradação nos diferentes tempos. Esses espectros mostram a diminuição da absorvância dos corantes Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion na mistura do efluente com o aumento do período de cultivo, indicando uma

biodegradação significativa dos corantes pelo fungo *Ganoderma spp.* As concentrações dos corantes no efluente calculadas pelo PLS em função do tempo são mostradas na Tabela 4.



**Figura 11.** Espectros UV-Vis do efluente biodegradado pelo fungo *Ganoderma spp* em função do tempo (h): (A) 0, (B) 12, (C) 24, (D) 48 e (E) 72.

**Tabela 4.** Concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) dos corantes no efluente calculadas pelo PLS durante a biodegradação pelo fungo *Ganoderma spp.*

Tempo de biodegradação (horas)	Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )		
	Amarelo Procion	Azul Procion	Vermelho Procion
0 *	20,76	22,33	30,74
12	17,22	20,84	25,99
24	16,97	17,60	22,12
48	15,20	14,71	16,13
72	13,78	12,62	13,00

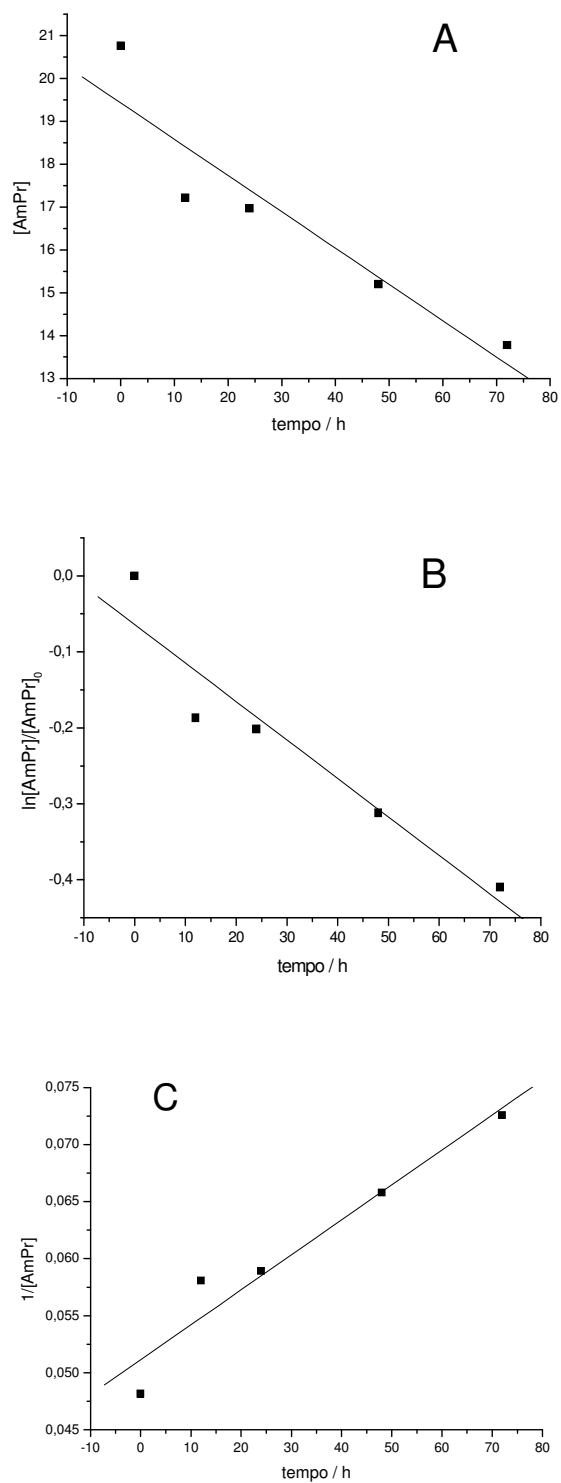
\* 0 hs = 6 hs de incubação

Através das concentrações calculadas pela PLS foi realizado o estudo cinético do processo de biodegradação para encontrar a ordem da reação de descoloração do corante pelo fungo e a constante de velocidade.

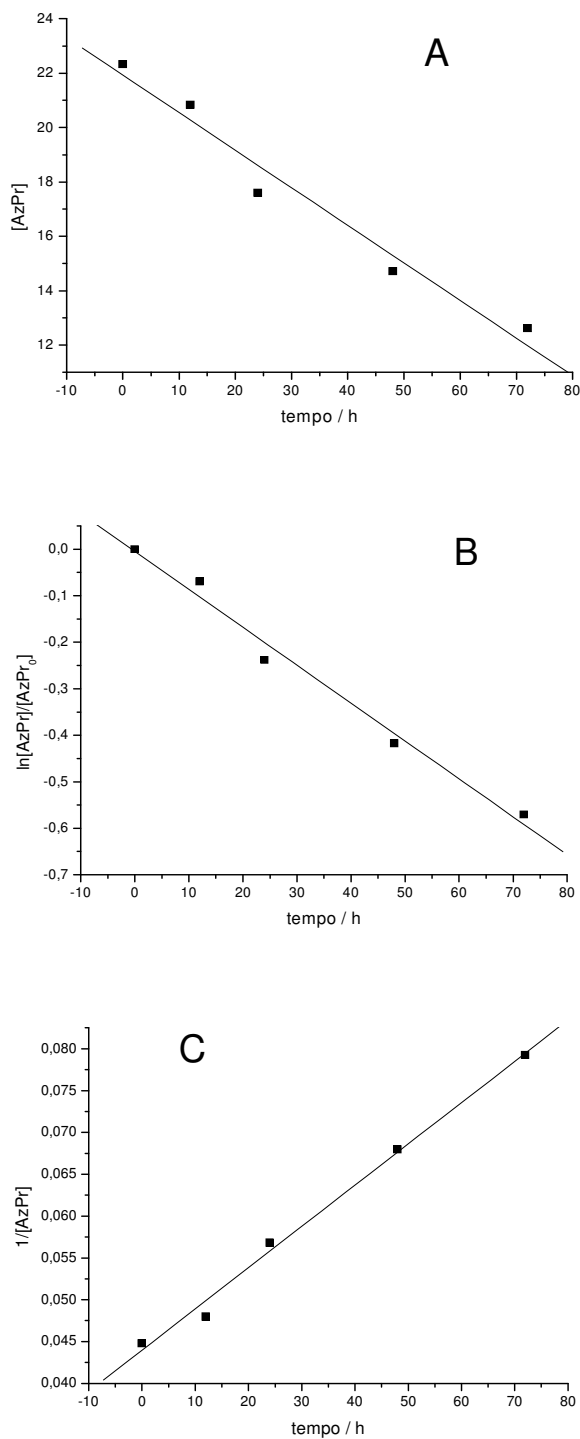
A determinação da ordem de reação foi realizada pelo ajuste da melhor reta obtida entre as equações de velocidade de ordem zero ( $[A]-[A]_0 = -kt$ ), primeira ordem ( $\ln[a]-\ln[A]_0 = -kt$ ) e segunda ordem ( $\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = kt$ ).

Os gráficos cinéticos, obtidos através dos cálculos de concentração pelo PLS, dos corantes Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion, em função do tempo de biodegradação, estão representados nas Figuras 12 a 14.

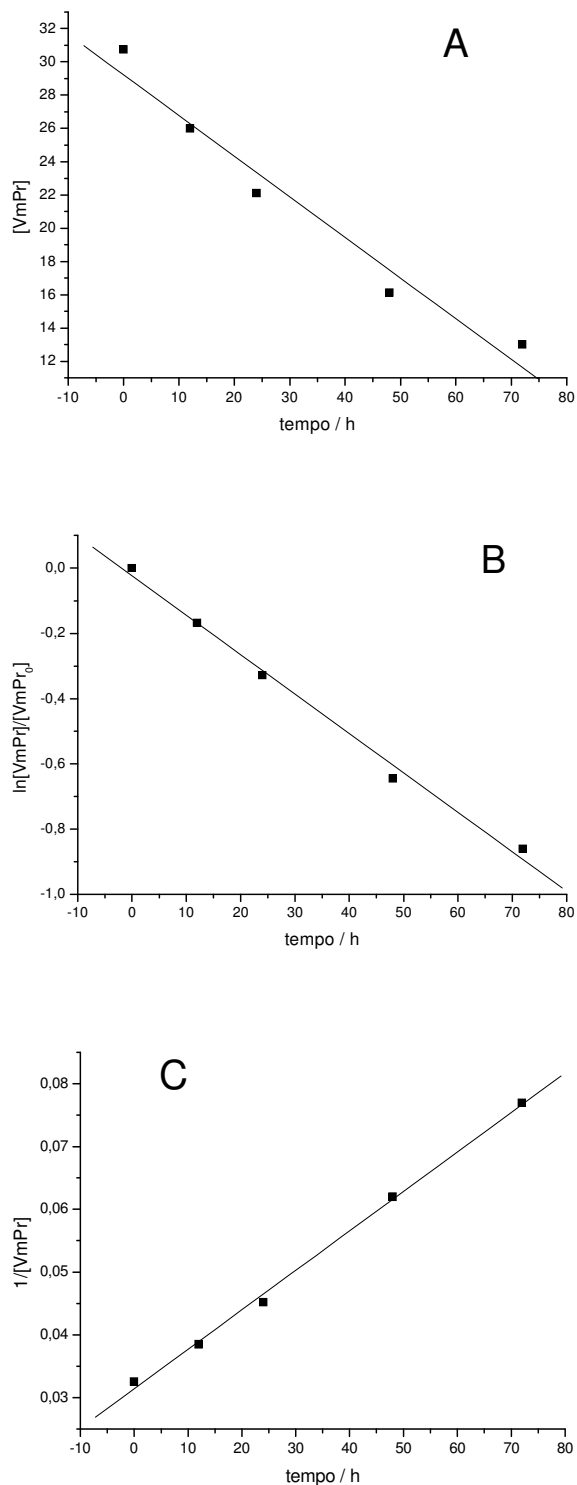
Foi realizado também um cálculo da concentração dos corantes no efluente medindo-se os máximos de absorvância de cada corante e utilizando uma curva de calibração que seguiu a Lei de Beer, obtendo-se as retas  $Y=0,00878X - 0,01867$  com  $R^2=0,996$ ,  $Y=0,01548X + 0,00047$  com  $R^2=0,997$  e  $Y=0,00954X + 0,02161$  com  $R^2=0,997$ , para os corantes Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion, respectivamente. Este estudo foi realizado para efeito de comparação com o método do PLS. As retas obtidas com este método para os corantes Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion em função do tempo de biodegradação estão representadas nas Figuras 2A a 4A, em anexo.



**Figura 12.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C) do corante Amarelo Procion biodegradado no efluente a 28°C usando o método de cálculo de PLS.



**Figura 13.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C) do corante Azul Procion biodegradado a 28°C no efluente usando o método de cálculo de PLS.



**Figura 14.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C) do corante Vermelho Procion biodegradado a 28°C no efluente usando o método de cálculo de PLS.

Os gráficos mostram que as retas obtidas para a equação de primeira e segunda ordem são muito semelhantes e com coeficientes de correlação praticamente iguais (Tabela 5) indicando que a reação tem ordem intermediária entre elas, isto é, fracionária. Este fato indica que o mecanismo de reação é complexo não se enquadrando nos modelos mais simples de catalise enzimática. Isso foi confirmado pelos gráficos de concentração obtidos pela Lei de Beer que não mostraram distinção clara entre uma cinética de primeira ou de segunda ordem, Figura 2A a 4A e Tabela 2A. O valor real das constantes de velocidade deve ser, portanto, um valor intermediário entre os encontrados para a primeira e segunda ordem (Tabela 5).

**Tabela 5.** Parâmetros cinéticos calculados para biodegradação dos corantes do Grupo 1 (Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion), pelo fungo *Ganoderma spp*, a 28°C, utilizando as concentrações obtidas pelo PLS.

Corante	Ordem	Equação da reta	R <sup>2</sup>	k / 10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>
Amarelo Procion	Zero	y = 19,42836-0,08469x	0,932	84,69
	1 <sup>a</sup>	y = -0,06403-0,00506x	0,953	5,06
	2 <sup>a</sup>	y = 0,05114+0,00031x	0,969	0,31
Azul Procion	Zero	y = 21,93017-0,13815x	0,983	138,15
	1 <sup>a</sup>	y = -0,00449-0,00816x	0,992	8,16
	2 <sup>a</sup>	y = 0,04398+0,00049x	0,996	0,49
Vermelho Procion	Zero	y = 29,21647-0,24425x	0,981	244,25
	1 <sup>a</sup>	y = -0,02361-0,01208x	0,996	12,08
	2 <sup>a</sup>	y = 0,03141+0,00063x	0,998	0,63



Os resultados mostraram que o corante Vermelho Procion apresentou maior constante de velocidade do que os outros dois corantes, ou seja, que a velocidade de biodegradação do corante Vermelho Procion pelo fungo *Ganoderma spp* foi mais rápida, seguida do Azul Procion e Amarelo Procion.

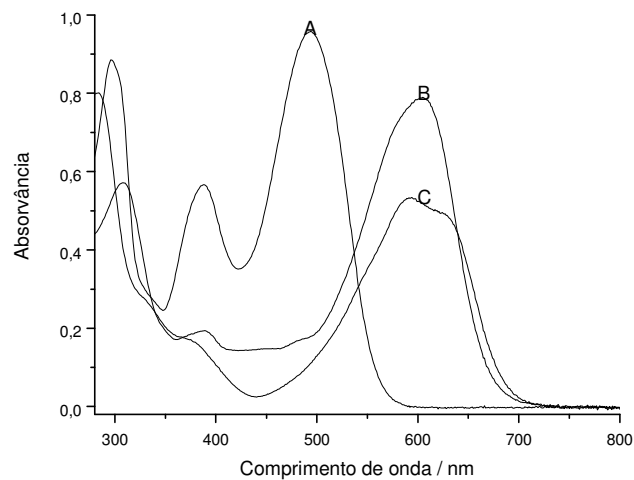
Apesar da biodegradação desses corantes apresentarem baixa constante de velocidade, o que mostra que é uma reação lenta, foi possível utilizar o fungo *Ganoderma spp* para biodegradação de efluentes contaminados com corantes têxteis. Além disso, foi possível quantificar cada corante na mistura dos efluentes utilizando o método PLS e realizar os estudos cinéticos da biodegradação desses corantes pelo fungo, apesar da complexidade do meio nas quais as reações ocorreram.

Verificou-se que a metodologia do PLS obteve valores de constantes de velocidade muito próximos daqueles da metodologia analítica tradicional (univariada) na qual foi necessário fazer a deconvolução das bandas de absorção de cada espectro para se obter os valores de absorvância. Dessa forma a metodologia do PLS se mostrou mais prática e precisa em comparação com a metodologia univariada quando se considera grande número de amostras de efluentes (Tabela 3 comparada com Tabela 3A em anexo).

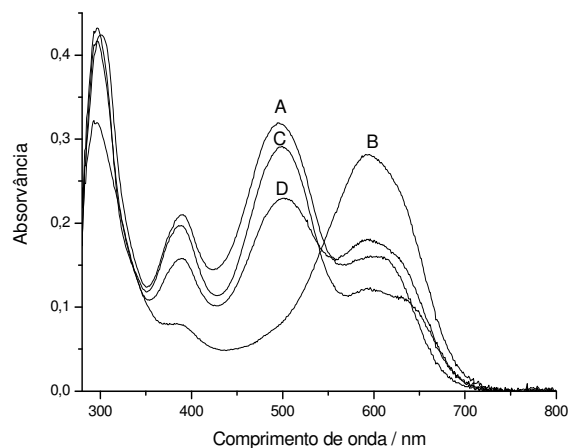
#### 4.2 Cálculo das concentrações dos corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP utilizando o PLS. (Grupo 2)

Os espectros UV-Vis de cada um dos corantes puros são apresentados na Figura 15. É possível observar que os corantes Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP apresentam uma banda de absorção em comum em torno de 600 nm, tornando difícil a análise quantitativa individual desses corantes numa mistura sem utilizar processos de separação.

Os espectros das misturas da curva de calibração, conforme o planejamento experimental descrito no item 3.4, são apresentados na Figura 16. Nesta figura as letras A-C identificam os espectros das misturas binárias (4, 5 e 6) da curva de calibração e a letra D, o espectro da mistura ternária de mesma proporção (7), ou seja, o ponto central.



**Figura 15.** Espectros de absorção UV-Vis de 280 a 800 nm das soluções estoques ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) dos corantes (A) Remazol Brilliant Orange 3R, (B) Azul Remazol RR e (C) Azul Remazol R. ESP.



**Figura 16.** Espectros de absorção UV-Vis, de 280 a 800 nm, das misturas da curva de calibração dos corantes de Grupo 2 (Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP.) (A) mistura 4 (1:1:0), (B) mistura 5 (0:1:1), (C) mistura 6 (1:0:1) e (D) mistura 7 (1:1:1).

Os espectros UV-Vis das 10 misturas da curva de calibração (Figura 5A, em anexo) cujas concentrações são mostrados na Tabela 4A, em anexo, foram registrados de 280 a 800 nm, pois os corantes estudados têm suas bandas de absorção nesse intervalo.

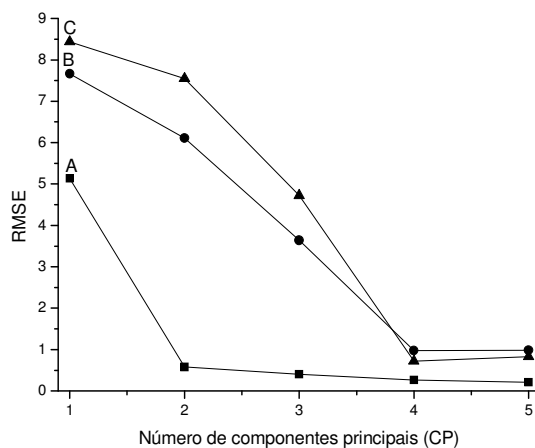
Para a validação do método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), foram calculadas as concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) dos pontos axiais (8, 9 e 10) da curva de calibração e os resultados são apresentados na Tabela 6. Pode-se notar que os valores calculados para 4 componentes principais são bem próximos dos experimentais, diferindo no máximo em 3,47% para o corante Remazol Brilliant Orange 3R, 8,44% para o Azul Remazol RR e 2,23% para o Azul Remazol R. ESP.

**Tabela 6.** Concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) experimentais e calculadas pelo PLS dos corantes nas misturas 8 (2:1/2:1/2), 9 (1/2:2:1/2) e 10 (1/2:1/2:2) da curva de calibração do Grupo 2 (Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP.) usando 3, 4 e 5 componentes principais.

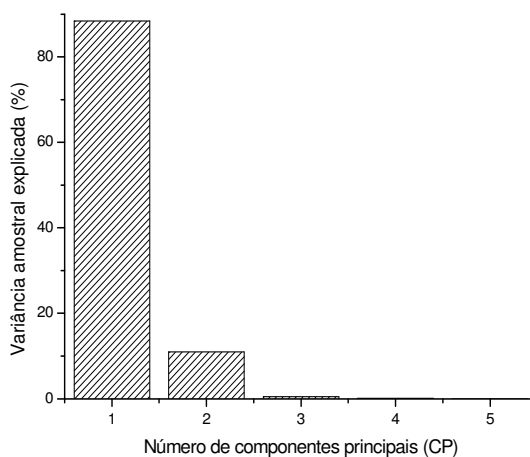
Misturas	Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )			
	Experimental	Calculada		
		3 CP	4 CP	5 CP
Remazol Brilliant Orange 3R				
Ponto 8	16,12	16,00	16,07	16,17
Ponto 9	4,03	4,12	3,89	4,02
Ponto 10	4,03	3,61	3,97	4,08
Azul Remazol RR				
Ponto 8	4,03	5,88	3,93	3,96
Ponto 9	16,12	14,54	15,66	15,86
Ponto 10	4,03	6,95	3,69	3,89
Azul Remazol R ESP				
Ponto 8	4,03	0,76	4,01	3,73
Ponto 9	4,03	5,29	3,94	3,80
Ponto 10	16,12	11,03	16,05	15,70

O método PLS foi realizado com 3, 4 e 5 CP, e apesar de 3 CP explicar mais de 99%, 4 CP apresentou menor RMSE (raiz quadrada média do erro de previsão), e com 5 CP o erro se manteve constante para os corantes Azul RR e Azul R ESP (Figura 17). Para o corante RBO 3R, a partir de 2 CP o RMSE se manteve constante e com valor baixo. Portanto, para a análise dos dados foram utilizadas 4

componentes principais (CP) que explicaram 99,98% da variância contida nos dados sem perda de informação relevante (Figura 18).



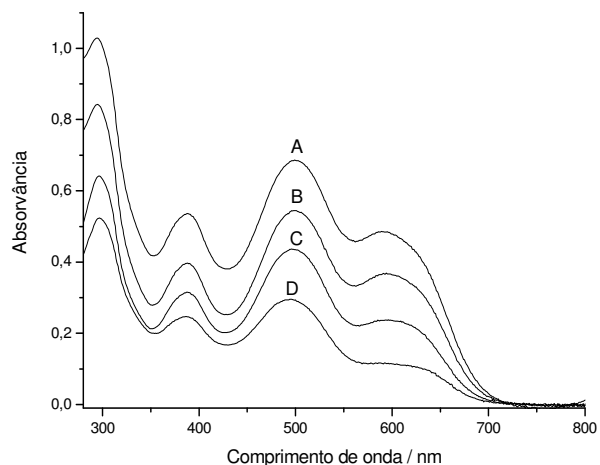
**Figura 17.** Variação do RMSE em função do número de CP para os corantes: (A) Remazol Brilliant Orange 3R, (B) Azul Remazol RR e (C) Azul Remazol R. ESP.



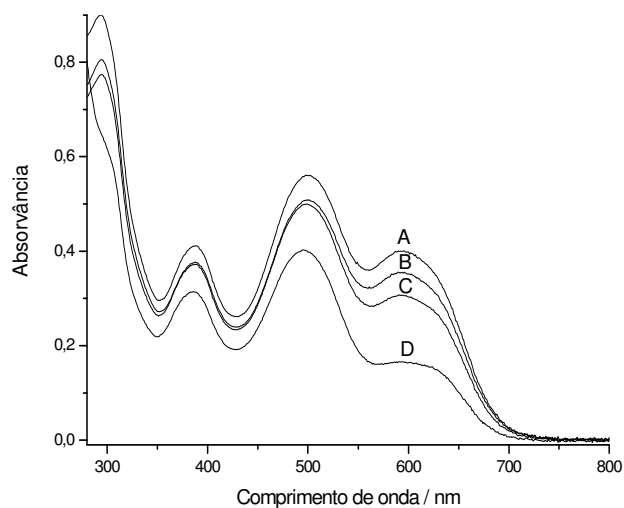
**Figura 18.** Porcentagem de variância explicada em função do número de componentes principais para o Grupo 2.

As Figuras 19 a 21 mostram os espectros UV-Vis dos efluentes após o processo de biodegradação, a 25°C, 28°C e 31°C, respectivamente em função do

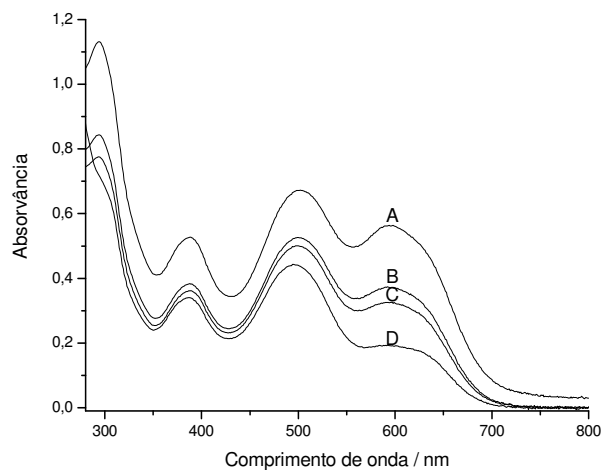
tempo. As concentrações dos corantes nos efluentes a 25°C, 28°C e 31°C, em cada tempo, são mostradas nas Tabelas 7 a 9, respectivamente.



**Figura 19.** Espectros UV-Vis do efluente, com Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP., biodegradado pelo fungo *Ganoderma spp*, a 25°C, nos tempos (h): (A) 0, (B) 24, (C) 78 e (D) 335.



**Figura 20.** Espectros UV-Vis do efluente, com Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP., biodegradado pelo fungo *Ganoderma spp*, a 28°C, nos tempos (h): (A) 0, (B) 24, (C) 78 e (D) 335.



**Figura 21.** Espectros UV-Vis do efluente, com Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP., biodegradado pelo fungo *Ganoderma spp*, a 31°C, nos tempos (h): (A)0, (B) 24, (C) 78 e (D) 335.

Os espectros dos efluentes mostram a diminuição da absorvância dos corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP na mistura com o aumento do período de cultivo, indicando uma biodegradação significativa de cada corante pelo fungo *Ganoderma spp*.

**Tabela 7.** Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) calculada pelo PLS para os corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP no efluente em função do tempo de biodegradação, a 25°C.

Tempo de biodegradação (horas)	Concentração dos corantes no efluente ( $\text{mg L}^{-1}$ )		
	RBO 3R	Azul RR	Azul R ESP
0 *	20,20	19,58	22,30
24	18,96	18,03	11,98
49	17,75	14,98	10,96
78	16,33	13,05	6,13
143	16,32	12,37	4,95
215	16,20	11,85	4,07
246	14,61	9,99	2,04
335	12,39	9,24	1,02

\* 0 hs = 6 hs de incubação



**Tabela 8.** Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) calculada pelo PLS para os corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP no efluente em função do tempo de biodegradação, a  $28^{\circ}\text{C}$ .

Tempo de biodegradação (horas)	Concentração dos corantes no efluente ( $\text{mg L}^{-1}$ )		
	RBO 3R	Azul RR	Azul R ESP
0 *	19,09	19,99	12,41
24	17,53	17,71	11,24
49	15,90	14,60	8,62
78	17,97	15,61	9,40
143	14,22	10,99	4,27
215	15,54	10,82	5,56
246	14,81	11,54	2,30
335	15,34	11,24	1,39

\* 0 hs = 6 hs de incubação

**Tabela 9.** Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) calculada pelo PLS para os corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP. no efluente em função do tempo de biodegradação, a  $31^\circ\text{C}$ .

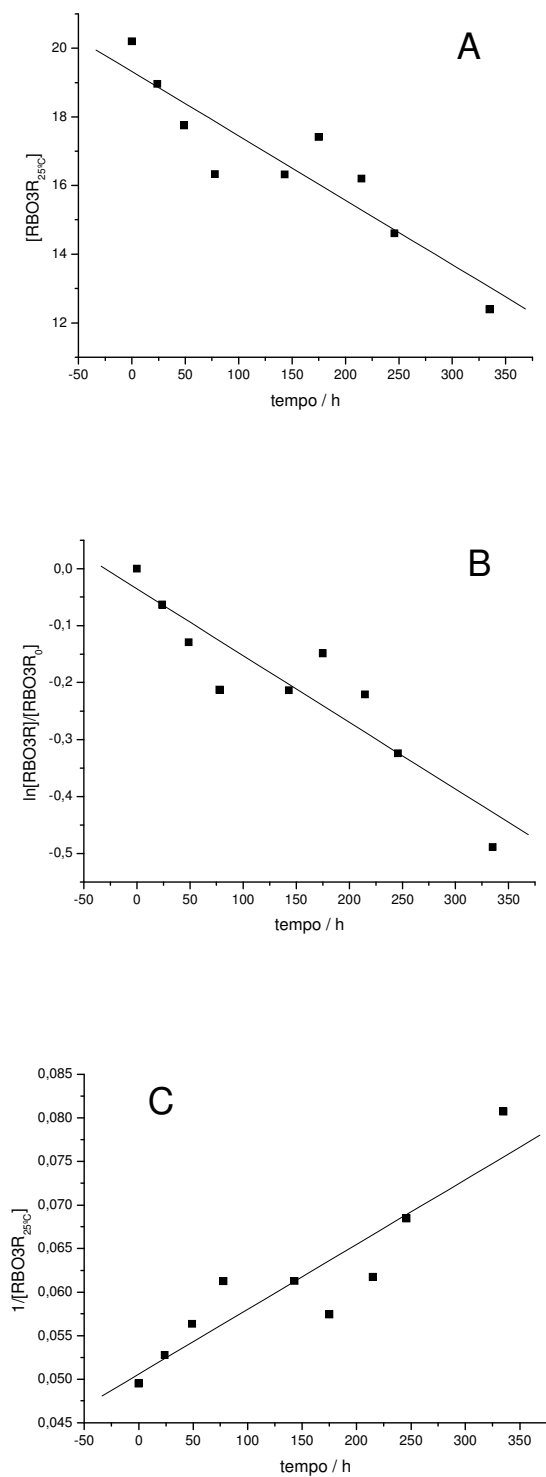
Tempo de biodegradação (horas)	Concentração dos corantes no efluente ( $\text{mg L}^{-1}$ )		
	RBO 3R	Azul RR	Azul R ESP
0 *	17,97	18,47	11,94
24	17,91	18,45	11,87
49	16,64	15,61	8,28
78	17,45	16,78	9,47
143	17,67	16,53	8,14
175	17,03	13,98	6,75
246	18,66	15,96	10,71
335	16,67	13,07	1,73

\* 0 hs = 6 hs de incubação

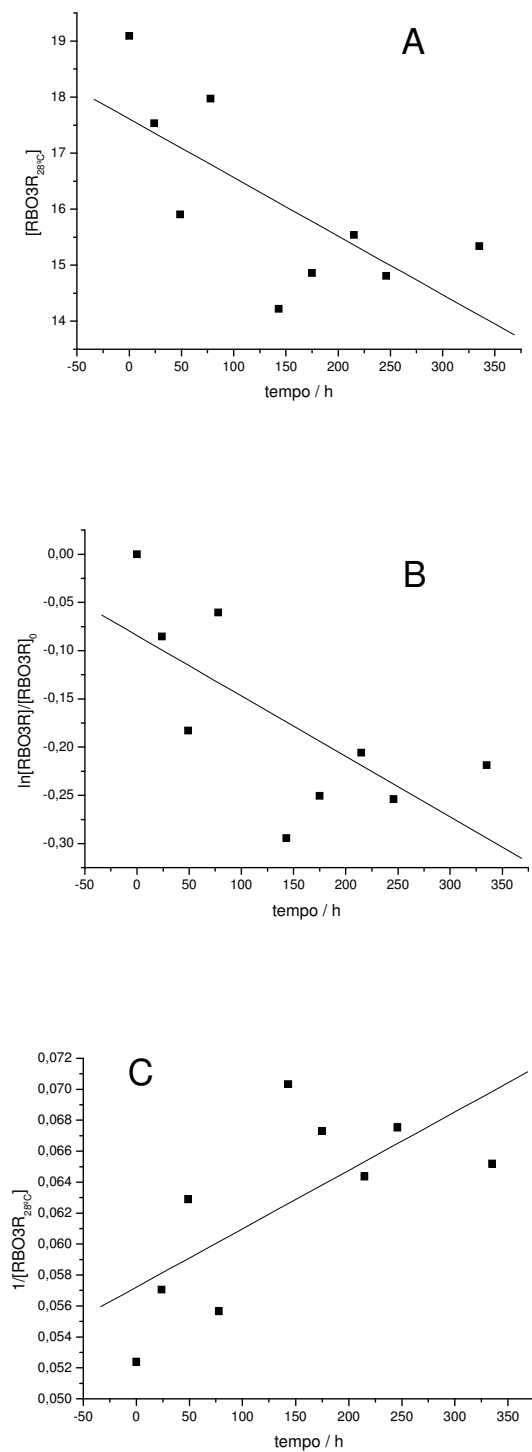
Através das concentrações calculadas pelo método PLS foi realizado o estudo cinético do processo de biodegradação obtendo-se a ordem da reação de biodegradação do corante pelo fungo e a constante de velocidade. A determinação da ordem de reação foi realizada pelo ajuste da melhor reta obtida entre as equações de velocidade de ordem zero ( $[A]-[A]_0 = -kt$ ), primeira ordem

( $\ln[a] - \ln[A]_0 = -kt$ ) e segunda ordem ( $\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = kt$ ).

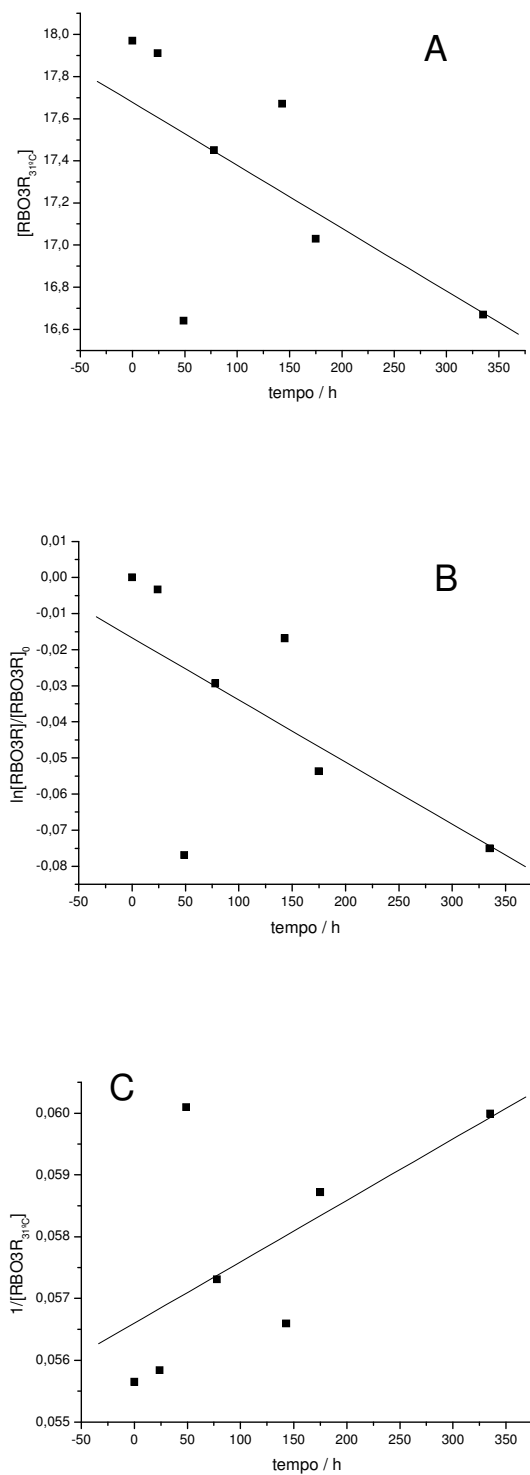
Os gráficos cinéticos dos corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP em função do tempo de biodegradação, nas diferentes temperaturas, são apresentados nas Figuras 22 a 30.



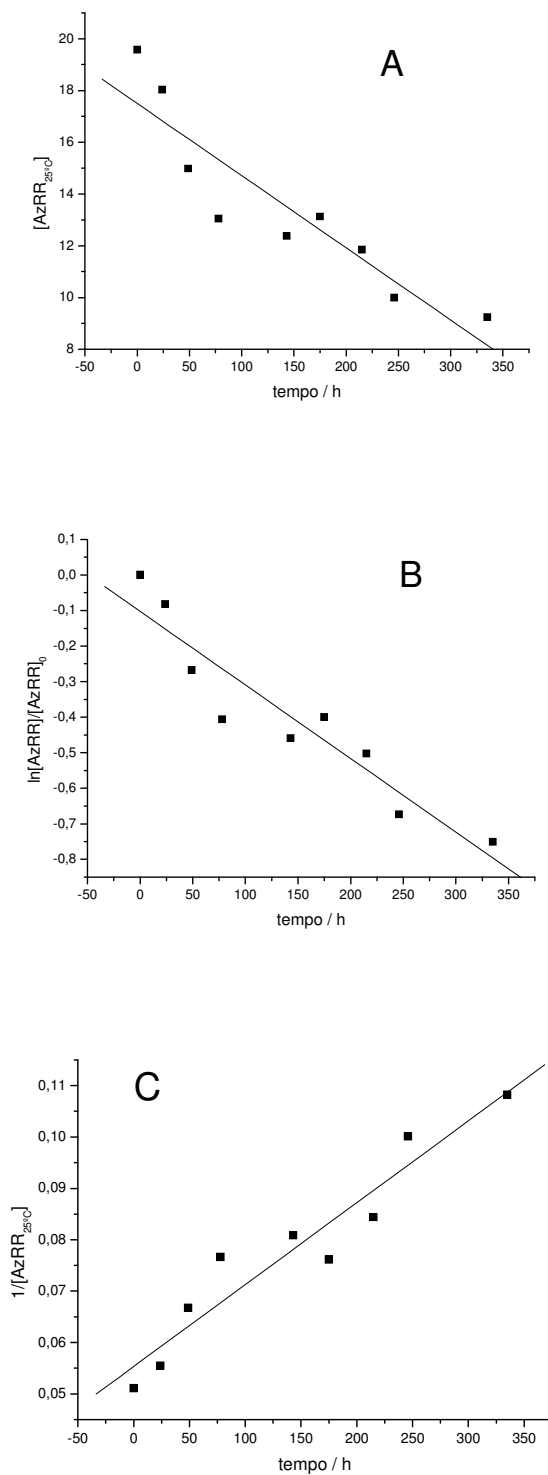
**Figura 22.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Remazol Brilliant Orange 3R no efluente, pelo fungo *Ganoderma spp.*, a 25°C.



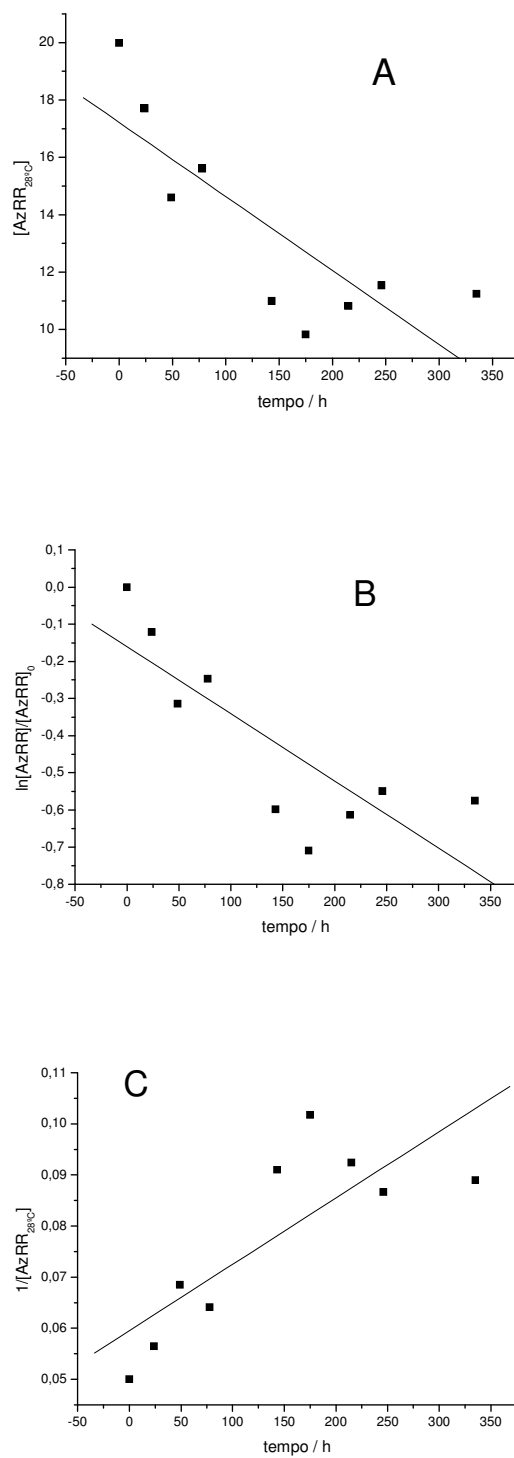
**Figura 23.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Remazol Brilliant Orange 3R no efluente, pelo fungo *Ganoderma spp.*, a 28°C.



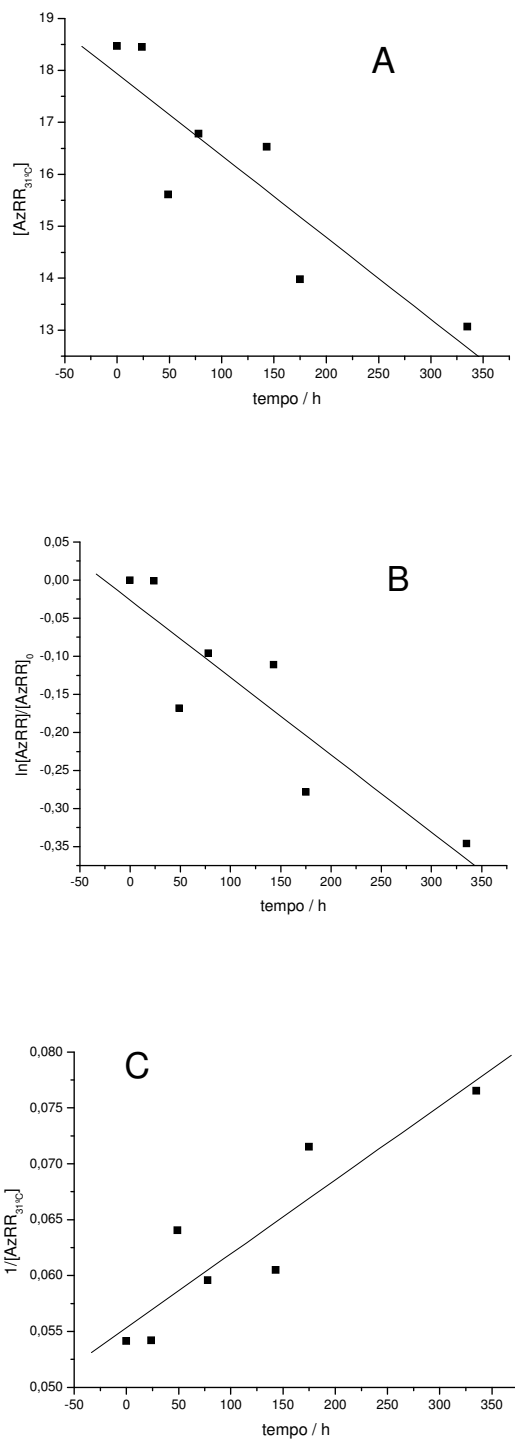
**Figura 24.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Remazol Brilliant Orange 3R no efluente, pelo fungo *Ganoderma spp.*, a 31°C.



**Figura 25.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol RR no efluente, pelo fungo *Ganoderma spp*, a 25°C.

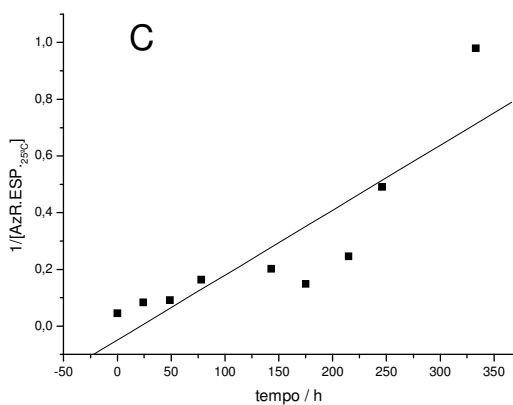
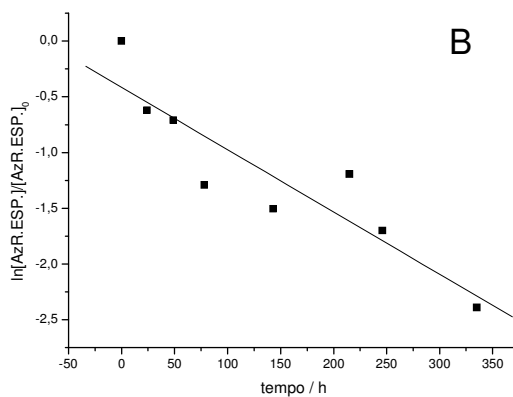
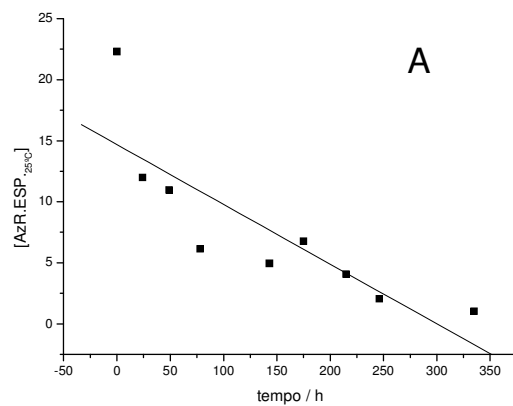


**Figura 26.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol RR no efluente, pelo fungo *Ganoderma spp*, a 28°C.

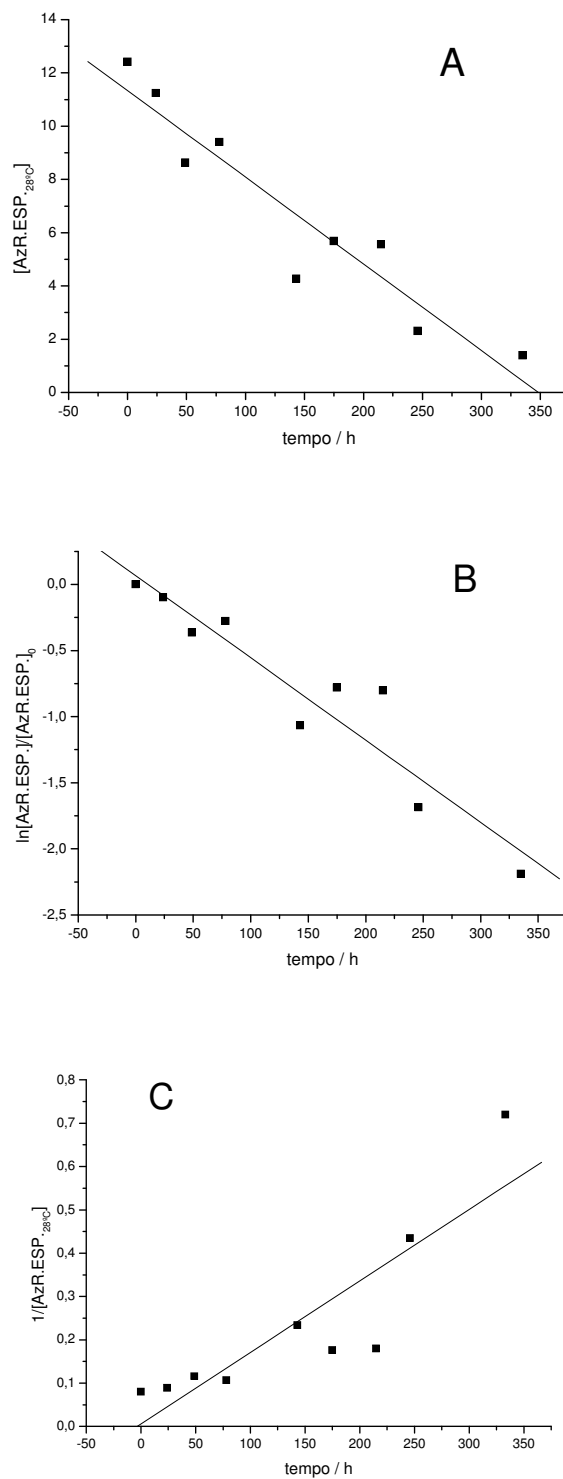


**Figura 27.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol RR no efluente, pelo fungo *Ganoderma spp.*, a 31°C.

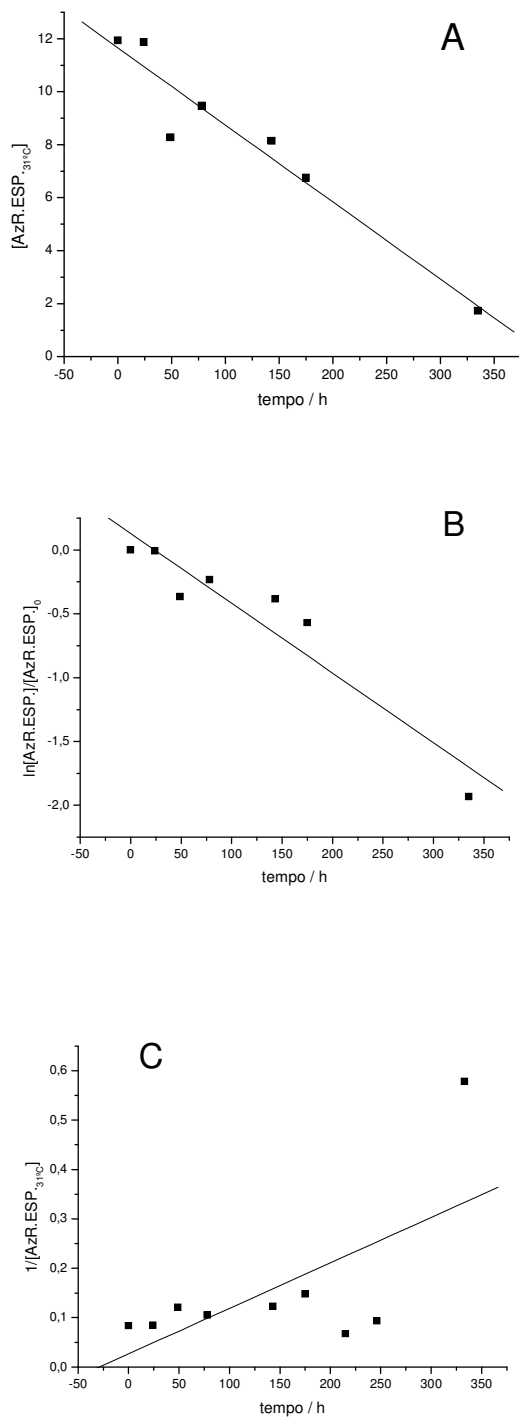




**Figura 28.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol R ESP no efluente, pelo fungo *Ganoderma spp*, a 25°C.



**Figura 29.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol R ESP no efluente, pelo fungo *Ganoderma spp*, a 28°C.



**Figura 30.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C), do corante Azul Remazol R ESP no efluente, pelo fungo *Ganoderma spp*, a 31°C.

Os gráficos acima mostram que as reações de biodegradação em cada temperatura apresentaram retas com valores de  $R^2$  semelhantes, mas com tendência para cinéticas de primeira ordem, principalmente para o corante Azul Remazol R ESP a 25 °C. Observa-se claramente nos gráficos de concentração do corante em função do tempo (Figuras 22-A, 25-A, 28-A) um patamar em torno de 140 horas indicando a diminuição acentuada da velocidade de reação. Esta diminuição do processo de biodegradação pode ser explicada pela diminuição da quantidade de enzima lacase liberada pelo fungo *Ganoderma ssp* no meio, que coincidiu com este tempo de biodegradação (140 horas), Tabela 10. Desse modo, sem a lacase não houve reação de biodegradação indicando que a reação depende de apenas um reagente, a enzima, que, portanto deve seguir uma lei de velocidade do tipo  $\frac{dx}{dt} = k[A]$ , na qual a reação somente depende do reagente A. Essa conjectura, mais o fato de que a 25°C a melhor reta foi obtida para uma cinética de primeira ordem, e não havendo razão para a ordem da reação mudar com a temperatura, admitimos que as reações de biodegradação dos três corantes sejam de primeira ordem.

**Tabela 10.** Atividade enzimática da lacase e biomassa microbiana dos efluentes biodegradados com *Ganoderma spp* em diferentes tempos, a 25°C, 28°C e 31°C.

T (°C)	Tempo (h)	Lacase (U.mL <sup>-1</sup> )	Biomassa (g)
25°C	0	0,0008	0,1810
	24	0,0032	
	143	0	
	175	0,2328	
	335	0,1088	
28°C	0	0,0884	0,1735
	24	0,0664	
	143	0	
	175	0,0080	
	335	0,0264	
31°C	0	0	0,1728
	24	0	
	143	0	
	175	0	
	335	0,132	

As constantes de velocidade (k), os coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ) e as equações das retas, nas três temperaturas, são apresentadas nas Tabelas 11 a 13.

**Tabela 11.** Parâmetros cinéticos obtidos para a biodegradação do corante Remazol Brilliant Orange 3R pelo fungo *Ganoderma spp* no efluente a 25°C, 28°C e 31°C.

T / °C	Ordem de reação	Equação da reta	R <sup>2</sup>	k / 10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>
25°C	Zero	y=19,32255-0,01876x	0,917	18,76
	1 <sup>a</sup>	y=-0,03531-0,00117x	0,916	1,17
	2 <sup>a</sup>	y=0,05058+0,00007x	0,909	0,07
28°C	Zero	y=17,60857-0,01045x	0,707	10,45
	1 <sup>a</sup>	y=-0,08432-0,00062x	0,702	0,62
	2 <sup>a</sup>	y=0,05721+0,00003x	0,695	0,03
31°C	Zero	y=17,67729-0,00299x	0,616	2,99
	1 <sup>a</sup>	y=-0,01668-0,00017x	0,615	0,17
	2 <sup>a</sup>	y=0,05660+0,000009x	0,613	0,009

**Tabela 12.** Parâmetros cinéticos obtidos para a biodegradação do corante Azul Remazol RR pelo fungo *Ganoderma spp* no efluente a 25°C, 28°C e 31°C.

T / °C	Ordem de reação	Equação da reta	R <sup>2</sup>	k / 10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>
25°C	Zero	y=17,50218-0,02790x	0,914	27,90
	1 <sup>a</sup>	y=-0,10241-0,00207x	0,942	2,07
	2 <sup>a</sup>	y=0,05532+0,00016x	0,956	0,16
28°C	Zero	y=17,21895-0,02580x	0,816	25,80
	1 <sup>a</sup>	y=-0,16030-0,00181x	0,813	1,81
	2 <sup>a</sup>	y=0,05951+0,00013x	0,800	0,13
31°C	Zero	y=17,93717-0,01576x	0,879	15,76
	1 <sup>a</sup>	y=-0,02625-0,00102x	0,891	1,02
	2 <sup>a</sup>	y=0,05534+0,00006x	0,901	0,06

**Tabela 13.** Parâmetros cinéticos obtidos para a biodegradação do corante Azul Remazol R ESP pelo fungo *Ganoderma spp* no efluente a 25°C, 28°C e 31°C.

T / °C	Ordem de reação	Equação da reta	R <sup>2</sup>	k / 10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>
25°C	Zero	y=14,67814-0,04893x	0,841	48,93
	1 <sup>a</sup>	y=-0,41458-0,00559x	0,909	5,59
	2 <sup>a</sup>	y=-0,04925+0,00229x	0,866	2,29
28°C	Zero	y=11,34058-0,03257x	0,946	32,57
	1 <sup>a</sup>	y=0,06726-0,00622x	0,946	6,22
	2 <sup>a</sup>	y=0,00587+0,00165x	0,875	1,65
31°C	Zero	y=11,65359-0,02910x	0,964	29,10
	1 <sup>a</sup>	y=-0,12911-0,00546x	0,949	5,46
	2 <sup>a</sup>	y=0,02680+0,00092x	0,644	0,92

Os resultados obtidos do estudo da atividade da lacase em função do tempo mostraram que ela é a enzima mais importante produzida pelo fungo *Ganoderma spp*, embora possa não ser a única envolvida no processo de biodegradação. A participação de outra enzima no processo pode explicar o fato de que a 31°C houve a biodegradação acentuada do corante Azul Remazol R ESP como mostra a curva de concentração em função do tempo de incubação (Figura 30-A) embora não houvesse atividade enzimática da lacase nessa temperatura. As diferenças estruturais entre os corantes podem explicar o fato de outra enzima participar do processo de biodegradação a 31°C somente para o corante Azul Remazol R ESP.

O estudo da quantidade de biomassa produzida pelo fungo em função do tempo a 25°C, 28°C e 31°C mostram, Tabela 10, valores muito próximos indicando

que não há correlação entre aumento de temperatura e o crescimento do fungo, embora a temperatura seja crítica para a liberação da lacase no meio.

O fato de não haver atividade enzimática no tempo de 143 horas em 25°C e 28°C, pode estar relacionado com a inibição da enzima pela produção de algum produto do processo de biodegradação de algum dos corantes na mistura. Essa inibição desaparece após 175 horas observando-se o aumento da atividade da enzima, continuando assim a biodegradação dos corantes.

Os resultados da atividade enzimática também explicam a maior biodegradação dos corantes no efluente na temperatura de 25°C seguido de 28°C, pois na temperatura de 25°C houve grande atividade da lacase após 175 horas aumentando a porcentagem de biodegradação.

A 28°C houve grande atividade enzimática no começo da reação, diminuindo à zero no tempo de 143 horas, e retomando a seguir, ou seja, a atividade dessa enzima permaneceu baixa, mas quase constante. Esse fato pode explicar por que nessa temperatura foi obtida a maior constante de velocidade para a reação de biodegradação do corante Azul Remazol R ESP pelo fungo *Ganoderma spp.* A participação de outra enzima auxiliando o processo pode também ser um fator a explicar essa maior velocidade.

Na temperatura de 31°C, não houve atividade enzimática em todos os tempos, apenas a 335 horas, isso pode ser explicado pelo fato dessa temperatura inibir a produção de lacase, embora houvesse crescimento do fungo. Dessa forma a variação da concentração dos corantes com tempo de incubação deveu-se apenas à adsorção do corante no micélio do fungo, com exceção do corante Azul Remazol R ESP. Esse fato explicaria a menor qualidade das retas, com grande dispersão de pontos, observadas para os corantes Remazol Brilliant Orange 3R e Azul Remazol



RR a 31°C e a pequena variação da concentração deles com o tempo (Figura 24-A e 27-A).

Como a 31°C só houve adsorção dos corantes Remazol Brilliant Orange 3R e Azul Remazol RR no micélio do fungo, a energia de ativação ( $E_a$ ) da reação foi calculada para cada corante usando apenas as temperaturas de 25°C e 28°C, utilizando a equação de Arrhenius:  $\ln \frac{k_2}{k_1} = -\frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$ , Na qual  $k_1$  é a constante de velocidade na temperatura inicial,  $k_2$  a constante de velocidade na temperatura final,  $E_a$  a energia de ativação,  $R$  a constante dos gases ideais,  $T_1$  a temperatura inicial e  $T_2$  a temperatura final.

As energias de ativação ( $E_a$ ) calculadas a partir das constantes de velocidade de primeira ordem, a 25°C e 28°C, para os corantes do Grupo 2 (Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP), são apresentadas na Tabela 14.

**Tabela 14.** Energia de Ativação calculada a partir das constantes de velocidade de primeira ordem para os corantes do Grupo 2.

Corante	$E_a$ / kJ mol <sup>-1</sup>
RBO 3R	175,90
Azul RR	37,17
Azul R ESP	29,58

Como a energia de ativação é a energia mínima necessária para que uma reação ocorra, quanto menor a energia de ativação da reação maior será sua velocidade. Isto está de acordo com os resultados obtidos da energia de ativação

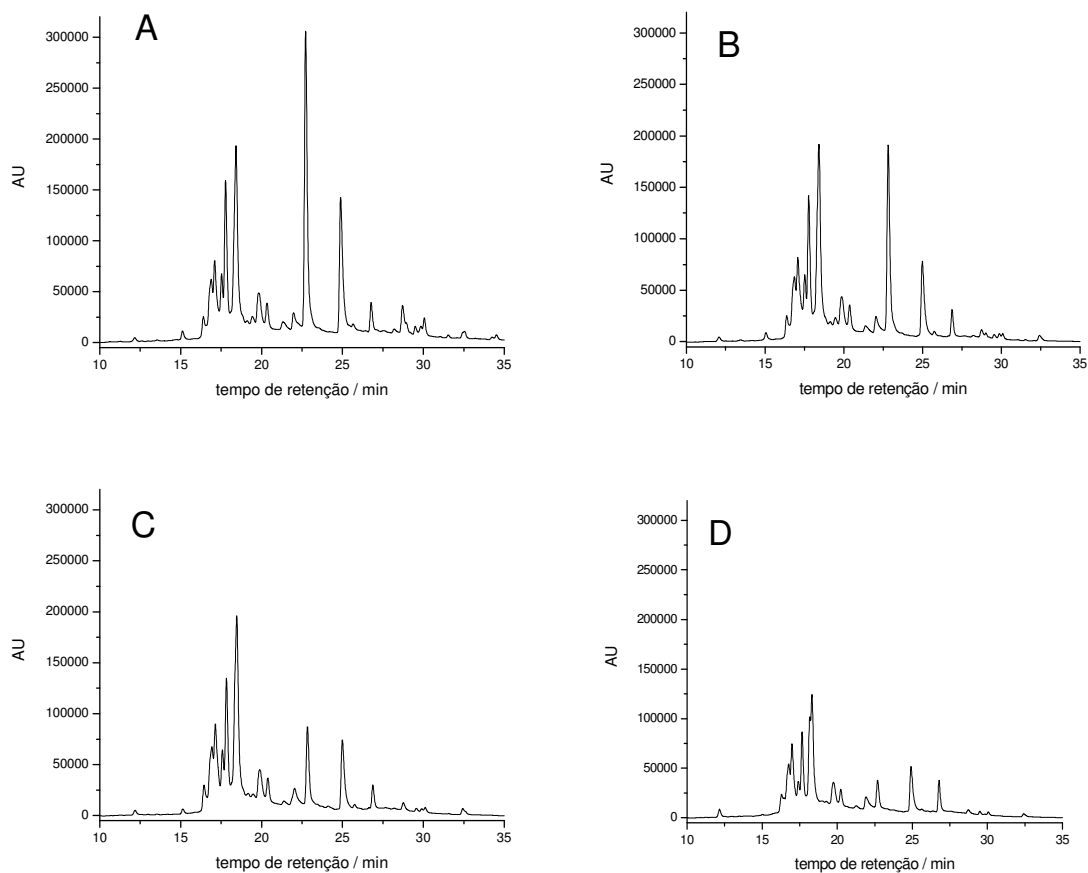
para a reação de biodegradação dos corantes no efluente, pois as maiores constantes de velocidade obtidas nas temperaturas estudadas foram para o corante Azul Remazol R ESP e sua reação apresentou menor energia de ativação, explicando o fato de este corante ter porcentagem de biodegradação maior (95,4%) que os outros a 25°C, principalmente. O corante Remazol Brilliant Orange 3R apresentou menores constantes de velocidade nas temperaturas estudadas e maior energia de ativação, dessa forma, ele foi o corante desse grupo que apresentou menor porcentagem de biodegradação (38,7%), a 25°C. Já o corante Azul RR apresentou valores intermediários de constantes de velocidade e energia de ativação entre os dois corantes citados acima, tendo uma porcentagem de descoloração de 52,8%, a 25°C.

Estudos utilizando o fungo *Ganoderma spp* mostraram este fungo conseguiu degradar 94% do corante Remazol Brilliant Blue R (SILVA; MELO; OLIVEIRA, 2005) e 100% de um efluente industrial após 12 dias de incubação (REVANKAR; LELE, 2007). Outros estudos mostraram que outros fungos da podridão branca como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes hísida* e *Trametes versicolor* também conseguiram degradar significativamente os corantes têxteis Amarelo Procion HE4R e Vermelho Procion HE7B (RODRÍGUEZ; PICKARD; VAZQUEZ-DUHALT, 1999). Já o estudo realizado por Svobodová et al. (2008) mostrou que o fungo *Irpex lacteus* consegue degradar 88,5% e 98,6% dos corantes Remazol Brilliant Orange 3R e Remazol Brilliant Blue R, respectivamente.

### 4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os cromatogramas de cada mistura biodegradada foram obtidos para que fosse possível identificar e quantificar os corantes contidos no efluente durante a biodegradação e compará-los com os obtidos com o método PLS.

A Figura 31 mostra os cromatogramas dos efluentes, do Grupo 2 (Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP.), biodegradados pelo fungo *Ganoderma spp* a 25°C nos tempos de incubação de 0, 78, 175 e 335 horas.



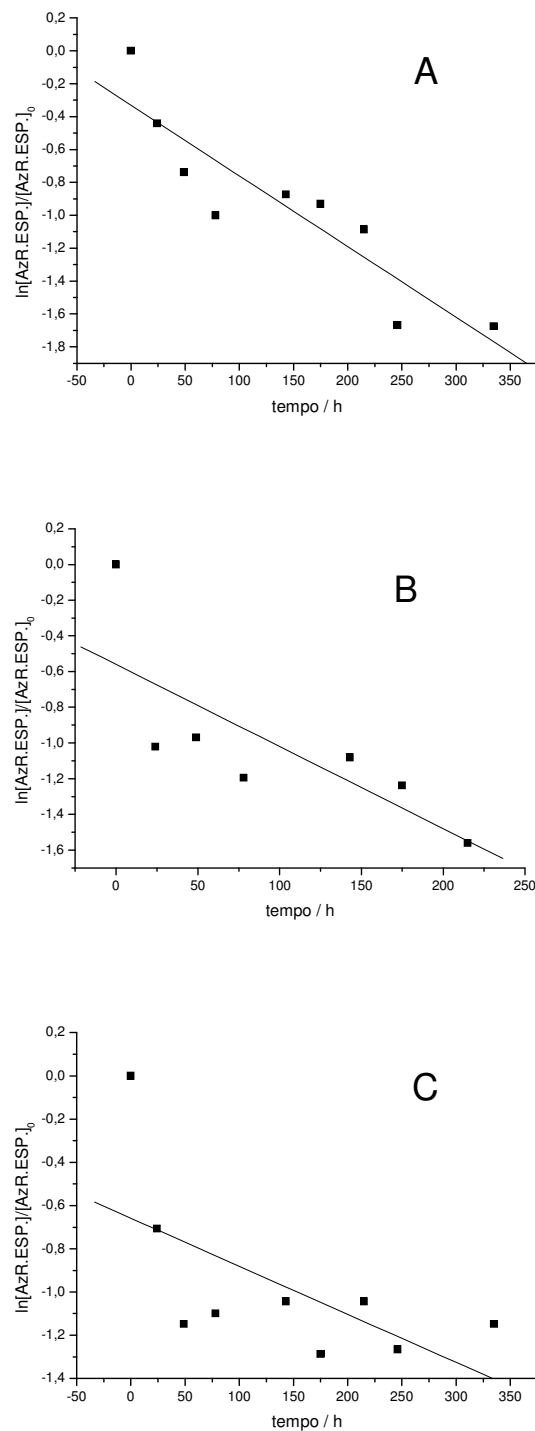
**Figura 31.** Cromatogramas dos efluentes contendo os corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R ESP, biodegradados pelo fungo *Ganoderma spp*, a 25°C, nos tempos (h): (A) 0, (B) 78, (C) 175 e (D) 335.

Nos cromatogramas observa-se a diminuição dos picos em função do tempo de incubação devido à biodegradação dos corantes presentes no efluente pelo fungo *Ganoderma spp.*

Os tempos de retenção dos picos dos corantes do Grupo 2 foram identificados utilizando os cromatogramas da curva de calibração deste grupo.

De maneira geral foi muito difícil fazer a atribuição dos picos aos três corantes e obter os seus tempos de retenção, pois a mistura de tingimento tem composição muito complexa devido aos aditivos usados para fixação do corante na fibra. Dessa forma apareceram diversos picos que não puderam ser atribuídos aos corantes. Mesmo a comparação dos cromatogramas dos três corantes puros em solução com as misturas da curva padrão apresentaram grande dificuldade, provavelmente devido à processos de hidrólise dos corantes, efeitos sinérgico entre eles ou a mudanças do pH das soluções. Dessa forma foi possível identificar com certeza apenas o pico do corante Azul Remazol R ESP que apresentou tempo de retenção igual a 32,5 min sendo, portanto, usado para os cálculos de concentrações e posterior estudo cinético.

A partir da identificação do pico do corante Azul Remazol R ESP nos cromatogramas em diferentes tempos de biodegradação e encontradas as concentrações correspondentes, foram obtidos os gráficos cinéticos de primeira ordem nas temperaturas de incubação de 25°C, 28°C e 31°C (Figura 32).



**Figura 32.** Cinética de biodegradação do corante Azul Remazol R ESP no efluente pelo fungo *Ganoderma spp.*, através da CLAE nas temperaturas: (A) 25°C, (B) 28°C e (C) 31°C.

Esses gráficos apresentam o mesmo andamento observado nos gráficos nos quais as concentrações foram obtidas pelo método PLS, inclusive com a diminuição da velocidade de reação no tempo de 143 horas e posterior aumento da velocidade. Dessa forma confirma-se que a reação dependeu da enzima lacase liberada pelo fungo, principalmente a 25°C. A partir dos gráficos foi possível calcular as constantes de velocidade (k), os coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ) e as equações das retas para o corante Azul Remazol R ESP, nas três temperaturas, que são apresentadas na Tabela 15.

**Tabela 15.** Parâmetros cinéticos obtidos para a reação de biodegradação do corante Azul Remazol R ESP no efluente pelo fungo *Ganoderma spp* em 25°C, 28°C e 31°C, usando as concentrações obtidas pela CLAE.

T / °C	Ordem de reação	Equação da reta	$R^2$	k / $10^{-3} \text{ h}^{-1}$
25°C	1 <sup>a</sup>	$y = -0,33132 - 0,00429x$	0,906	4,29
28°C	1 <sup>a</sup>	$y = -0,56016 - 0,00460x$	0,768	4,60
31°C	1 <sup>a</sup>	$y = -0,65876 - 0,00222x$	0,623	2,22

As constantes cinéticas da biodegradação do corante Azul Remazol R ESP calculadas através das concentrações obtidas pela CLAE aumentaram de 25°C para 28°C, e diminuíram para 31°C, e a energia de ativação calculada a partir das constantes de velocidade de primeira ordem, a 25°C e 28°C, foi de 19,33 kJ mol<sup>-1</sup>.

As concentrações obtidas através dos dois métodos para o corante Azul Remazol R ESP no efluente nas três temperaturas estudadas, são mostradas na Tabela 16. A comparação dos valores obtidos mostrou que os dois métodos utilizados para quantificar os corantes do Grupo 2 nos efluentes estão de acordo, apesar da mistura de tingimento ser muito complexa.

**Tabela 16.** Concentrações calculadas para o corante Azul Remazol R ESP, biodegradado pelo fungo *Ganoderma spp*, no efluente, utilizando os métodos do PLS e CLAE.

Tempo (horas)	Concentração do corante Azul Remazol R ESP (mg L <sup>-1</sup> )					
	25°C		28°C		31°C	
	PLS	CLAE	PLS	CLAE	PLS	CLAE
0	22,30	27,66	12,41	28,96	11,94	37,99
24	11,98	17,79	11,24	10,44	11,87	18,75
49	10,96	13,22	8,62	10,98	8,28	12,05
78	6,13	10,16	9,40	8,76	9,47	12,66
143	4,95	11,55	4,27	9,82	8,14	13,39
175	6,76	10,91	5,68	8,39	6,75	10,49
215	4,07	9,33	5,56	6,08	14,85	13,39
246	2,04	5,22	2,30	14,89	10,71	10,71
335	1,02	5,18	1,39	17,64	1,73	12,05

## 5 CONCLUSÃO

Utilizando a metodologia desenvolvida para encontrar as concentrações individuais dos corantes do Grupo 1, nas soluções de efluente, após a biodegradação, concluiu-se que 33,6% do corante Amarelo Procion, 43,5% do Azul Procion e 57,7% do Vermelho Procion foram biodegradados pelo fungo *Ganoderma spp*, a 28°C, após 72 horas de incubação.

Os corantes do Grupo 1 foram biodegradados seguindo uma Lei de velocidade de ordem fracionária entre primeira e segunda ordem, com constante de velocidade intermediária entre as encontradas para a primeira e segunda ordem. O corante Vermelho Procion foi o que apresentou maior velocidade de biodegradação seguido do Azul Procion e Amarelo Procion. E apesar da biodegradação desses corantes ser uma reação lenta, foi possível utilizar o fungo *Ganoderma spp* para biodegradação de efluentes contaminados com estes corantes têxteis.

Após 335 horas de incubação, a temperatura de 25°C foi a que propiciou melhor degradação dos corantes do Grupo 2, pelo fungo *Ganoderma spp*, chegando a 38,7% para o Remazol Brilliant Orange 3R, 52,8% para o Azul Remazol RR e 95,4% para o Azul Remazol R ESP.

A biodegradação dos corantes do Grupo 2 no efluente, atribuída à enzima lacase, seguiu uma cinética de primeira ordem com  $k = 1,17$  e  $k = 2,07 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a 25°C e  $k = 0,62$  e  $k = 1,81 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a 28°C, para os corantes Remazol Brilliant Orange 3R e Azul Remazol RR, respectivamente. Para o corante Azul Remazol R ESP as constantes de velocidade foram de  $5,59 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a 25°C e  $6,22 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a 28°C, mas houve biodegradação também a 31 °C, com  $k = 5,46 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a 31°C, que foi atribuída a outro tipo de enzima.



A temperatura da reação não influenciou significativamente no crescimento do fungo, mas influenciou na produção da enzima lacase, sendo que a temperatura que apresentou maior atividade enzimática foi a 25°C, seguida de 28°C, enquanto que a 31°C não houve produção desta enzima.

As constantes cinéticas da biodegradação dos corantes Remazol Brilliant Orange 3R e Azul Remazol RR diminuíram com o aumento da temperatura enquanto que para o corante Azul Remazol R ESP as constantes aumentaram de 25°C para 28°C, mas diminuíram para 31°C.

As energias de ativação calculadas a partir da equação de Arrhenius foram 175,90 kJ mol<sup>-1</sup> para o corante Remazol Brilliant Orange 3R, 37,17 kJ mol<sup>-1</sup> para o Azul Remazol RR e 29,58 kJ mol<sup>-1</sup> para o Azul Remazol R ESP. As maiores constantes de velocidade foram obtidas para o corante Azul Remazol R ESP, o qual apresentou menor energia de ativação e maior porcentagem de degradação, indicando que este foi o corante mais biodegradado pelo fungo *Ganoderma spp.*

As concentrações e constantes de velocidade obtidas para o corante Azul Remazol R ESP a partir das análises de CLAE dos efluentes foram concordantes com os resultados obtidos com a metodologia PLS.

Os resultados mostraram que a metodologia PLS pode ser usada para quantificação de corantes em efluentes com o objetivo de encontrar os parâmetros cinéticos de reações de biodegradação, apesar da mistura de tingimento ser muito complexa.

## REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, M. R.; DALTIM, D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**, v.19, n.3, p.320-330, 1996.
- ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A.; DURAN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v.27, n.5, p.818-824, jul. 2004.
- AKAR, T.; OZCAN, A. S.; TUNALI, S.; OZCAN, A. Biosorption of a textile dye (Acid Blue 40) by cone biomass of *Thuja orientalis*: Estimation of equilibrium, thermodynamic and kinetic parameters. **Bioresource Technology**, v.99, p.3057-3065, 2008.
- AL-DEGS, Y. S.; EL-SHEIKH, A. H.; AL-GHOUTI, M. A.; HEMMATEENEJAD, B.; WALKER, G. M. Solid-phase extraction and simultaneous determination of trace amounts of sulphonated and azo sulphonated dyes using microemulsion-modified-zeolite and multivariate calibration. **Talanta**, v.75, p.904-915, 2008.
- ASGHER, M.; KAUSAR, S.; BHATTI, H. N.; SHAH, S. A. H.; ALI, M. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.61, p.189–193, 2008.
- ASGHER, M.; SHAH, S. A. H.; ALI, M.; LEGGE, R. L. Decolorization of some reactive textile dye by white rot fungi isolated in Pakistan. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, p.89–93, 2006.
- ATKINS, P. W.; DE PAULA, J. **Physical Chemistry for the Life Sciences**. New York: Oxford University Press. 2006.
- CARVALHO, A. R.; SÁNCHEZ, M. N.; WATTOOM, J.; BRERETON, R. G. Comparison of PLS and kinetic models for a second-order reaction as monitored using ultraviolet visible and mid-infrared spectroscopy. **Talanta**, v.68, p.1190-1200, 2006.
- CATANHO, M.; MALPASS, G. R. P.; MOTHEO, A. J. Avaliação dos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico na degradação de corantes têxteis. **Química Nova**, São Carlos, v.29, n.5, p.983-989, jun. 2006.
- CHANDER, M; ARORA, D. S. Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. **Dyes and Pigments**, v.72, p.192-198, 2007.
- DALLAGO, R. M.; SMANIOTTO, A.; OLIVEIRA, L. C. A. Resíduos Sólidos de Curtumes Como Adsorventes para a Remoção de Corantes em Meio Aquoso. **Química Nova**, v.28, n.3, p.433-437, 2005.
- EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. **Dyes and Pigments**, v.75, p.38-44, 2007.

- ERKURT, E. A.; ÜNYAYAR, A.; KUMBUR, H. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. **Process Biochemistry**, v.42, p.1429-1435, 2007.
- FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment International**, v.30, p.953-971, 2004.
- GARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes Têxteis. **Química Nova**, Araraquara, v.23, n.1, p.71-78, 2000.
- GARCÍA-MONTAÑO, J.; DOMÈNECH, X.; GARCÍA-HORTAL, J. A.; TORRADES, F.; PERAL, J. The testing of several biological and chemical coupled treatments for Cibacron Red FN-R azo dye removal. **Journal of Hazardous Materials**, v.154, p.484-490, 2008.
- GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v.185, p.1-17, 1986.
- GHOREISHI, S. M.; HAGHIGHI, R. Chemical catalytic reaction and biological oxidation for treatment of non-biodegradable textile effluent. **Chemical Engineering Journal**, v.95, p.163-169, 2003.
- HARAZONO, K.; NAKAMURA, K. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. **Chemosphere**, v.59, p.63-68, 2005.
- HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v.500, p.365-377, 2003.
- KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, Campinas, v.28, n.4, p.629-632, fev. 2005.
- KIRBY, N.; MARCHANT, R.; MCMULLAN, G. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v.188, p.93-96, 2000.
- KOKOT, S.; CRAWFORD, K.; RINTOUL, L.; MEYER, U. A DRIFTS study of reactive dye states in cotton fabric. **Vibrational Spectroscopy**, v.15, p.103-111, 1997.
- KÖRBAHTI, B. K. Response surface optimization of electrochemical treatment of textile dye wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v.145, p.277-286, 2007.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v.25, n.1, p.78-82, 2002.
- KUNZ, A.; REGINATTO, V.; DURÁN, N. Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*-ozone. **Chemosphere**, v.44, p.281-287, 2001.

MACHADO, K. M. G.; COMPART, L. C. A.; MORAIS, R. O.; ROSA, L. H.; SANTOS, M. H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.481-487, 2006.

MAZMANCI, M. A.; ÜNYAYAR, A. Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilized on *Luffa cylindrical* sponge. **Process Biochemistry**, v.40, p.337-342, 2005.

MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; SMYTH, W. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p.81-87, 2001.

MECHICHI, T.; MHIRI, N.; SAYADI, S. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. **Chemosphere**, v.64, p.998-1005, 2006.

MICHNIEWICZ, A.; LEDAKOWICZ, S.; ULLRICH, R.; HOFRICHTER M. Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. **Dyes and Pigments**, v.77, p.295-302, 2008.

MURUGESAN, K.; DHAMIJA, A.; NAM, I.; KIM, Y.; CHANG, Y. Decolourization of reactive black 5 by laccase: optimization by response surface methodology. **Dyes and Pigments**, v.75, p.176-184, 2007.

NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; LLERENA, M. J. V. Simultaneous spectrophotometric determination of Tartrazine, Sunset Yellow and Ponceau 4R in commercial products by partial least squares and principal component regression multivariate calibration methods. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.361, p.465-472, 1998.

NILSSON, I.; MÖLLER, A.; MATTIASSON, B.; RUBINDAMAYUGI, M. S. T.; WELANDER, U. Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.94-100, 2006.

PALA, A.; TOKAT, E. Color removal from cotton textile industry wastewater in an activated sludge system with various additives. **Water Research**, v.36, p.2920-2925, 2002.

PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.17-24, 2005.

PASZCZYNSKI, A.; HUYNH, V. B.; CRAWFORD, R. Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, v.29, p.37-41, 1985.

PERALTA-ZAMORA, P.; KUNZ, A.; NAGATA, N.; POPPI, R. J. Spectrophotometric determination of organic dye mixtures by using multivariate calibration. **Talanta**, v.47, p.77-84, jan. 1998.

REVANKAR, M. S.; LELE, S. S. Synthetic dye decolorization by White rot fungus, *Ganoderma* SP. WR-1. **Bioresource Technology**, v.98, p.775-780, 2007.

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

RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. **Current Microbiology**, v.38, p.27-32, 1999.

ROMERO, S.; BLÁNQUEZ, P.; CAMINAL, G.; FONT, X.; SARRÀ, M.; GABARRELL, X.; VICENT, T. Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. **Biochemical Engineering Journal**, v.31, p.42-47, 2006.

ROSSEL, R. A. V. ParLeS: Software for chemometric analysis of spectroscopic data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.90, p.72-83, 2008.

SAHEL, K.; PEROL, N.; CHERMETTE, H.; BORDES, C.; DERRICHE, Z.; GUILLARD, C. Photocatalytic decolorization of Remazol black 5 (RB5) and Procion Red MX-5B – Isotherm od adsorption, kinetic of decolorization and mineralization. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.77, p.100-109, 2007.

SAHIN, S.; DEMIR, C.; GÜÇER, S. Simultaneous UV-vis spectrophotometric determination of disperse dyes in textile wastewater by partial least squares and principal component regression. **Dyes and Pigments**, v.73, p.368-376, 2007.

SCARMINIO, I. S. **Desenvolvimento de um sistema quimiométrico para microcomputadores e algumas aplicações**. 1989. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SCARMINIO, I. S.; ISHIKAWA, D. N.; BARRETO, W. J.; PACZKOWSKI, E. L.; ARRUDA, I. C. Calibração Multivariada para Sistemas com Bandas Sobrepostas Através da Análise de Fatores Tipo-Q. **Química Nova**, v.21, p.590-594, 1998.

SELVAM, K.; SWAMINATHAN, K.; CHAE, K-S. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. **Bioresource Technology**, v.88, p.115-119, 2003.

SHEDBALKAR, U.; DHANVE, R.; JADHAV, J. Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. **Journal of Hazardous Materials**, v.157, p.472-479, 2008.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; OLIVEIRA, P. R. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.324-329, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Ed. Porto Alegre: Brookman, 2002.

SLOKAR, Y. M.; MARECHAL, A. M. L. Methods of Decoloration of Textile Wastewaters. **Dyes and Pigments**, v.37, n.4, p.335-356, 1998.

SPONZA, D. T.; ISIK, M. Decolorization and inhibition kinetic of Direct Black 38 azo dye with granulated anaerobic sludge. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p.147-158, 2004.

SUMATHI, S.; MANJU, B. S. Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p.347-355, 2000.

SVOBODOVÁ, K.; MAJCHERCZYK, A.; NOVOTNÝ, C.; KÜES, U. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. **Bioresource Technology**, v.99, p.463–471, 2008.

TAVARES, A. P. M.; CRISTÓVÃO, R. O.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, R. A. R.; MACEDO, E. A. Application of statistical experimental methodology to optimize reactive dye decolourization by commercial laccase. **Journal of Hazardous Materials**, v.162, p.1255-1260, 2009.

THOMAS, E. V. A Primer on Multivariate Calibration. **Analytical Chemistry**, v.66, p.795A-804A, 1994.

TROVASLET, M.; ENAUD, E.; GUIAVARC'H, Y.; CORBISIER, A.; VANHULLE, S. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p.368–376, 2007.

VANHULLE, S.; ENAUD, E.; TROVASLET, M.; BILLOTTET, L.; KNEIPE, L.; JIWAN, J. H.; CORBISIER, A.; MARCHAND-BRYNAERT, J. Coupling occurs before breakdown during biotransformation of Acid Blue 62 by white rot fungi. **Chemosphere**, v.70, p.1097–1107, 2008.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v.22, p.161-187, 2003.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.2, p.37-52, 1987.

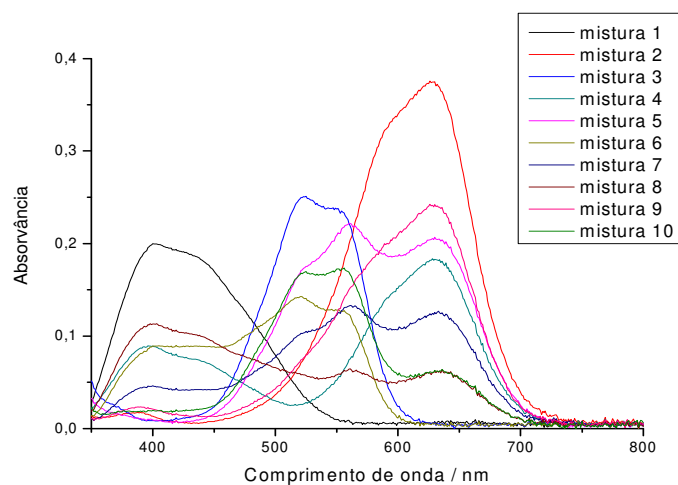
WONG, Y.; YU, J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v.33, p.3512-3520, 1999.

ZHAO, X.; HARDIN, I. R. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus Ostreatus*. **Dyes and Pigments**, v.73, p.322-325, 2007.

ZHAO, X.; HARDIN, I. R.; HWANG, H. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.57, p.1-6, 2006.

# ANEXOS

## ANEXOS

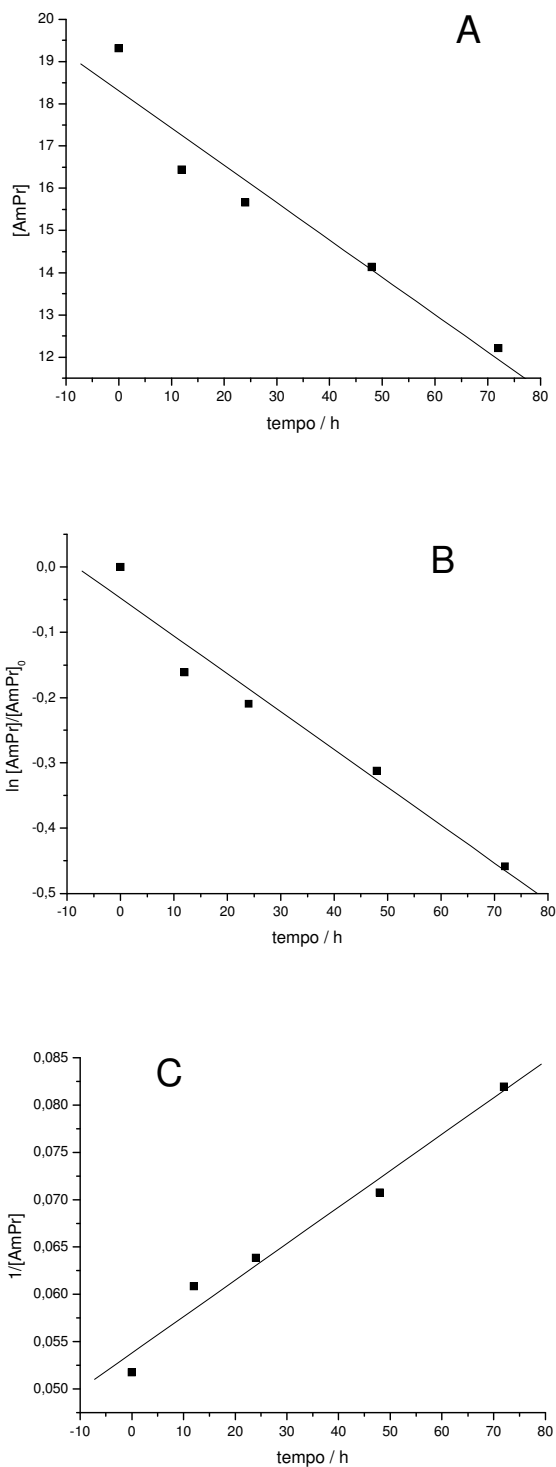


**Figura 1A.** Espectros UV-Vis das misturas da curva de calibração do Grupo 1.

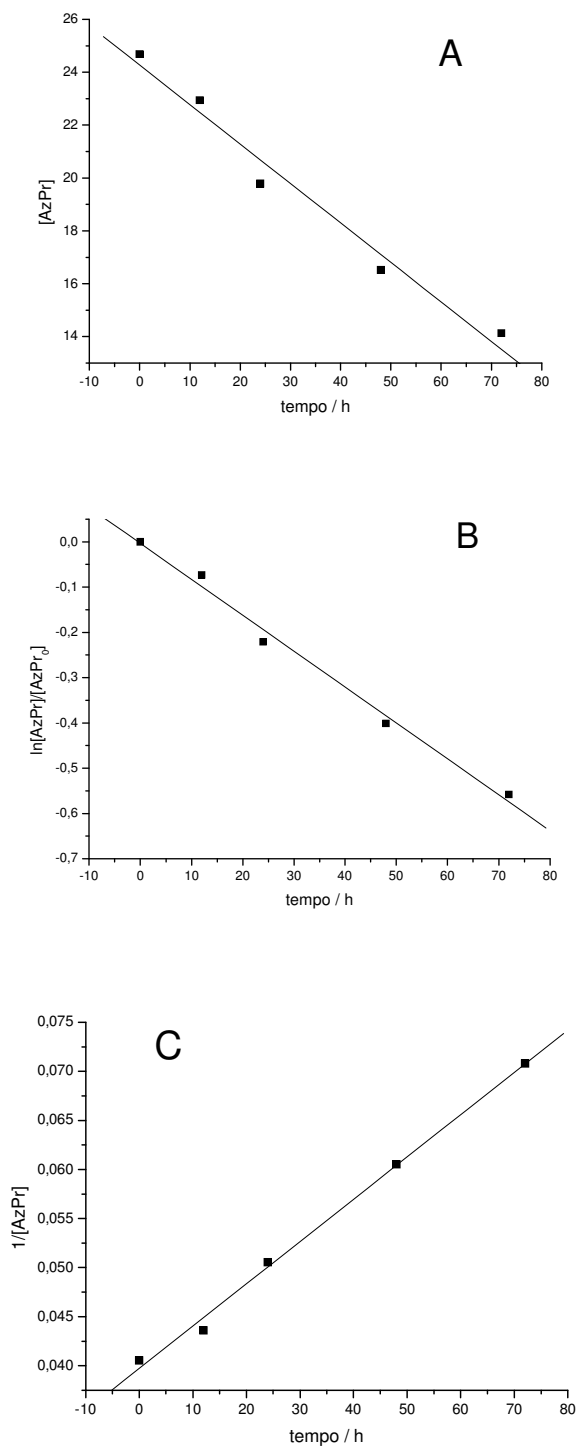
**Tabela 1A.** Concentrações experimentais, em mg L<sup>-1</sup>, das misturas da curva de calibração do Grupo 1.

Mistura	Amarelo Procion	Azul Procion	Vermelho Procion
1	24,185	0	0
2	0	24,185	0
3	0	0	24,185
4	12,092	12,093	0
5	0	12,092	12,093
6	12,093	0	12,092
7	8,061	8,061	8,061
8	16,123	4,031	4,031
9	4,031	16,123	4,031
10	4,031	4,031	16,123

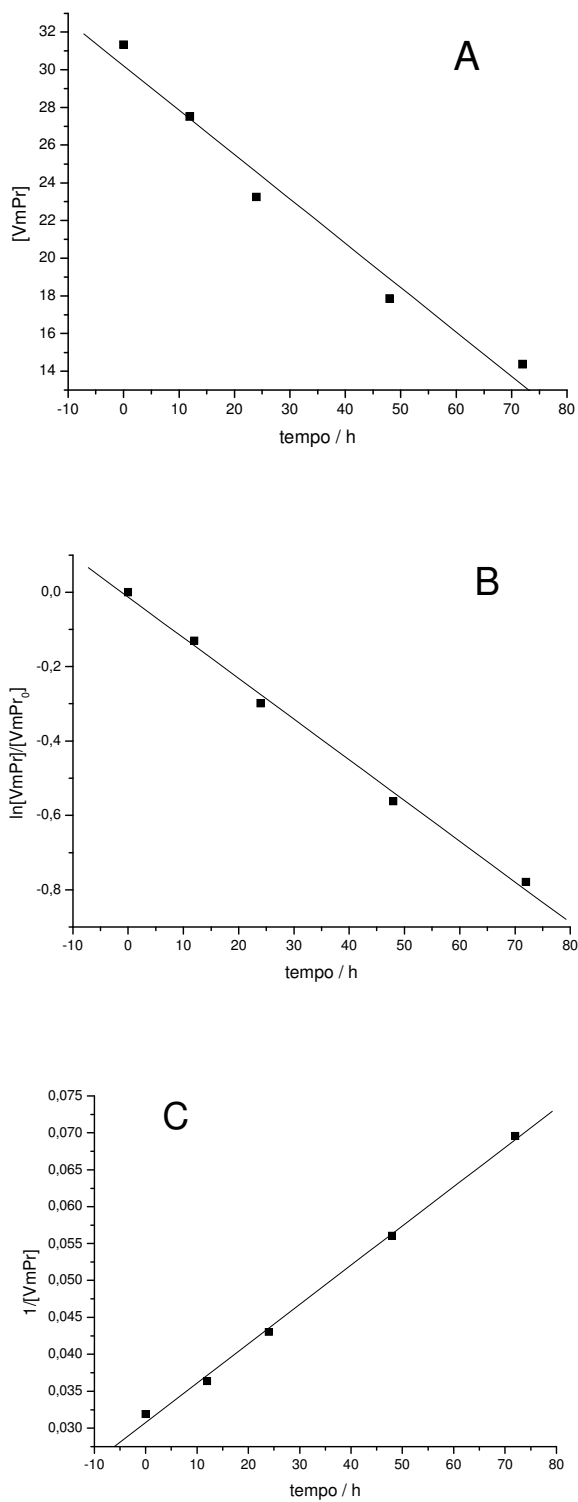




**Figura 2A.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C) do corante Amarelo Procion biodegradado pelo fungo *Ganoderma spp* a 28°C no efluente utilizando curva de calibração absorvância x concentração.



**Figura 3A.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C) do corante Azul Procion biodegradado pelo fungo *Ganoderma spp* a 28°C no efluente utilizando curva de calibração absorvância x concentração.



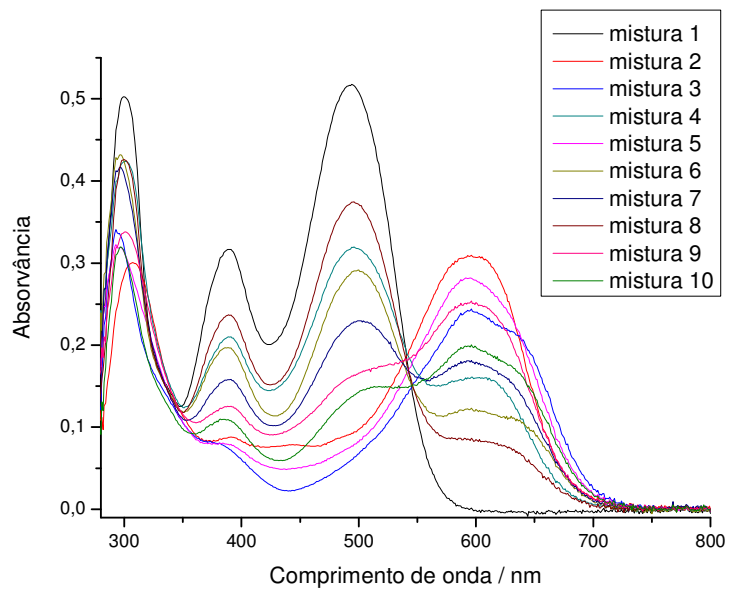
**Figura 4A.** Retas obtidas utilizando as leis cinéticas de ordem zero (A), primeira ordem (B) e segunda ordem (C) do corante Vermelho Procion biodegradado pelo fungo *Ganoderma spp* a 28°C no efluente utilizando curva de calibração absorvância x concentração.

**Tabela 2A.** Parâmetros cinéticos calculados para biodegradação dos corantes do Grupo 1 (Amarelo Procion, Azul Procion e Vermelho Procion) pelo fungo *Ganoderma spp* a 28°C.

Corante	Ordem	Equação da reta	R <sup>2</sup>	k / 10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>
Amarelo Procion	Zero	y = 18,30983-0,08842x	0,963	88,42
	1 <sup>a</sup>	y = -0,04776-0,00579x	0,978	5,79
	2 <sup>a</sup>	y = 0,0538+0,00038x	0,987	0,38
Azul Procion	Zero	y = 24,27253-0,14936x	0,987	149,36
	1 <sup>a</sup>	y = -0,00317-0,00793x	0,995	7,93
	2 <sup>a</sup>	y = 0,03974+0,00043x	0,998	0,43
Vermelho Procion	Zero	y = 30,21259-0,23553x	0,986	235,53
	1 <sup>a</sup>	y = -0,01226-0,04096x	0,998	10,96
	2 <sup>a</sup>	y = 0,03078+0,00053x	0,998	0,53

**Tabela 3A.** Concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) experimentais e calculadas dos corantes nas misturas 8 (2:1/2:1/2), 9 (1/2:2:1/2) e 10 (1/2:1/2:2) da curva de calibração do Grupo 1, utilizando curva de calibração absorvância x concentração.

Misturas	Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
	Experimental	Calculada
Amarelo Procion		
Ponto 8	16,12	12,82
Ponto 9	4,03	2,53
Ponto 10	4,03	2,37
Azul Procion		
Ponto 8	4,03	3,98
Ponto 9	16,12	15,57
Ponto 10	4,03	3,98
Vermelho Procion		
Ponto 8	4,03	4,20
Ponto 9	4,03	4,85
Ponto 10	16,12	11,52



**Figura 5A.** Espectros UV-Vis das misturas da curva de calibração do Grupo 2 (Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP.).

**Tabela 4A.** Concentrações experimentais ( $\text{mg L}^{-1}$ ) das misturas da curva de calibração do Grupo 2 (Remazol Brilliant Orange 3R, Azul Remazol RR e Azul Remazol R. ESP.).

Mistura	Remazol Brilliant Orange 3R	Azul Remazol RR	Azul Remazol R. ESP.
1	24,185	0	0
2	0	24,185	0
3	0	0	24,185
4	12,092	12,093	0
5	0	12,092	12,093
6	12,093	0	12,092
7	8,061	8,061	8,061
8	16,123	4,031	4,031
9	4,031	16,123	4,031
10	4,031	4,031	16,123