



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

**JOSÉ CARLOS VILAR JUNIOR**

**ELIMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA A DROGAS POR  
CÁDMIO EM *Pseudomonas aeruginosa* E  
DESCOLORAÇÃO DO PRETO DE REMAZOL POR  
CO-METABOLISMO**

**Recife**

**2011**

**JOSÉ CARLOS VILAR JUNIOR**

**ELIMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA A DROGAS POR  
CÁDMIO EM *Pseudomonas aeruginosa* E  
DESCOLORAÇÃO DO PRETO DE REMAZOL POR  
CO-METABOLISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de **Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

**Área de Concentração:** Desenvolvimento de Processos Ambientais.

**Linha de Pesquisa:** Biotecnologia e Meio Ambiente.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos Takaki

**Co-orientador :** Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

**Recife**

2011

**ELIMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA A DROGAS POR CÁDMIO EM *Pseudomonas aeruginosa* E APLICAÇÃO NA DESCOLORAÇÃO DO PRETO DE REMAZOL POR CO-METABOLISMO**

**José Carlos Vilar Junior**

**Examinadores:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos Takaki  
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP/PE  
(Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima  
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE/PE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarissa Dayse Costa Albuquerque  
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP/PE

**Suplentes:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thayza Christina M. Stamford  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB/PB

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra Amorim Salgueiro  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP/PE

Dedico este trabalho a Deus por estar sempre comigo em todos os momentos, a minha FAMÍLIA pela educação que me foi dada e pelo apoio incondicional para a realização deste trabalho e a Prof<sup>ª</sup>. Galba Takaki e ao co-orientador, Carlos Alves que tanto me ensinaram durante toda a caminhada.

Cada pessoa torna-se aquilo que passa a vida colaborando para ser.

*Walter Grando*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, luz que me conduz incessantemente nesta estrada e me ampara nos momentos de fraqueza;

Aos meus pais José Carlos Vilar (*in memoriam*) e especialmente a minha Mãe Eliane Simões Vilar, pelo apoio, carinho, incentivo e confiança que tanto depositou em mim, pois sem ela não poderia ter concluído tal trabalho;

À meus irmãos Fabiana Vilar e Gustavo Vilar e minha noiva Marianne Salgado, compreensivos com a minha ausência constante e pelo apoio e carinho em todos os momentos;

Aos meus orientadores, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Takaki e o Prof. Dr. Carlos Alves, pelo carinho, ensinamentos e oportunidade de crescimento profissional e pessoal;

Ao meu companheiros e amigos Ladiel Luis e Marcelo Andrade que me auxiliaram na realização deste trabalho;

À Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), na pessoa do seu Reitor Prof. Dr. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, o que muito contribuiu para minha formação;

Aos meus colegas do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Alex Silva, Amanda Alencar, Ana Claudia, Carolina Arruda, Gustavo Macedo, João Vitaliano, Ladiel, Jaceline Maria, Marcelo Andrade, Mirthys Marinho, Maria das Graças, e Romualdo Paraizo, por compartilharem os bons momentos e dificuldades desta jornada;

À todos os Colegas do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, pela atenção e apóio;

Ao CNPQ pelo apoio financeiro e PROCAD-CAPES pela bolsa sanduíche no programa de pós-graduação em engenharia química da UNICAMP

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Sônia Maria de Souza, André Felipe Santos Lima e Humberto Gomes de Almeida, que sempre se dispuseram a ajudar em todos os momentos;

À todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>CAPÍTULO I</b>	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
1.2. Objetivos	19
1.2.1. Objetivo geral	19
1.2.2. Objetivos específicos	19
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	20
<b>2.1. Indústria Têxtil</b>	20
<b>2.2. Corantes</b>	
2.2.1. Histórico	24
2.2.2. Estrutura e Classificação	25
2.2.3. Preto remazol	29
<b>2.3. Indústria têxtil no Brasil e no mundo</b>	30
<b>2.4. Perfil Ambiental</b>	31
2.4.1. Legislação brasileira para coloração das águas	34
<b>2.5. Problemas causados pelos corantes</b>	36
2.5.1. Características do efluente têxtil e seus principais contaminantes	38
2.4.2. Corantes e saúde humana	39
<b>2.6. Processos de tratamento de efluentes têxteis</b>	40
2.6.1. Métodos Químicos	43
2.6.2. Métodos Físicos	44
2.6.3. Métodos Biológicos	45
2.6.3.1. Biodegradação dos azocorantes por microrganismos	46
2.6.3.2. Biodegradação dos Corantes por Bactérias	50

<b>2.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	54
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	57
<b>CAPÍTULO II</b>	67
<b>Eliminação da Resistência a Drogas por Cádmio em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCP 1567 de Isolado Clínico</b>	68
<b>RESUMO</b>	69
<b>INTRODUÇÃO</b>	69
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	70
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	71
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	73
<b>CAPÍTULO III</b>	75
<b>Descoloração do Preto de Remazol por Estirpe <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Após Eliminação de Resistência a Drogas</b>	76
<b>RESUMO</b>	78
<b>INTRODUÇÃO</b>	79
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	80
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	82
<b>CONCLUSÕES</b>	84
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	84
<b>ANEXOS</b>	87
<b>CAPÍTULO IV</b>	91
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	92
<b>INSTRUÇÕES DAS REVISTAS</b>	93

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** Modelo de interação dos corantes reativos com a fibra têxtil (Hao et al., 2000). 22
- Figura 2** Produção de corantes no Brasil (ABEQUIN, 2010) 23
- Figura 3** Estrutura molecular característica de um corante têxtil (BANAT et al., 1996) 26
- Figura 4** Estrutura característica de um grupo cromóforo do azo corante Preto de Remazol (KUNZ et al., 2002) 29
- Figura 5** Mecanismo proposto para a redução dos azo corantes pelas células bacterianas (Pearce et al., 2003). 54

### SEGUNDO ARTIGO

- Figura 1.** Diagrama de Pareto mostrando os efeitos principais e interações das variáveis independentes. 89
- Figura 2.** Avaliação da toxicidade dos metabólitos formados durante o processo de descoloração. 89
- Figura 3.** Variação de PH durante o processo de remoção do azo corante 90 Preto Remazol

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Tabela 1** Estimativa do grau de fixação dos diferentes corantes nas fibras têxteis para o efluente, permitidos pela Sociedade de Corantes e Colorações  
Fonte: O'NEILL et al(1999) 21
- Tabela 2** Classificação dos corantes e pigmentos segundo a utilização Substrato  
Fonte: ABIQUIM (2010) 27
- Tabela 3** Processos de tratamento de efluentes  
Fonte: - "The textile industry and Environment". (1994) 41

### PRIMEIRO ARTIGO

- Tabela 1.** Antibiograma das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* selva - gem e após aclimatadas 71

### SEGUNDO ARTIGO

- Tabela 1.** Matriz codificada do planejamento fatorial  $2^3$  em relação à resposta de descoloração do Preto Remazol 88

## LISTA DE ABREVIATURAS

C.I. - Colour Index

UCP – Universidade Católica de Pernambuco

ITMF - International Textile Manufacturers Federation

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO - Demanda Química de Oxigênio

AOX- Produtos orgânicos halogenados

CMI- Concentração Mínima Inibitória

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute

## RESUMO

A *Pseudomonas aeruginosa* é um microorganismo patógeno oportunista, sendo considerado um dos mais importantes agentes de infecções hospitalares, devido a sua múltipla resistência aos diversos antibióticos existentes. É encontrada no solo, água, vegetais, animais, alimentos e em diversos ambientes hospitalares, devido ao seu elevado potencial de resistência pode realizar processos de biorremediação. Um dos maiores problemas ambientais gerados nas atividades de uma indústria têxtil é a grande quantidade de efluentes altamente poluidores gerados, dentre os poluentes destaca-se o corante preto de remazol, que tem causado sérios problemas ambientais, como afetar a transparência e estética dos corpos aquáticos, impedindo assim a penetração da luz solar, e por conseguinte a atividade fotossintética. Neste sentido, foram realizados estudos iniciais com a *P. aeruginosa* (UCP1567) isolada de ambiente hospitalar, através da eliminação de plasmídeos relacionados à resistência aos antibióticos, utilizando o cádmio. A amostra foi aclimatada duas vezes em meio Luria Bertani contendo glicose, através da Concentração Mínima Inibitória determinada para o cádmio (32µg/mL e 52 µg/mL, respectivamente) utilizando o método de diluição. Os resultados obtidos sugeriram que o metal pesado foi eficiente na eliminação dos plasmídeos de resistência, correspondendo a 84,61% para a aclimação com cádmio a 32µg/mL, e 92,30% para 52 µg/mL. Em seguida, a cultura após eliminação da resistência pelo cádmio, foi submetida ao processo de descoloração do preto de remazol através de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, tendo como variáveis independentes a agitação, a concentração do corante e o tamanho do inóculo, e como variável resposta, a descoloração do corante. Os resultados obtidos demonstraram que o potencial de biorremediação da *P. aeruginosa* não foi afetado, e que a cultura microbiana após eliminação de resistência, promoveu uma descoloração de 85-94,4% do corante, sob condições de repouso, e de 52% sob agitação de 100 rpm e 45% sob agitação de 200 rpm.

**Palavras-Chave:** *Pseudomonas aeruginosa*, metal pesado, resistência, descoloração, preto remazol.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen microorganism was considered one of the most important agents of nosocomial infections due to its multiple resistance to many existing antibiotics. It is found in soil, water, plants, animals, food and various hospital settings, due to its high potential for resistance can perform processes of bioremediation. One of the biggest environmental problems generated in the activities of a textile industry is the large number of highly polluting effluents generated among the pollutants out to the black dye Remazol, which has caused serious environmental problems such as transparency and affect the aesthetics of water bodies thus preventing the penetration of sunlight, and thus the photosynthetic activity. In this regard, initial studies were performed with *P. aeruginosa* (UCP1567) isolated from hospital environment through the elimination of plasmids related to antibiotic resistance, using cadmium. The sample was acclimatized twice in Luria Bertani medium containing glucose, through the Minimum Inhibitory Concentration determined for cadmium (32 $\mu$ g/mL and 52 mg / mL, respectively) using the dilution method. The results suggest that heavy metal was effective in eliminating the resistance plasmids, corresponding to 84.61% for acclimation to cadmium 32 $\mu$ g/mL, and 92.30% for 52 mg / mL. Then, after eliminating the culture of resistance by cadmium, was submitted to the decolorization of Remazol black through a 23 factorial design, with independent variables agitation, the dye concentration and inoculum size, and as the response variable discoloration of the dye. The results showed that the potential for bioremediation of *P. aeruginosa* was not affected, and that culture after removal of microbial resistance, caused a discoloration of 85 to 94.4% of the dye, under conditions of rest, and 52% and agitation of 100 rpm and 45% under agitation at 200 rpm .

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, heavy metal, resistance, discoloration, Remazol Black.

# CAPÍTULO I

## 1.INTRODUÇÃO

---

O gênero *Pseudomonas* compreende um grande número de espécies (em torno de 100) de bacilos Gram-negativos, diferenciada por meio de provas bioquímicas, testes de sensibilidade a antibióticos, formação de pigmento, número e localização dos flagelos (TOLEDO , TRABULSI, 1999; SILVA, 2005). Os membros deste gênero são os microrganismos freqüentemente mais isolados em corpos aquáticos e a presença não necessariamente indica possível risco à saúde pública. No entanto, *P. aeruginosa* tem sido utilizada na análise de águas recreacionais, devido à resistência ao processo de desinfecção química (TORANZOS ; McFETERS, 1996; SOUZA,et al., 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* é um dos microrganismos mais ubiqüitários, ou seja, é encontrada no solo, na água, em vegetais, animais, alimentos e nos mais diversos ambientes hospitalares. Considerada como patógeno oportunista, é um dos mais importantes agentes de infecção hospitalar (LINCOPAN,TRABULSI, 2004; FAGUNDES,2006).

Por outro lado, o cádmio normalmente está presente em águas naturais em pequenas concentrações, geralmente inferiores a 0,001 mg/L. A ingestão provoca disfunção renal, hipertensão, arteriosclerose, inibição no crescimento, doenças crônicas em idosos e câncer. O cádmio apresenta várias aplicações industriais, porém, é freqüentemente usado para a produção de pigmentos, pilhas elétricas e plásticos. Pequenas quantidades de cádmio são encontradas naturalmente no ar, na água, no solo, nos alimentos e no cigarro. Os fumantes são os mais expostos ao cádmio presentes no cigarro, mesmo em concentrações muito pequenas. A exposição ao cádmio ocasiona graves enfermidades. Existem atualmente algumas descrições de possíveis mecanismos de toxicidade do cádmio, entretanto, o modo real pelo qual este elemento age ainda está pouco esclarecido (KUMAR , WOROBEK, 2002; PEREIRA et al., 2004; BEGIC , WOROBEK, 2007).

Uma variedade de compostos tais como corantes de acridina, brometo de etidio, rifampicina, sal de bis-amônio, metais como a prata e mais

recentemente a tioridazina, uma fenotiazina, assim como antibióticos inibidores da subunidade B da DNA girase, novobiocina, coumermicina e fluorquinolonas têm sido reportadas para eliminar plasmídios (WEISSER ; WIEDMANN, 1985; FUK et al., 1988, RADHAKRISHNAN et al. 1999; PEREIRA , SIQUEIRA JÚNIOR, 2002). Neste sentido, estudos são justificados com o processo de eliminação de resistência a drogas em *P. aeruginosa* como contribuição na formação acadêmica e científica, além de fornecer subsídios para ampliar os conhecimentos na utilização de *Pseudomonas* na descoloração de ambientes contaminados por corantes (PEREIRA et al., 2004; CHOPRA et al., 2008).

Os efluentes industriais são freqüentemente misturados com esgotos sanitários antes de sua chegada à planta de tratamento do esgoto municipal, que predominantemente usa o processo de lodo ativado, para a descontaminação e mineralização do efluente, antes do mesmo ser lançado no ambiente (COUGHLIN et al., 2003; ANDREUS, 2010). O aporte de esgotos e rejeitos industriais promove alterações significativas nas características físico-químicas e microbiológicas dos ambientes aquáticos (ANDRADE et al., 1998; BARCELOS et al., 2009). Dessa maneira, inúmeros trabalhos empregados na degradação dos corantes dizem respeito à descoloração dos azo corantes, que na sua grande maioria são mais resistentes ao processo de degradação (CHOPRA et al., 2008; BARCELOS et al., 2009).

Cerca de um milhão de toneladas de corantes são produzidos anualmente no mundo (CAO et al. , 1999) Sendo os azo corantes caracterizados pela ligação azo ( $R_1-N=N-R_2$ ), representam aproximadamente 70% da produção (CARLIELL et al.,1995), sendo amplamente usados pela indústria têxtil, de alimentos e cosméticos (RAU et al. , 2002; BARCELOS et al., 2009). O preto de remazol, azo corante reativo, ou seja, corantes com grupos reativos que formam ligações covalentes com exxerção  $OH^-$ ,  $NH^-$  ou grupos  $SH^-$ , têm sido usado na indústria têxtil, embora, apresente baixo grau de fixação às fibras (10-50%) (SANTOS et al., 2003; PAVLOSTATHIS, 2005). A elevada solubilidade na água, faz com que os azo corantes não sejam degradados por plantas convencionais de tratamentos de esgotos (PAGA, 1986; KUDLICH et al., 1999; PAVLOSTATHIS, 2005). Deste modo, efluentes coloridos contendo o azo corante reativo preto de remazol têm causado sérios

problemas ambientais, principalmente, porque estes compostos, quando presentes na água são altamente visíveis, afetando a transparência e estética do corpo aquático (SUPAKA et al., 2004; BELISÁRIO, et al,2009).

Dentre as opções mais econômicas e viáveis para o tratamento dos efluentes coloridos, os sistemas biológicos se apresentam como os mais práticos e de baixo custo (MENDEZ-PAZ et al., 2005)

Dessa maneira, torna-se importante a busca de linhagens microbianas, que apresentem elevado potencial de descoloração, através da clivagem reductiva do grupo azo na molécula dos corantes têxteis. Contudo, o maior entrave no uso de *Pseudomonas aeruginosa* é que trata-se de um patógeno oportunista que geralmente apresenta elevada resistência a antimicrobianos.

Nesse sentido a investigação de eliminação de resistência a drogas, empregando o cádmio, tornará possível o emprego de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* no processo de descoloração, como uma possibilidade de ampliação do uso de microrganismos no tratamento biológico.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o processo de eliminação de resistência a drogas usando cádmio (metal pesado) em *Pseudomonas aeruginosa* e posterior aplicação no processo de descoloração do corante preto de remazol através do processo de co-metabolismo.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Realizar o perfil de susceptibilidade a antibióticos em estirpe de *P. aeruginosa*;
- 2) Investigar o perfil de resistência ao cádmio em *P. aeruginosa*;
- 3) Investigar a eliminação de resistência a drogas em *P. aeruginosa* por meio de aclimatação em cádmio;
- 4) Empregar um planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central, para analisar os efeitos e interações das variáveis independentes agitação, concentração do corante e tamanho do inóculo sobre a variável resposta descoloração do preto de remazol.;
- 5) Investigar o processo de co-metabolismo de *P. aeruginosa* no processo de descoloração;

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1. Indústria Têxtil

As indústrias têxteis constituem fator de grande importância na economia brasileira. Essas indústrias são agrupadas em três categorias principais: tecidos de algodão, de lã e sintéticos. Das 45 milhões de toneladas de fibras consumidas, mais de 50% são de algodão (AGUIAR , SCHONBERGER, 1995; CARVALHO et al., 2010).

Nos últimos vinte anos tem havido uma preocupação mundial com a degradação do meio ambiente, principalmente com a qualidade da água que o homem utiliza. A alta descarga de águas residuárias industriais e de aglomerados urbanos em rios, torna o problema de contaminação de mananciais evidente, elevando a consciência do público sobre as condições do impacto negativo causado por este tipo de ação sobre o meio ambiente (LEONAS , LEONAS, 1994; ANDREUS et al., 2010).

Os corantes apresentam estruturas moleculares complexas que podem envolver, durante seu processo de síntese, até 500 reações intermediárias (ZANONI,CARNEIRO, 2001;BARCELOS et al., 2009). A forma de fixação da molécula do corante nas fibras têxteis geralmente ocorre em solução aquosa, podendo envolver basicamente quatro tipos de interações: ligações iônicas, ligações de hidrogênio, ligações de Van der Waals e ligações covalentes (GUARATINI , ZANONI, 2000;BARCELOS et al.,2009; ANDREUS, 2010).

O volume de água usado durante o processamento é muito grande, variando de 120 a 380 litros por metro de tecido processado (BALAN, 2005). Durante o banho de tingimento, os corantes são hidrolisados, geralmente em altas temperaturas (50 a 135°C), com concentrações que variam de 10 mg L<sup>-1</sup> a 1000 mg L<sup>-1</sup> , dependendo do poder de reação do corante e do processo de tingimento utilizado, como por exemplo, intensidade da cor (TUNUSSI , ALEM SOBRINHO, 2002; ANDREUS, 2010).

Devido à competição entre a celulose (Cello-) e íons OH- nos banhos contendo corantes reativos em condições típicas de tingimento, ou seja, pH maior ou igual a 10 e concentração de sais variando de 60 a 100 g L<sup>-1</sup>, calcula-se perdas dos corantes de 20 a 50%, devido à não fixação na forma hidrolisada (Tabela 1). Esta falta de afinidade pela fibra têxtil resulta, conseqüentemente, no efluente colorido (TUNUSSI , ALEM SOBRINHO, 2002; BEYDILLI , PAVLOSTATHIS, 2005). Os corantes hidrolisados ocorrem quando a molécula do corante reage com a água no lugar da hidróxila de celulose, devido sua alta solubilidade na água e as características de brilho dos corantes (PEARCE et al., 2003) (Figura 1).

Tabela 1. Estimativa do grau de fixação dos diferentes corantes nas fibras têxteis e perdas para o efluente, permitidos pela Sociedade de Corantes e Colorações.

Classes de aplicação dos corantes	Fibras	Grau de fixação (%)	Perda para o efluente (%)
Ácidos	Poliamida	89-95	5 - 20
Básicos	Acrílico	95-100	0 - 5
Diretos	Celulose	70-95	5 - 30
Dispersos	Poliéster	90-100	0 - 10
Complexados com metal	Lã	90-98	2 - 10
Reativos	Celulose	50-90	10 - 50
Sulfurados	Celulose	60-90	10 - 40
Vat	Celulose	80-95	5 - 20

Fonte: O'NEILL et al (1999)

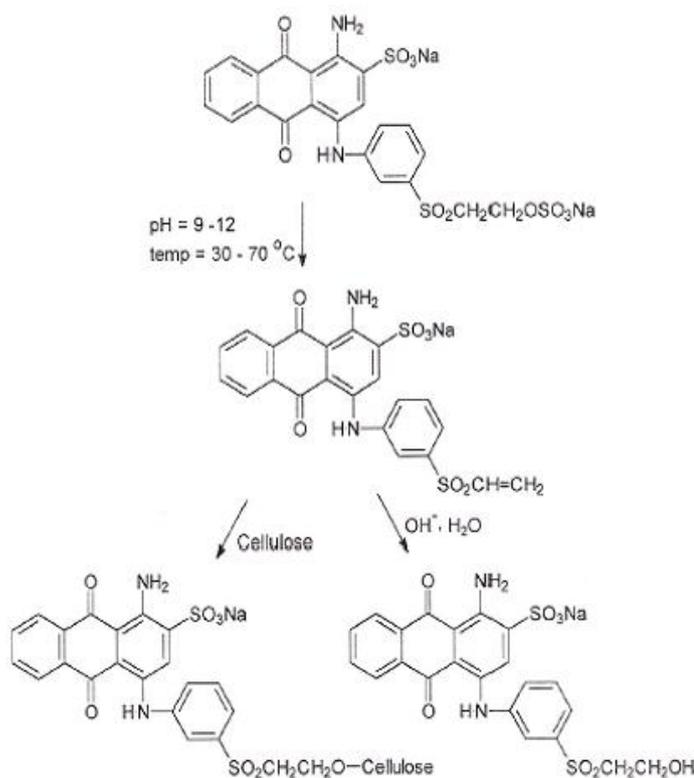


Figura 1. Modelo de interação dos corantes reativos com a fibra têxtil (Hao et al., 2000).

Por causa do seu baixo custo de síntese, estabilidade e variedade de cores quando comparado aos corantes naturais, os corantes sintéticos têm sido extensamente usados na indústria têxtil, de papel, borracha, plásticos, cosméticos, farmacêutica e de alimentos (CHAGAS, DURRANT, 2001; GONG et al., 2005; SOUZA, ROSADO, 2009).

Visando atender à grande demanda comercial, o setor industrial tem investido no desenvolvimento de corantes econômicos, com propriedades específicas, a fim de obter boa fixação da coloração nos tecidos e elevada resistência aos agentes de desbotamento (CORREIA et al., 1994). Dessa maneira, nos últimos 100 anos, mais de 100 mil corantes comerciais têm sido sintetizados, com uma produção anual em torno de um milhão de toneladas, sendo 54.000 toneladas somente no Brasil (SELVAM et al., 2003; ADEDAYO et al., 2004; ABIQUIM, 2010) (Figura 2).

No Brasil, até 1985 o algodão e as fibras naturais detinham 70% do consumo interno. Atualmente, as fibras químicas avançam com rapidez,

representando um percentual de 40% do consumo (TEIXEIRA, 2003). De acordo com a Associação Brasileira de Produtores de Fibras Artificiais e Sintéticas (Abrafas), a fabricação nacional de fibras químicas em 2002 era de 366 mil toneladas, versus um consumo no mesmo período de 464 mil toneladas, números não muito diferentes dos estimados para 2003 (SANT ANNA, 2004; SOUZA, ROSADO, 2009)



Figura 2. Produção de corantes no Brasil (Abiquim, 2010).

A utilização de corantes têxteis no país se concentra, principalmente, nos corantes reativos para fibras celulósicas, que hoje respondem por 57% do mercado, seguido pelos corantes dispersos, com 35%; poliamida, com 3% e acrílico, com 2% (ABIQUIM, 2010).

O consumo de fibra têxtil per capita no Brasil até 1990 era estimado em 7,7 kg/habitante, passando para 11,2 kg em 2000. Hoje, o consumo no Brasil chega a 8,5 kg/habitante/ano enquanto que no mundo o índice é de 14 Kg/habitante/ano (TEIXEIRA, 2003; MACHADO et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Atualmente, o setor têxtil/confeccionista brasileiro é importante no mercado global, porque movimenta cerca de US\$ 22 bilhões ao ano, produzindo 7,2 bilhões de peças anualmente em mais de 30 mil empresas,

além de empregar 1,4 milhões de trabalhadores (INFORMATIVO ABIT, 2010). Dessa maneira, o Brasil é o terceiro produtor mundial de tecidos de malha, o quinto em peças confeccionadas e o sétimo em fios e filamentos, ou seja, encontra-se em sétimo lugar na produção têxtil mundial (COSTA, 2005 MACHADO et al. , 2006;NOZU et al., 2010 ).

Devido a uma tendência mundial, a indústria de corantes no Brasil, tem se esforçado para atender às regras de proteção ambiental, embora a aplicação destes corantes no processo de tinturaria constitua efetivamente um sério problema, uma vez que um grande número destas indústrias é de pequenas empresas, tornando difícil a atividade de fiscalização (GUARATINI , ZANONI, 2000; MACHADO et al. , 2006; SILVA et al. , 2008).

## **2.2. Corantes**

### **2.2.1. Histórico**

O homem utiliza as cores há mais de 20 mil anos, sendo o Negro-de-Fumo (Carbon Black) o primeiro corante a ser conhecido pela humanidade. Por volta de 3.000 a.C., foram produzidos alguns corantes inorgânicos sintéticos, como por exemplo, o Azul Egípcio (ABIQUIM, 2010).

Durante séculos, e até a metade do século 19, só existiam pigmentos naturais, provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais. Entretanto, muitos corantes naturais utilizados na Antigüidade ainda são empregados em larga escala, como é o caso do índigo, um pigmento azul, extraído da *Indigofera tinctoria* L.; alizarina, extraído da raiz de *Rubia tinctorium* L. e henna, extraído de *Lawsonia inermis*, utilizada na indústria de cosméticos (ZANONI ,CARNEIRO, 2001; QMCWEB, 2004; SOUZA , ROSADO ,2009).

O primeiro corante sintético foi descoberto na Inglaterra, em 1856, pelo químico Willian H. Perkin (1838-1929), que o obteve como produto da oxidação da anilina ( $C_6H_7N$ ) com o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), como um

precipitado de coloração avermelhada, denominado de Malva. No fim do século 19, os fabricantes dos corantes sintéticos, estabeleceram-se na Alemanha, Inglaterra, França e Suíça, suprimindo as necessidades das indústrias que, na época, fabricavam tecidos, couro e papel (ZANONI , CARNEIRO, 2001; ABIQUIM 2010).

Até a Segunda Guerra Mundial, a Alemanha manteve o monopólio sobre a produção de corantes sintéticos, sendo hoje a indústria dos Estados Unidos, a maior fonte exportadora destes produtos, colocando no mercado aproximadamente dois mil diferentes tipos de corantes sintéticos (GUARATINI , ZANONI, 2000; PANDEY ,UPADHYAY,2010).

Com o fim da Segunda Guerra Mundial a manufatura e comercialização dos corantes se tornou intensa e, atualmente o Colour Index, um catálogo usado para classificação internacional dos corantes, criado pela Sociedade de Corantes e Colorações, fundada em 1924, registra mais de oito mil corantes orgânicos sintéticos associados à indústria têxtil (O NEILL et al., 1999; ZANONI, CARNEIRO, 2001; PANDEY , UPADHYAY,2010)

### **2.2.2. Estrutura e Classificação**

Estruturalmente, a molécula do corante utilizada para o tingimento da fibra têxtil se divide em duas partes distintas, um grupo cromóforo, também conhecido como azo, antraquinona, nitro, etc., que é responsável pela cor, e grupos auxiliares, ou seja, grupos aromáticos que propiciam sua afinidade pela fibra têxtil natural ou sintética (CORREIA et al., 1994; KUNZ et al., 2002; ZANONI , CARNEIRO, 2003; SILVA et al. , 2008), além da propriedade de absorver luz na região visível (BANAT et al., 1996) (Figura 3)

Diversos corantes são de difícil descoloração devido à sua estrutura complexa e origem sintética (SESHADRI et al., 1994; ROBINSON et al., 2001; NOZU et al., 2010). Segundo Nigam et al. (1996) compostos azo com um

grupo hidroxila ou um grupo amina são mais fáceis de serem degradados do que compostos com grupos metil, sulfo ou nitro.

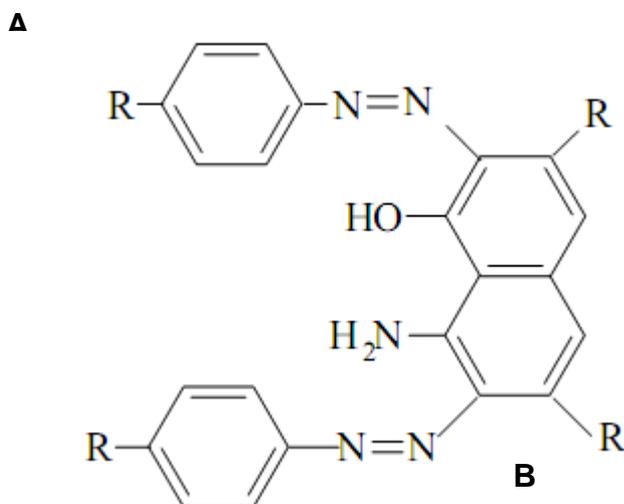


Figura 3. Estrutura molecular característica de um corante têxtil (A) onde o grupo cromóforo é da família azo (B) (BANAT et al., 1996)

De acordo com o Colour Index (CI) os corantes e pigmentos podem ser classificados em 26 tipos, segundo os critérios da classe química e em 20 tipos, além de algumas subdivisões, do ponto de vista de aplicações (Tabela 2)(ABIQUIM, 2010). Essa diversidade ocorre principalmente porque cada tipo de fibra a ser colorida requer corantes com características próprias e bem definidas (GUARATINI, ZANONI, 2000; ABIQUIM, 2010)

Com relação à estrutura química, o corante é conhecido através de um número CI que lhe é atribuído; onde a primeira palavra corresponde à classificação do corante e a segunda palavra, corresponde à sua coloração ou tonalidade, como por exemplo, o corante ácido Amarelo 36 (CI 13065) (HAO et al., 2000; MACHADO et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Tabela 2. Classificação dos corantes e pigmentos segundo a utilização por Substrato

<b>Classes</b>	<b>Principais campos de aplicação</b>
Branqueadores	Detergentes , fibras naturais, fibras artificiais,
Ópticos	fibras sintéticas óleos , plásticos ,sabões, tintas e papel
<b>Corantes</b>	
À Cuba Sulfurados	Fibras naturais e fibras artificiais
À Tina	Fibras naturais
Ácidos	Alimentos, Couro, fibras naturais Fibras sintéticas , lã e papel
Ao enxofre	Fibras naturais
Azóicos	Fibras naturais e fibras sintéticas
Básicos	Couro, fibras sintéticas ,lã , madeira e papel
Diretos	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
Dispersos	Fibras artificiais e fibras sintéticas
Mordentes	Aluminio , lã, fibras naturais e fibras sintéticas
Reativos	Couro , fibras naturais fibras artificiais e papel
Solventes	Ceras, cosméticos, gasolina, madeira, plásticos, solventes orgânicos tintas de escrever e vernizes
<b>Pigmentos</b>	
Orgânicos	Tintas gráficas, tintas e vernizes , estamparias textil e Plástico
pigmentos inorgânico	Tintas gráficas, tintas e vernizes , estamparias textil e Plástico

Fonte: ABIQUIM (2010)

Os corantes ácidos são corantes aniônicos solúveis em água com diferentes grupos cromóforos e grupos funcionais como nitro-, carboxil- e ácido sulfanílico; quando adicionado um grupo sulfanílico, a molécula insolúvel em água se torna solúvel. Os corantes básicos são do tipo catiônico com o grupo cromóforo tipicamente apresentando grupos aminas. Os corantes diretos são sais altamente solúveis em água, enquanto os corantes de dispersão são moléculas não-aniônicas, altamente insolúveis em água quando aplicadas às fibras hidrofóbicas (HAO et al., 2000; SCHRANK, et al. , 2007 ).

Com relação à fixação dos corantes, o grupo mais representativo e amplamente empregado pertence à família azo, que representa cerca de 60-80% (TUNUSSI , SOBRINHO, 2002; RISMAYANI et al., 2004; SILVA et al., 2004) dos mais de dez mil corantes aplicados nas indústrias de processamento têxtil (SPONZA, ISIK, 2004), seguido pelo grupo antraquinona (KONSTANTINOUS , ALBANIS, 2004; SCHRANK, et al. , 2007 ; SILVA et al. , 2008).

Por outro lado, o grupo azo pode ser dividido em monoazo, diazo e triazo, de acordo com a presença de uma ou mais ligações nitrogênio-

nitrogênio ( $-N=N-$ ) ligados a sistemas aromáticos (MANU , CHAUDHARI, 2003), podendo também apresentar grupos do ácido sulfanílico (CHAGAS , DURRANT, 2001; NOZU et al., 2010).

Os corantes reativos diferem de todas as outras classes de corantes porque se ligam às fibras têxteis, como o algodão, por ligações covalentes (AKSU , DONMEZ, 2003; BEYDILLI , PAVLOSTATHIS, 2005). Eles também formam ligações com grupos amino, hidróxila e tióis nas fibras protéicas e também com grupos amino dos poliamidas. Nos diferentes corantes reativos existentes, os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoctilsulfonila como grupos reativos (GUARATINI , ZANONI, 2000; ABEQUIM, 2010).

Semelhantes aos corantes diretos, estes corantes também são corantes aniônicos altamente solúveis em água (HAO et al., 2000), no entanto, apresentam características favoráveis como cor luminosa, fácil aplicação, com baixo custo e consumo de energia (KUNZ, et al., 2002; AKSU , DONMEZ, 2003) e alta estabilidade quando molhados (PEARCE et al., 2003; BEYDILLI , PAVLOSTATHIS, 2005; ABEQUIM, 2010).

Os corantes básicos apresentam alto brilho e intensidade de cor, tornando-os mais difíceis de descolorir. Os corantes complexados com base em metal e cromo são compostos carcinogênicos, enquanto os demais corantes dispersivos demonstram tendência de bioacumulação. Íons de metais pesados presentes nos efluentes têxteis, têm sido reportados em altas concentrações na água e plantas (BANAT et al., 1996 NOZU et al., 2010).

Dessa maneira, a recalcitrância dos azo corantes foi atribuída à presença de grupos sulfurados e ligações azo, duas características consideradas geralmente xenobióticas. A ligação azo na molécula do corante é vulnerável a clivagem redutiva (KUDLICH et al., 1996; PINHEIRO et al., 2004). Por outro lado, os corantes baseados em antraquinonas são altamente resistentes à degradação, devido suas estruturas aromáticas fundidas (DONG et al., 2003; NOZU et al., 2010).

### 2.2.3 Preto Remazol

O Preto Remazol ( $C_{26} H_{21} N_5 Na_4 O_{19} S_6$ ) é um dos mais antigos corantes reativos e um dos mais utilizados pela indústria têxtil. Seu peso molecular é de 991,82 g. (figura4)(KUNZ, et al.,2002). Apresenta em sua estrutura dois grupos azo (-N = N-) ligados a sistemas aromáticos, que constituem o grupo cromóforo, que absorve no comprimento de onda de 597 nm (MOTTA, 2008).

O preto de remazol, azo corante reativo, ou seja, corantes com grupos reativos que formam ligações covalentes com OH-, NH- ou grupos SH-, é extensivamente usados na indústria têxtil, embora, apresente baixo grau de fixação às fibras (10-50%) (SANTOS et al., 2003; MOTTA,2008).

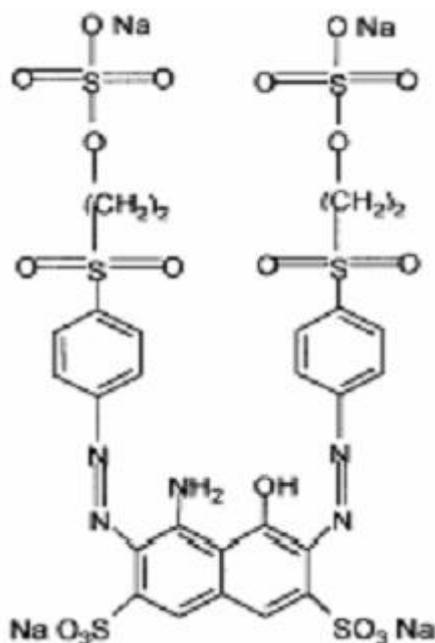


Figura 4- Estrutura característica de um grupo cromóforo do azocorante Remazol Black B. (KUNZ et al., 2002)

### **2.3. Indústria têxtil no Brasil e no mundo**

O ramo têxtil é um dos setores de maior tradição dentro do segmento industrial. Apresenta uma posição de destaque na economia dos países mais desenvolvidos e, é o carro-chefe de muitos dos chamados países emergentes, que devem à indústria têxtil um papel de destaque no comércio mundial. Utilizando-se como base os dados da ITMF (International Textile Manufacturers Federation), entidade que congrega os representantes dos principais países produtores, e da OMC - Organização Mundial do Comércio, verifica-se que o mercado têxtil mundial vem registrando uma significativa expansão, tanto no que se refere aos montantes produzidos, quanto ao comércio entre os grandes países produtores e consumidores. Este crescimento tem sido possibilitado pela expansão no número de consumidores em todo o mundo, pelo aumento da renda nos países mais desenvolvidos e, pela abertura dos mercados ao comércio internacional (TEXTILIA NET, 2004; RODRIGUES, et al. , 2010).

A indústria têxtil pode ser considerada um dos setores mais importantes da economia brasileira com grande peso na balança comercial. É formada por 30 mil empresas que geram mais de 1,5 milhões de empregos diretos e, faz do Brasil, o 7º maior produtor têxtil mundial. Em 2003 este setor apresentou um faturamento de US\$ 22,7 bilhões, de acordo com o Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior (MDIC, 2003). Desempenham um papel de grande relevância no processo de desenvolvimento do país, com um faturamento total equivalente a 4,4% do PIB brasileiro e emprega cerca de 1,9 % da população ativa. Certamente este é um setor de grande importância, proporcionando o crescimento da economia interna e, a busca de novas tecnologias que contribuam para a economia do país, com forte impacto social e ambiental (CETESB, 2000).

No Nordeste, mais especificamente em Pernambuco e no Ceará, vem se observando nos últimos anos uma tendência de instalação de empresas deste setor, atraídos por benefícios fiscais. Segundo levantamento da FIEPE (Federação das Indústrias do Estado de Pernambuco), encontra-se instalado no estado cerca de 83 indústrias, cujo perfil segue o cenário nacional, ou seja, cerca de 90% são micro, pequena e média empresas. Dessas empresas segundo levantamento realizado pela Agência Estadual de Meio Ambiente e Recurso Hídricos de Pernambuco (CPRH), cerca de 37 são cadastradas no órgão ambiental, portanto um grande número encontra-se irregular perante a legislação ambiental (SILVA, 2005).

#### **2.4. Perfil Ambiental**

Em decorrência das tendências da moda e demanda do consumidor, o setor industrial tem cada vez mais desenvolvido novos reagentes, novos processos, maquinaria e técnicas para a confecção de seus produtos, colocando o ambiente em contato com diversos tipos de poluentes; interrompendo assim o equilíbrio natural, devido à recalcitrância de grande parte destes compostos (BALAN, 2005). Embora, o destino dos poluentes no ambiente natural, seja largamente afetado por processos abióticos, como foto-oxidação e atividade metabólica dos microrganismos, estes processos são bastante lentos, podendo causar sérios transtornos ecológicos (KNACKMUSS, 1996;BELSÁRIO et al., 2009;SOUZA,et al., 2010).

Do ponto de vista ambiental, a indústria têxtil tem sido considerada de grande impacto, tendo em vista a descarga de grandes volumes de rejeitos contendo altas cargas de compostos e efluentes fortemente coloridos (McKAY, 1979; CORREIA et al., 1994). Uma indústria de natureza têxtil pode ocasionar a entrada de corantes sintéticos no meio ambiente por quatro vias: emissões ou descargas de efluentes nos processamentos rotineiros, descarte de sobras e resíduos do processo, descarte de embalagens

usadas e, também, por meio da eliminação acidental (BOLETIM ETAD, 1995; SOUZA, et al., 2010).

Embora o volume do corante produzido por uma indústria têxtil, a princípio, possa parecer pouco expressivo, é fundamental considerar o alto potencial de coloração destes compostos. Os corantes são detectáveis pelo olho humano em concentrações de 1 mg/L (GUARATINI, ZANONI, 2000), podendo ainda ser menor no caso dos corantes reativos, onde a concentração detectada está em torno de 5 mg/L (PIERCE, 1994; BELSÁRIO et al., 2009; SOUZA, et al., 2010).

Características como estabilidade estrutural e diversidade de cores são requisitos importantes na escolha de um corante a ser utilizado na indústria têxtil (CORREIA et al., 1994). Tal necessidade gera produtos que são difíceis de degradação por processos biológicos (BANAT et al., 1996; NOZU, et al., 2010), ou de outra forma, podem apresentar uma cinética de degradação lenta por microrganismos no ecossistema (KIRBY et al., 1995; NOZU et al., 2010; SOUZA, et al., 2010).

Os efluentes industriais são freqüentemente misturados com esgotos sanitários antes de sua chegada à planta de tratamento do esgoto municipal, com muitos municípios confiando predominantemente no processo de lodo ativado, para a desintoxicação e mineralização do efluente, antes do mesmo ser lançado no ambiente (COUGHLIN et al., 2003). O aporte de esgotos e rejeitos industriais promove alterações significativas nas características físico-químicas dos ambientes aquáticos (ANDRADE et al., 1998; ABEQUIM, 2010). Dessa maneira, inúmeros trabalhos empregados na degradação dos corantes diz respeito à descoloração dos azo corantes, que na sua grande maioria, são mais resistentes ao processo de degradação (WALKER, WEATHERLEY, 2000; ANDREUS, 2010).

Do ponto de vista ambiental, as indústrias têxteis consomem grandes volumes de água e substâncias químicas no processo de tingimento de seus tecidos. O impacto ambiental proveniente destas indústrias ocorre principalmente, devido a sua descarga altamente colorida em águas receptoras, que afeta principalmente a atividade de fotossíntese, devido à baixa

penetração da luz (DONMEZ, 2002, GEORGIU et al., 2004; ABEQUIM, 2010; ANDREUS, 2010).

Os efluentes das indústrias têxteis também apresentam altas concentrações de compostos orgânicos, como amido, dextrinas, gomas, graxas, pectinas, álcoois, ácido acético, sabões e detergentes; compostos inorgânicos como, hidróxido de sódio, carbonato, sulfato e cloreto, além de corantes que contêm metais pesados (CORREIA et al., 1994; ANDRADE et al., 1998, BALAN, 2005; CARVALHO et al., 2010).

Em grandes concentrações, os metais pesados apresentam ação tóxica sobre os microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, reduzindo assim, a capacidade auto-depurativa dos corpos aquáticos (CID et al., 1995). Por outro lado, a presença de alcalóides ou ácidos no processo de branqueamento, engomagem e demais etapas na lavagem, resulta em um elevado pH e elevado teor de sais (BUI TRON et al., 2004 CARVALHO et al., 2010; NOZU et al., 2010).

Embora, o volume de corante produzido por uma indústria têxtil, a princípio, possa parecer pequeno, o alto potencial de coloração destes compostos não pode ser esquecido. A percepção pública da qualidade da água é fortemente influenciada pela cor. Assim, a presença de cor não natural é esteticamente desagradável e tende a ser associada com contaminação (NIGAM et al., 1996; PEARCE et al., 2003; GONG et al., 2005). Alguns pesquisadores têm relatado quantidades de 1,56 mg dm<sup>-3</sup> do corante como sendo detectada nos cursos d'água, embora concentrações tão baixas quanto 0,005 mg dm<sup>-3</sup> sejam visíveis em águas claras de rios (BANAT et al., 1996; O'NEILL et al., 1999) particularmente nas regiões do espectro entre o vermelho e o púrpura (PIERCE, 1994 ; CARVALHO et al., 2010).

Em muitos países desenvolvidos, a legislação governamental está se tornando mais exigente com relação à remoção dos corantes dos efluentes industriais. Na Europa, as leis de proteção ambiental vêm promovendo a prevenção da transferência de problemas de poluição de um ambiente para o outro, implicando para a maioria das indústrias o desenvolvimento

de técnicas para o tratamento de seus próprios efluentes antes de serem descartados (BANAT et al., 1996; ANDREUS, 2010; CARVALHO et al., 2010).

Conforme a Lei 9.433/1997, regulamentada pelo Decreto no 50.877, da Constituição Federal Brasileira, os efluentes industriais somente poderão ser lançados nas águas, depois de tratados.

Segundo a Resolução 20/86 no Artigo 21 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) não há padrão de emissão para a cor, existem apenas padrões de qualidade. Em regiões de pouca água, por exemplo, no nordeste do Brasil, pelo reduzido poder de diluição, a cor deve, na maioria dos casos, ser removida do efluente em nível que não ocorra coloração das águas do receptor. Na ausência de métodos para emissão de cor do efluente, recomenda-se seguir a metodologia contida no Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater (APHA/AWWA/WEF, 1992).

#### **2.4.1. Legislação brasileira para coloração das águas**

Divisão das águas doces conforme seu uso:

Classe Especial - águas destinadas:

- a) abastecimento doméstico sem prévia ou com simples desinfecção.
- b) à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas.

Classe I - águas destinadas:

- a) ao abastecimento doméstico após tratamento simplificado;
- b) à proteção das comunidades aquáticas;

- c) à recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho);
- d) à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película;
- e) à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana.

Nesta classe de águas os corantes artificiais devem estar virtualmente ausentes e com nível de cor natural do corpo de água em mg Pt/l.

#### Classe 2 - águas destinadas:

- a) ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional;
- b) à proteção das comunidades aquáticas;
- c) à recreação de contato primário (esqui aquático, rotação e mergulho);
- d) à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas;
- e) à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana.

Em águas de classe 2 não será permitida a presença de corantes artificiais que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração convencionais. A cor no corpo d água não deve ultrapassar 75mg Pt/l.

#### Classe 3 - águas destinadas:

- a) ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional;
- b) à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;
- c) a dessedentação de animais.

Em águas de classe 3 não será permitida a presença de corantes artificiais que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração convencionais. A cor no corpo d água não deve ultrapassar 75mg Pt/l.

Classe 4 - águas destinadas:

- a) à navegação;
- b) à harmonia paisagística;
- c) aos usos menos exigentes.

Nesta classe de água os corantes devem estar virtualmente ausentes.

Não há padrões de coloração para efluentes, apenas para os corpos receptores, porém os efluentes não poderão conferir ao corpo receptor características em desacordo com o seu enquadramento (RESOLUÇÃO CONAMA, 1986).

## **2.5. Problemas causados pelos corantes**

Apesar da grande quantidade de resíduos gerada pelas indústrias em todo mundo, as informações disponíveis sobre a toxicidade causada pelo impacto dos rejeitos nos ecossistemas aquáticos são muito pouco difundidas. Nota-se, porém, que a poluição dos corpos hídricos, a partir destes compostos, provoca alterações nos ciclos biológicos podendo causar toxicidade aguda e crônica às comunidades ali presentes (BANAT et al., 1996; SPELLMEIER, STULP, 2009).

A cor do efluente líquido é resultado de processos usados na indústria, entre eles: o tingimento e o enxágüe. Na etapa de tingimento são usados auxiliares de tinturaria, entre os quais os tensoativos que provocam a diminuição da tensão superficial e formação de espumas permanentes na água, facilitando a penetração no subsolo e conseqüentemente provocando

uma contaminação no lençol freático (SPELLMEIER , STULP,2009), sendo esta a etapa mais importante do ponto de vista de impacto ambiental, e nela concentra-se a contribuição em termos de efluentes.

O interesse no potencial poluidor que envolve os corantes têxteis é baseado principalmente no alto grau de toxicidade desses corantes, pois a grande maioria é considerada carcinogênica. Isso se deve, principalmente porque esses compostos são formados por benzeno e outros compostos aromáticos, os quais podem ser biotransformados pelo metabolismo microbológico e gerarem subprodutos aromáticos tóxicos e/ou carcinogênicos (CLARKER , ANLIKER, 1980; NOZU,et al.,2010).

Desta maneira, o Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing Industry (ETAD), um órgão internacional criado em 1974, tem tentado minimizar os possíveis danos causados ao homem e ao meio ambiente, através da fiscalização, durante a fabricação e aplicação dos corantes sintéticos (ZANONI & CARNEIRO, 2001;CARVALHO,et al., 2010).

É importante ressaltar que os riscos crônicos dos corantes estão relacionados principalmente às etapas de biotransformação, ou seja, a rota de metabolismo dos organismos, que catalisados por enzimas específicas, podem gerar compostos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, como por exemplo, aminas aromáticas, toluidinas, benzidinas e radicais ativos, dentre outros (ZANONI , CARNEIRO, 2001;CARVALHO,et al., 2010).

Dentre as diversas classes dos corantes, os compostos azo, em particular, segue um metabolismo voltado para os processo de redução, envolvendo entre outros, reações de hidroxilação e formação de aminas aromáticas incolores, como principal produto da clivagem da ligação azo (BANAT et al., 1996; CHAGAS , DURRANT, 2001; ONG et al., 2005). Entretanto, a redução da ligação azo formando aminas aromáticas foi demonstrada em várias condições ecológicas, inclusive no trato digestivo de mamíferos (CHUNG , CERNIGLIAB, 1992; PINHEIRO et al., 2004; CORRÊA,et al.,2009).

### **2.5.1. Características do efluente têxtil e seus principais contaminantes**

Os poluentes aparecem nas indústrias têxteis em concentrações elevadas que, associados a grandes vazões, conferem aos efluentes uma carga poluente considerável e as seguintes características gerais:

pH: Em torno de 12 quando chega à estação de tratamento e deve ser controlado numa faixa entre 5 e 9.

Temperatura: Alcança 60°C no início. O controle até 40°C no máximo é necessário, pois com alta temperatura a solubilidade do O<sub>2</sub> no efluente diminui. A elevação de temperatura no corpo receptor, quando este recebe efluentes, não deverá exceder a 3 °C (LEGISLAÇÃO ESTADUAL, 1986).

DBO: Quantidade de O<sub>2</sub> necessário à oxidação bioquímica dos compostos orgânicos degradáveis existentes no efluente. Depende muito do processo produtivo, geralmente é elevada.

DQO: Medida da quantidade de agente oxidante químico energético necessário para oxidar a matéria orgânica de uma amostra expressa em unidades equivalentes de MG de O<sub>2</sub> por litro. As matérias orgânicas e inorgânicas da amostra são oxidadas em meio ácido, por quantidades conhecidas de um agente oxidante forte. A quantidade da matéria oxidada expressa como equivalente em oxigênio, é proporcional a quantidade do agente oxidante consumido (ABNT-NBR 10357,1988).

Compostos orgânicos aromáticos: provém dos espessantes sintéticos e corantes. (CETESB, 2000).

Cor: Não se pode atribuir coloração ao rio (há padrões estabelecidos para a qualidade). Valores acima de 1 mg.L<sup>-1</sup> são críticos segundo EDTA (Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufactures).

AOX: Produtos orgânicos halogenados. É uma medida para identificar e quantificar em mg/L qualquer substância orgânica que contenha um halogênio quimicamente ligado, sendo que o flúor ainda não está contido no grupo. A grande parte dos corantes reativos contém grupos cíclicos halogenados.

Metais pesados: íons metálicos ligados à moléculas de corantes (Cu, Cr, Co e Ni). Regulados por leis que fixam os limites de concentração que não devem ser ultrapassados; Ex: Cu - 250 ppm, Cr - 100 ppm, Co - 500 ppm e Ni - 200 ppm (SALEM, 1995).

### **2.5.2 . Corantes e saúde humana**

Os riscos toxicológicos dos corantes à saúde humana estão intrinsicamente relacionados ao modo e tempo de exposição como: ingestão oral, sensibilização da pele e vias respiratórias (KEGEELT,et al.,2009; ALCHORNE,et al.,2010). Os corantes portadores de grupos reativos, grupos cromóforos diazo e sulfonados são configurados quimicamente para agirem eficientemente com substâncias que possuem grupos amina e hidroxila, presentes nas fibras naturais, porém, presentes também em todos os organismos vivos (GUARATINI; ZANONI, 2000; ALCHORNE,et al.,2010). De acordo com alguns órgãos existentes, como o EEA (European Environmental Agency) e UNEP (United Nations Environment Programme), tem sido ressaltado que a maioria dos mais de mil produtos químicos manufaturados e usados, não disponibilizam dados de toxicidade e ecotoxicidade que avaliem seus riscos (PINHEIRO et al., 2004; SCHRANK, et al.,2007).

Alguns compostos não incorporados totalmente ao tecido podem causar dermatites, sobretudo em área do corpo sujeitas à transpiração. Os problemas respiratórios mais relatados são asma e rinite alérgica. Esses riscos, entretanto, são pequenos quando comparados à ingestão destes. Os riscos crônicos destes corantes estão relacionados às etapas de

biotransformação dos mesmos, referentes às rotas do metabolismo destes nos organismos. Podem gerar substâncias carcinogênicas e mutagênicas como aminas aromáticas, toluidinas, benzidinas, radicais ativos entre outros. Alguns corantes com alto poder de fixação, usados para tingir peças de algodão ou seda, podem ser nocivos aos seres vivos. Durante a etapa de tintura da fibra, alguns corantes como os pré-metalizados, chegam a liberar substâncias tóxicas e altas concentrações de metais pesados. Outros podem ser acumulados por plantas expostas a efluentes da indústria têxtil e conseqüentemente passar para a cadeia alimentar, contaminando outros organismos (Ciência Hoje, 2003; ALCHORNE, et al., 2010).

Experimentos clínicos realizados no final do século XIX na Alemanha com um corante industrial relataram que alguns empregados apresentaram câncer de bexiga (SABBIONI, RICHETER, 1990). Em indústrias onde os operários ficaram expostos à poeira de corantes foram detectados benzidina e seus metabólitos na urina dos trabalhadores. Inalação de 2mg por m<sup>3</sup> durante 8 horas provoca a eliminação de 14 a 24 ppb destes compostos na urina. Segundo estimativas, uma eliminação de 100 ppb de benzidina e seus metabólitos aumenta o risco deste tipo de câncer. Na inalação das poeiras as partículas maiores que 7  $\mu$ m são depositadas nas narinas, garganta, traquéia e brônquios, passando para o aparelho digestivo, as menores penetram nos pulmões. Entretanto, há indícios justificados de suspeita de efeitos carcinogênicos causados por determinados corantes azo, os quais podem ser metabolizados no organismo em aminas aromáticas, comprovadamente cancerígenas (ALCHORNE, et al., 2010).

## **2.6 . Processos de tratamento em efluentes têxteis**

A implantação de uma estação de tratamento de esgotos tem por objetivo a remoção dos principais poluentes presentes nas águas residuárias, retornando-as ao corpo d'água sem alteração de sua qualidade. As águas residuárias de uma cidade compõem-se dos esgotos sanitários e industriais, sendo que estes, em caso de geração de efluentes

muito tóxicos, devem ser tratados nas próprias indústrias (INFORME INFRA-ESTRUTURA, 1997; ZANONI , CARNEIRO, 2001; NOZU et al., 2010).

Os processos empregados na indústria têxtil para tratamentos de efluentes líquidos podem ser classificados genericamente como: primários ou mecânicos, secundários ou biológicos e terciários ou físico-químicos que são empregados (Tabela 4). A escolha do processo, ou seqüência de processos, depende das características do efluente, qualidade requerida após o tratamento, custo, disponibilidade de área e de tecnologia adequada. Os efluentes gerados nos processos da indústria têxtil apresentam elevadas cargas orgânicas, para o qual se recomenda o processo biológico (UNEP , 1994; RODRIGUES, et al., 2010).

O tratamento dos despejos das indústrias têxteis devem considerar como alternativas de redução: um menor consumo de água e produtos, realizar modificações no processo e, manter boa manutenção. Devem ser cuidadosamente planejados, devido às variações súbitas de vazão e de produtos químicos empregados no processo (BELISÁRIO et al. , 2009).

Tabela 3. Processos de tratamento de efluentes

<b>Tratamento</b>	<b>Tipo de processo</b>	<b>Operação Unitária</b>
Primário	Físico	Equalização, Gradeamento, Clarificação/ sedimentação e Flotação
	Químico	Neutralização Coagulação / Precipitação
Secundário	Biológico	Lodos ativados, Lagoas de Estabilização e Filtros Biológicos
	Físico/Químico	Carvão Ativado
Terciário	Químico	Coagulação / Precipitação Ozonização e Cração
	Físico	Clarificação ( carvão ativado) Ultrafiltração
Avançado	Físico	Osiose Reversa

Fonte: UNEP- United environment Programme-Technical report n.16 - "The textile industry and Environment". (1994)

O tratamento dos efluentes contendo corantes pode ser fundamentado em dois processos básicos: remoção por técnicas que permitam eliminar os compostos por transferência, a partir de suportes adequados, sem, no entanto degradar os compostos coloridos, ou a degradação parcial ou completa, até mineralização do corante (SLOKAR & Le MARECHAL, 1998; ZANONI , CARNEIRO, 2001; NOZU et al., 2010).

Os processos de tratamentos adotados pelas indústrias têxteis que operam por meio de sistemas físico-químico, seguido do tratamento biológico via lodo ativado, embora apresente eficiência relativamente alta na remoção da cor (cerca de 80%), apresenta como principal desvantagem à geração de lodo, considerado crítico do ponto de vista ambiental, visto o percentual de corantes adsorvidos (KUNZ et al., 2002; MACHADO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2010), criando um problema de disposição (ROBINSON et al., 2001; MACHADO et al., 2006).

Dentre os tratamentos físico-químicos, normalmente aplicados podemos citar a coagulação e floculação (GOLOB et al., 2005), eletro-coagulação (DANESHVAR et al., 2003), filtração por membrana, destruição eletroquímica (LIN , CHEN, 1997; PANDEY , UPADHYAY, 2010), oxidação ou ozonização (MACHADO et al., 2006; CARVALHO et al., 2010) radiação e adsorção (AZMI et al., 1998), dentre outros. No entanto, esses métodos apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, a presença em excesso de produtos químicos e o alto custo operacional (LIN , PENG, 1994; BANAT et al., 1996; DANESHVAR et al., 2003). Por outro lado, os corantes reativos e ácidos solúveis em água são os mais problemáticos, porque tendem a passar através dos sistemas de tratamentos convencionais (AKSU, 2005).

Dessa maneira, um monitoramento cuidadoso é requerido antes que o efluente tratado seja lançado nas vias fluviais (ROBINSON et al., 2001) e a presença de possíveis aminas formadas se submetam a diluições cada vez maiores, fazendo com que sua detecção e quantificação se torne cada vez mais difícil (ALONSO , BARCELÓ, 2000; PINHEIRO et al., 2004; CORRÊA et al., 2009)

### 2.6.1. Métodos Químicos

Os tratamentos químicos para os efluentes coloridos geralmente são simples, sendo a oxidação o método mais comum. Em geral, o agente oxidante é o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e o método, varia basicamente de acordo com a forma com que este é ativado (SLOKAR , Le MARECHAL, 1998; MUTHUKUMAR et al., 2005; CORRÊA et al.,2009).

A degradação oxidativa pelo cloro e ozônio são os processos químicos mais comuns na remoção da cor, no entanto, a cloração tem a desvantagem de produzir sub-produtos organoclorados (SARASA et al., 1998). Os processos de oxidação avançados (POAs) podem atacar os compostos orgânicos de 106 – 109 vezes mais rapidamente do que os agentes de oxidação como o ozônio e o peróxido de hidrogênio. No entanto, a ozonização catalítica é um POA com baixo consumo de ozônio que descolore e mineraliza rapidamente corantes reativos de efluentes têxteis coloridos (MACHADO et al., 2006; PANDEY , UPADHYAY,2010).

A ozonização não é um tratamento eficaz para os corantes de dispersão, sendo eficaz somente em pH elevado. Por outro lado, o reagente Fenton s um processo bastante eficaz dentro de uma estreita faixa de pH (< 3,5), é bastante útil na descoloração dos corantes de dispersão (RODRIGUES et al., 2010).

O método fotoquímico tem se mostrado importante como etapa primária na degradação de alguns corantes, uma vez que os corantes sintéticos apresentam alta estabilidade quando submetidos à luz visível ou ultravioleta (GUARATINI , ZANONI, 2000; RODRIGUES et al., 2010). Neste processo, a degradação é causada pela produção de altas concentrações de radicais hidróxilas. A vantagem desse tipo de tratamento em efluentes coloridos, é que não há produção de lodo e odores fétidos são geralmente reduzidos (ROBINSON et al., 2001). A aplicação do fotocatalisador TiO<sub>2</sub> tem sido utilizada na destruição de compostos orgânicos desde a década passada (JARDIM et al., 1997), tendo sido largamente usado, devido sua disponibilidade, baixo custo e não toxicidade. No entanto, os processos fotocatalíticos são limitados às unidades de tratamentos, devido à baixa

penetração de irradiação UV nos efluentes altamente coloridos (RODRIGUES et al., 2010).

Outra medida alternativa também utilizada no processo de descoloração é o processo de eletrólise do corante. Neste sistema, a degradação da molécula é dissociada eletroquimicamente através de potencial ou corrente controlada, ou através de reagentes secundários gerados eletroquimicamente. Todavia, o alto custo com a energia utilizada, além da produção de reações paralelas, tais como cloro, radicais hidróxila e outras reações indesejáveis, têm reduzido a sua aplicação (GUARATINI , ZANONI, 2000).

### **2.6.2. Métodos Físicos**

A adsorção encontra-se entre os processos físicos mais utilizados (HUANG , SHU, 1995; OZDEMIR et al., 2004). Esta técnica se baseia na remoção do corante através da passagem da amostra em carvão ativado, sílica gel, bauxita, resinas de trocas-iônica, etc. (GUARATINI , ZANONI, 2000). No entanto, o custo com a recuperação destes adsorbentes são caros; e por isso, muitos pesquisadores têm buscado a aplicação de materiais alternativos mais econômicos e eficientes tais como, talo de girrassol (SCHRANK, et al., 2007), casca de eucalipto (SALIBA et al., 2002), bagaço de cana-de-açúcar (CHANDRAN et al., 2002), quitosana (UZUN, 2006) e quitina (LONGHINOTTI et al., 1998), dentre outros.

O carvão ativado é o sorbente mais popular e extensamente usado no tratamento de efluentes têxteis, devido a sua estrutura porosa (AKSU, 2005). Embora seja uma técnica extremamente efetiva na remoção da cor, principalmente em volumes de pequena escala, é um método lento, com custo relativamente alto (GUARATINI , ZANONI, 2000; CORRÊA et al.,2009). A aplicação de membranas especiais, tais como nanofiltração e osmose reversa, também tem sido proposta. Esta técnica permite o tratamento de grandes volumes, de modo rápido e satisfatório, porém o elevado custo e a limpeza das membranas tem se mostrado como a principal desvantagem (GUARATINI , ZANONI, 2000; CORRÊA et al.,2009).

Com relação à coagulação e floculação, sua aplicação tem permitido uma remoção satisfatória da cor em grandes volumes de efluentes (GOLOB, et al., 2005). Esta técnica, quando associada a polieletrólitos e/ou floculantes inorgânicos, como sais de ferro e alumínio, apresenta resultados satisfatórios, como tratamento terciário no efluente têxtil. Entretanto, para se obter uma alta eficiência, normalmente se utiliza polieletrólitos ( $Al_2(SO_4)_3$ ) e amônia em excesso, que por sua vez acarreta a presença de resíduos tóxicos ao efluente (PANDEY, UPADHYAY, 2010).

### 2.6.3. Métodos Biológicos

Dentre as opções mais econômicas e viáveis para o tratamento dos efluentes coloridos, os sistemas biológicos se apresentam como os mais práticos e de baixo custo (MENDEZ-PAZ et al., 2005). Entretanto, os mecanismos biológicos podem ser bastante complexos. Inicialmente foi bem relatado que a descoloração dos corantes normalmente ocorre pela redução ou clivagem da ligação azo anaerobicamente, resultando em compostos incolores ou aminas aromáticas (KODAM et al., 2005). As aminas aromáticas por sua vez, são bastante estáveis em ambientes anaeróbicos e sua completa mineralização ocorre apenas sob condições aeróbicas (MENDEZ-PAZ et al., 2005a ; RODRIGUES et al., 2010).

Assim, para superar a problemática da recalcitrância dos azo corantes sob condições anóxicas, alguns pesquisadores tem utilizado duas fases durante o processo de descoloração (MACHADO et al., 2006). Neste processo, a remoção do grupo azo ocorre sob condições anaeróbicas, enquanto os compostos aminados resultantes são bons substratos para a degradação aeróbica. Segundo Kudlich et al. (1997) a completa mineralização do azo corante sulfurado mordente Amarelo 3 foi alcançada usando *Sphingomonas* sp. BN6, co-imobilizadas em contas de alginato.

O uso de processos exclusivamente aeróbicos na descoloração dos azo corantes não é comum, sendo assim, pouco se conhece dos microrganismos quanto a sua habilidade de clivagem redutiva nas ligações azo, sendo as

reações extremamente de substrato específico (MACHADO et al., 2006). Segundo He et al. (2004) culturas mistas têm se mostrado eficientes na descoloração de alguns corantes azo. Para Machado et al. (2006) a utilização de uma cultura bacteriana mista foi responsável por aproximadamente 80% da remoção da cor em amostras de efluentes contendo misturas de corantes reativos azo e diazo.

Segundo Forgacs et al. (2004) a utilização de consórcios microbianos oferece consideráveis vantagens quando comparadas ao uso de culturas puras, visto que as espécies individuais podem atacar a molécula do corante em diferentes posições ou podem ainda, usar os produtos de degradação produzidos por uma dada espécie, numa degradação adicional.

Por outro lado, uma rota a ser explorada diz respeito aos microrganismos termotolerantes e/ou termofílicos em sistemas de descoloração, uma vez que diversos efluentes têxteis são produzidos em altas temperaturas (50 - 60°C), mesmo após refrigeração. Assim, a aplicação de microrganismos termotolerantes pode reduzir custos significativos, como a remoção de resfriadores, proporcionando tratamento imediato (BANAT et al., 1996).

#### **2.6.3.1. Biodegradação dos azocorantes por microrganismos**

A descoloração por tratamentos biológicos tem motivado pesquisadores devido ao grande número de compostos capazes de serem degradados a baixo custo operacional. Os fungos de podridão branca como *Phanerochaete chrysosporium*, são capazes de degradar a lignina, polímero estrutural da madeira e, outros compostos complexos, como dioxinas, PCBs e outros organoclorados (CHAO; LEE, 1994). Kirby (1999), mostrou que *P. chrysosporium* tem habilidade para descolorir efluentes têxteis contendo corantes artificiais em até 99% em 7 dias. A utilização de outros fungos como *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* também tem sido estudada para degradação de corantes (CORRÊA et al., 2009). Embora os fungos de podridão branca degradem corantes em fermentações líquidas, a produção de enzimas é incerta. A utilização destes fungos no meio ambiente natural é mais efetiva com fermentação semi-sólida (ROBINSON

et al., 2001). Alguns autores como Swamy e Ramsay (1999), relataram a desvantagem de se utilizar fungos, pois, estes requerem baixos pHs para uma atividade enzimática ótima e um longo tempo de retenção hidráulica para a completa descoloração.

Culturas bacterianas, de uma ampla variedade de habitats, estão sendo usadas por pesquisadores para descolorir corantes. Consórcios microbianos podem realizar a biodegradação com mais sucesso do que uma linhagem individual, porém, os resultados não são facilmente reproduzidos, dificultando uma interpretação efetiva destes. Por esta razão, pesquisadores tem realizado trabalhos envolvendo uma única cultura bacteriana). Um mecanismo simples de remoção da cor por células bacterianas é a adsorção do corante na biomassa (MACHADO et al., 2006). Entretanto este mecanismo é similar a muitos outros métodos físicos para remoção da cor e não é adequado para tratamentos longos. Durante a adsorção o corante é concentrado na biomassa, que se torna saturada com o tempo, necessitando de disposição adequada (NOZU et al., 2010).

Os processos de biodegradação podem ser anaeróbios, aeróbios ou envolver a combinação dos dois. Considerando a reação entre célula bacteriana e azocorante, deve-se notar que há diferenças significantes entre a fisiologia e crescimento dos microrganismos sobre essas duas condições. Para bactérias aeróbias é necessário uma adaptação para ocorrer processos redutivos significantes. Esta adaptação envolve um longo tempo de crescimento aeróbio em culturas contínuas na presença de um composto azo simples. A bactéria sintetiza uma azoredutase específica para estes compostos, que sob condições controladas, podem clivar o grupo azo na presença de oxigênio. A redução bacteriana sobre condições anaeróbicas é inespecífica, com relação aos compostos azo envolvidos, e este tem sido o tipo de remoção de cor mais estudado para efluentes e, ainda não esclarecido (NOZU et al., 2010).

Segundo Carliell et al. (1996), a biorremediação anaeróbia permite a descoloração de azocorantes e outros corantes solúveis em água. Esta descoloração envolve uma reação de oxido-redução. Azocorantes agem como

oxidante para o FAD reduzido. Para haver descoloração é necessária uma fonte adicional de carbono. Este carbono adicional pode ser convertido a metano e CO<sub>2</sub> liberando elétrons. Estes caminham pela cadeia de transporte de elétrons e, neste caso, o acceptor final é o azocorante reativo e não a molécula de O<sub>2</sub>. A reação dos elétrons com o corante reduzem as ligações azo causando a descoloração.

Gingell e Walker (1971), demonstraram que o baixo peso molecular de mediadores redutores pode agir como transportadores de elétrons entre o azocorante e o NADH dependente de azoredutase que pode estar situada na membrana externa.

Segundo Moutaouakkil et al. (2003), a biodegradação microbiana de azocorantes, só é possível, quando a ligação azo é quebrada. A clivagem redutiva destas ligações é catalisada pela azoredutase, enzima chave na degradação destes corantes. Esta enzima tem sido estudada como sendo induzida por uma flavoproteína, que utiliza NADH e NADPH como doadores de elétrons para as ligações azo em condições microaeróbias.

Chang et al. (2001), determinou que ocorreu inibição enzimática na redução de um azocorante por *Pseudomonas luteola* relacionado à azoredutase. A inibição foi atribuída à competição pela utilização do NADH na respiração aeróbia, a qual provoca a transferência de elétrons do NADH para o O<sub>2</sub> para formar ATP. Nesta reação o NADH age como um doador de elétrons para a redução das ligações azo, o que leva a descoloração bacteriana destes corantes. O consumo de NADH pela fosforilação oxidativa pode resultar em um efeito negativo sobre a descoloração pela azoredutase.

Russ, et al.(2000), sugeriram que as membranas bacterianas são barreiras eficientes para a passagem dos corantes azo sulfonados e, também, são raramente permeáveis para os cofatores FAD e, entretanto, limitam a transferência dos elétrons das flavinas do citosol de células bacterianas não autoclavadas, para os corantes azo sulfonados adsorvidos a membrana. Desta forma em células ativas com membranas celulares intactas, outros sistemas enzimáticos e ou outros mediadores são possivelmente

responsáveis pela redução dos azocorantes. Em bactérias que possuem o sistema de transporte de elétrons em suas membranas como as aeróbias ou anaeróbias facultativas, a transferência de elétrons para a cadeia respiratória das membranas celulares pelos transportadores, podem ser feitas diretamente. Se as redutases forem intracelulares este processo pode estar envolvido com mediadores diferentes dos co-fatores FAD. Um pré-requisito para estes mediadores pode ser uma alta facilidade de atravessar a membrana bacteriana quando comparadas aos transportadores FAD.

Um mecanismo diferente para a redução dos compostos azo sulfonados que também não requer o transporte dos corantes pela membrana foi sugerido por Rafii et al.(1990), que isolaram diferentes bactérias do intestino humano (ex. *Eubacterium sp*, *Clostridium sp*, *Butyrivibrio sp*, e *Bacteroides sp.*), que descoloriram azocorantes sulfonados durante o crescimento em meio sólido ou líquido, mostrando que pelo menos uma parte da atividade da azoredutase foi extracelular, pois o sobrenadante da cultura foi capaz de descolorir os corantes sobre condições anaeróbias.

Outra possibilidade para a redução extracelular de azocorantes por microrganismos é a ação de compostos orgânicos reduzidos ( $Fe^{2+}$ ,  $H_2S$ ) que são formados como produtos finais de certas bactérias estritamente anaeróbias. Nestes casos os mediadores podem ter uma importante função. Dependendo das condições ambientais ou dos processos biotecnológicos, diferentes reações catalisadas por bactérias podem executar a redução dos compostos azo (PANDEY , UPADHYAY,2010).

Em estudos de escala laboratorial a glicose tem sido usada para fornecer uma fonte de carbono extra, esta adição pode ser um fator limitante em pequena escala. A degradação anaeróbica de corantes têxteis alcança somente a redução das ligações azo sendo que a mineralização não ocorre. Para ocorrer um processo de descoloração eficiente e esclarecer o problema de instabilidade nesses processos, são necessários mais estudos para

conhecer os mecanismos relacionados com azo redução (NOZU et al., 2010).

### **2.6.3.2. Biodegradação dos Corantes por Bactérias**

O metabolismo de compostos aromáticos por bactérias tem sido bem documentado. Entre os gêneros mais comumente observados, pode-se citar *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Xantobacter* (BARBIERI, 1997).

Devido à recalcitrância dos compostos aromáticos no ambiente, seu desaparecimento pode ocorrer por diversos processos abióticos. A biodegradação representa a principal rota pela qual esses compostos são removidos do ambiente e sua eficiência encontra-se, sobretudo, no número de anéis aromáticos da molécula (BARBIERI, 1997) e grupos heterocíclicos (OZDEMIR et al., 2004).

Ainda que, diversos grupos de pesquisadores tenham demonstrado a habilidade de alguns fungos, principalmente os fungos da podridão branca, na descoloração e degradação dos corantes têxteis, o longo ciclo de crescimento e moderadas taxas de descoloração limitam o desempenho desses microrganismos (BANAT et al., 1996; PANDEY & UPADHYAY, 2010). Por outro lado, a descoloração bacteriana geralmente ocorre mais rápida, com elevadas taxas de descoloração (MACHADO et al., 2006; NOZU et al., 2010).

Os processos de biodegradação podem ser anaeróbicos, aeróbicos ou envolver uma combinação dos dois (PEARCE et al., 2003). Entretanto, o completo mecanismo que envolve a descoloração dos azo corantes pelos microrganismos ainda é pouco conhecido (MAAS & CHAUDHARI, 2005; MACHADO et al., 2006). Acredita-se que pelo menos dois mecanismos estejam envolvidos. O primeiro seria a transferência direta de elétrons para os azo corantes como aceptor final de elétrons via rota enzimática, durante o

catabolismo bacteriano, ligado a geração de ATP (conservação de energia) e o segundo seria uma redução gratuita na molécula do azo corante por produtos terminais do catabolismo bacteriano, não ligado à geração de ATP (PEARCE et al., 2003). Outro possível mecanismo de remoção envolveria a redução das ligações azo, pela redução de compostos inorgânicos, como  $Fe^{2+}$  ou  $H_2S$ , formados como produtos finais de certas reações anaeróbicas nos metabólitos bacterianos (PANDEY, UPADHYAY, 2010).

Para Stolz (2001) estas reações espontâneas permitem que vários processos não específicos de redução, orientados principalmente por potenciais redox ou mediadores redox e compostos azo ocorram durante a degradação da molécula do corante. Isto ocorre, principalmente, porque é improvável que altas cargas do corante contendo enxofre e alto peso molecular, possam atravessar a membrana celular (RUSS et al., 2000). Assim, a atividade redutora pode não ser dependente da captação intracelular do corante (PEARCE et al., 2003).

Segundo Kudlich et al. (1997) a adição de quinonas em um sistema contendo azo corantes e *Sphingomonas xenophaga* BN6 agiram como mediadores redox, sendo então reduzidas enzimaticamente por *S. xenophaga* BN6, enquanto as hidroquinonas formadas, reduziram os azo corantes no sobrenadante da cultura numa reação redox puramente química.

Com relação à descoloração anaeróbica, a redução bacteriana é relativamente não específica com relação aos compostos azo envolvidos, sendo assim de maior aplicação na remoção da cor dos azo corantes presentes nos efluentes coloridos. Por outro lado, em processos aeróbicos, após um período de adaptação, as bactérias sintetizam azoredutases específicas, que sob condições controladas reduzem e quebram os grupos azo na presença do oxigênio (STOLZ, 2001). Isto foi observado por Wong e Yuen (1996) quando relataram à descoloração e biodegradação do azo corante Vermelho de Metila sob condições aeróbicas usando *Klebsiella pneumoniae*. Sarnaik e Kanekar (1999) também descreveram a mineralização aeróbica dos corantes Trifenilmetano e Metil Violeta por *Pseudomonas mendocina* MCM-402.

A descoloração anaeróbica envolve uma reação de oxido-redução com hidrogênio no lugar do oxigênio molecular livre nos sistemas aeróbicos (ROBINSON et al., 2001; RODRIGUES et al., 2010). Tipicamente, a quebra da molécula forma metano e sulfeto de hidrogênio. Os azo corantes atuam como agentes oxidantes na redução de flavina nucleotídeo na cadeia transportadora de elétrons microbiana, sendo então reduzidos e descoloridos simultaneamente. Para que esta redução ocorra, carbono adicional é requerido e então convertido a metano e gás carbônico, liberando assim os elétrons. Estes elétrons ao entrarem na cadeia respiratória, requerem um aceptor final de elétrons, que neste caso, é o azo corante reativo. Quando os elétrons reagem com o corante, reduz a ligação azo, causando a descoloração (CARLIELL et al., 1996; RODRIGUES et al., 2010).

Para que este mecanismo de redução ocorra, as bactérias têm que estabelecer uma ligação entre o seu sistema de transporte de elétrons intracelular e a molécula do corante de alto peso molecular. Para que esta ligação seja estabelecida, os componentes transportadores de elétrons devem estar localizados na membrana exterior das células bacterianas; no caso de bactérias Gram-negativas, elas podem estabelecer contato direto com o substrato contendo o azo corante ou um mediador redox através de sua superfície celular. Por outro lado, o baixo peso molecular do mediador redox pode agir como transportador de elétron entre o azo corante e as azoredutases dependentes de NADH, situadas na membrana exterior (PEARCE et al., 2003; NOZU et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010).

Keck et al. (1997) demonstraram que certos compostos baseados em quinonas formados durante o metabolismo de substratos específicos, se comportaram como mediadores redox entre a molécula do corante e a membrana bacteriana. A adição de mediadores redox sintéticos, como por exemplo, antraquinonas sulfuradas, mesmo em baixas concentrações, facilita a redução não enzimática dos azo corantes dentro do ambiente extracelular. Entretanto, se este ambiente for aeróbico, este mecanismo de redução pode ser inibido pelo oxigênio, devido à oxidação preferencial de redução do mediador redox pelo oxigênio no lugar do azo corante (PEARCE et al., 2003; RODRIGUES et al., 2010).

Para Kudlich et al. (1997) a atividade azoredutase ligada à membrana e mediada pelo composto redox, é diferente das azoredutases solúveis no citoplasma, responsáveis pela redução do corante não sulfurado, que penetra na membrana da célula. Assim, as azoredutases ligadas à membrana e as azoredutases citoplasmáticas são dois sistemas enzimáticos diferentes.

A Figura 5 mostra um mecanismo proposto para a redução dos azo corantes através de mediadores redox dependentes, em células bacterianas quando incubadas sob condições anaeróbicas. Embora, a redução final do azo corante nas células do sobrenadante seja uma reação química redox dominante, os mediadores redox dependem de enzimas redutoras citoplasmáticas para prover elétrons. Também, é possível que esta reação química redox trabalhe em conjunto com reações enzimáticas envolvendo as azoredutases, que podem ser enzimas desidrogenases, sintetizadas ao longo do citoplasma e segregadas sem acúmulo dentro da célula (PEARCE et al., 2003).

Com relação à descoloração aeróbica, durante os últimos anos, diversas espécies bacterianas têm sido citadas como responsáveis por mecanismos de redução, contribuindo assim para a descoloração de alguns corantes. A habilidade das bactérias em crescer na presença de simples compostos azo carboxilados como única fonte de carbono e energia, foi primeiramente demonstrada por Overney em 1979, ao isolar *Flavobacterium* sp. que crescia aerobicamente na presença de 4,4 dicarboxiazobenzeno (STOZ, 2001; RODRIGUES et al., 2010)

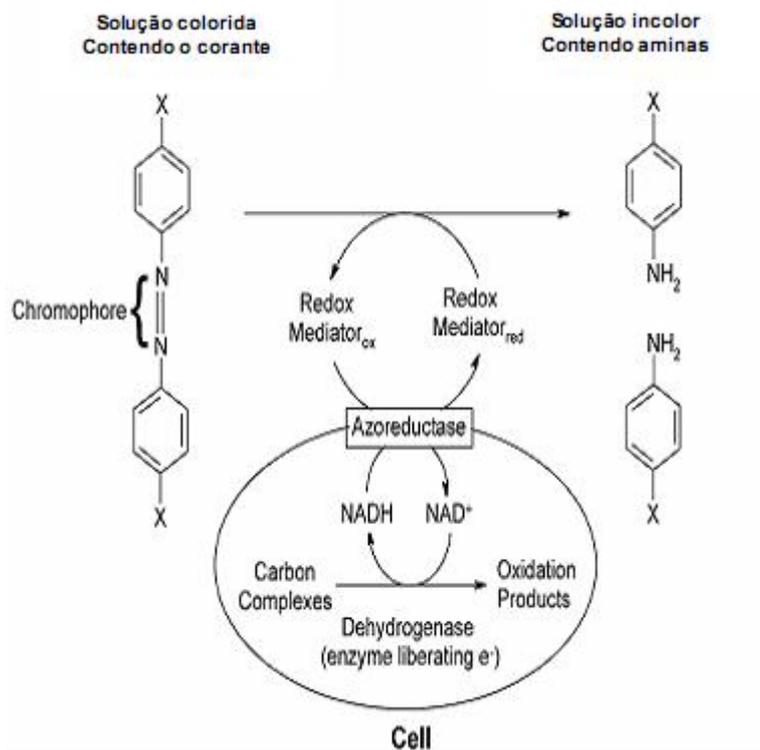


Figura 5. Mecanismo proposto para a redução dos azo corantes pelas células bacterianas (Pearce et al., 2003).

## 2.7 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* compreende um grande número de espécies (em torno de 100) de bacilos Gram-negativos, normalmente diferenciados por meio de provas bioquímicas, testes de sensibilidade a antibióticos, formação de pigmento, número e localização dos flagelos (TOLEDO , TRABULSI, 1999; FAGUNDES,2006). Os membros deste gênero são os microrganismos freqüentemente mais isolados em corpos aquáticos. Entretanto, sua presença não necessariamente indica possível risco à saúde pública. No entanto, *P. aeruginosa* tem sido utilizada na análise de águas recreacionais, devido sua resistência à desinfecção química (TORANZOS , McFETERS, 1996; CHAPAVAL,et al., 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* é um dos microrganismos mais ubiqüitários, ou seja, é encontrada no solo, na água, em vegetais, animais, alimentos e nos mais diversos ambientes hospitalares. Considerada como patógeno oportunista, é um dos mais importantes agentes de infecção hospitalar (LINCOPAN , TRABULSI, 2004; CHAPAVAL,et al., 2010).

Taxonomicamente, *P.aeruginosa* pertence à família *Pseudomonadaceae*, classificada no grupo de homologia rRNA I, especificamente no grupo fluorescente. Microscopicamente a bactéria é definida como um bacilo Gram-negativo reto, de 0,5-0,7 µm de espessura por 1,5-3,0 µm de comprimento, não esporulado, móvel por um único flagelo polar (LINCOPAN , TRABULSI, 2004).

De acordo com sua fisiologia, é classificada como uma bactéria aeróbica, podendo crescer anaerobicamente na presença de nitrato, sendo então usado como aceptor final de elétron. Embora a espécie seja quimiorganotrófica, a obtenção de energia a partir de carboidratos implica num metabolismo oxidativo (dependente de O<sub>2</sub>), não fermentador. Como alternativa, pode usar outras fontes de carbono como, por exemplo, o acetato. Esta versatilidade no requerimento nutricional e energético lhe permite crescer rapidamente em diferentes meios de cultura e numa ampla faixa de temperatura (4 - 42°C) (LINCOPAN , TRABULSI, 2004), sendo potencialmente capaz de degradar mais de 100 compostos orgânicos diferentes (BARBOSA , TORRES, 1998; FAGUNDES,2006; CHAPAVAL,et al., 2010).

Uma das características mais destacadas dessa espécie é a sua capacidade em produzir pigmentos hidrossolúveis, um de cor azul, denominado piocianina (TOLEDO , TRABULSI, 1999) e outro esverdeado, denominado pioverdina (LINCOPAN , TRABULSI, 2004). Outros pigmentos também podem ser observados com menor freqüência, como piomelanina (castanho) e piorrubina (vermelho). Esta observação, assim como a produção de odor característico de frutas, produto da aminoacetofenona liberada pelo microrganismo, é uma característica de grande importância na sua identificação. Outra característica destacável é a formação, em meios de cultura líquido e sólido, de uma camada de aspecto mucóide denominada

slime , importante na formação de biofilmes (LINCOPAN, TRABULSI, 2004; FAGUNDES, 2006)

### 3 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABIQUIM. Associação Brasileira da Indústria Química. Corantes e pigmentos. 2010a. Disponível em: <[http://www.abiquim.org.br/corantes/cor\\_industria.asp](http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_industria.asp)> Acesso em: 22 mai 2010.

ABIQUIM. Associação Brasileira da Indústria Química. Corantes e pigmentos. 2010b. Disponível em: <[http://www.abiquim.org.br/corantes/cor\\_industria.asp](http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_industria.asp)> Acesso em: 28 jun 2010.

ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas. Águas: determinação da demanda química de oxigênio- método de refluxo aberto - método de refluxo fechado - titulométrico e refluxo fechado – Colorimétrico. NBR 10357, 1988

ABTT. Ano 1, n.1, p. 16-18, 2010. Disponível em: < <http://abtt.org.br/revistas.htm>>. Acesso em: 24 mai 2010.

AGUIAR, A. L. C.; SCHONBERGER, H. **Revista Têxtil**, São Paulo: R. da Silva Haydu e Cia Ltda, v. 3, p 100-114, 1995.

ALCHORNE,A.O.A. ; ALCHORNE, M.M.A. ; SILVA M.M. ; Occupational dermatosis. **An Bras Dermatol**. 2010;85(2):137-47

ALONSO, M.C.; BARCELÓ, D. Stability of sulfonated derivatives of benzene and naphthalene on disposable solid-phase extraction pre-columns and in an aqueous matrix. **J. Chromatografy A**, Amsterdam, v.889, n.1-2, p.231-244, aug. 2000

AMORIM, Camila Costa de; LEAO, Mônica Maria Diniz and MOREIRA, Regina de Fátima Peralta Muniz. Comparação entre diferentes processos oxidativos avançados para degradação de corante azo. **Eng. Sanit. Ambient.** [online]. 2009, vol.14, n.4, pp. 543-550. ISSN 1413-4152.

ANDREAUS, J; DALMOLIN, M. C.; OLIVEIRA JUNIOR, I. B. de and BARCELLOS, I. O.. Aplicação de ciclodextrinas em processos têxteis. **Quím. Nova**. 2010, vol.33, n.4, pp. 929-937. ISSN 0100-4042

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pullutants: a review. **Process Biochem.**, London, v.40, n.3-4, p.997-1026, mar. 2005

AKSU, Z.; DONMEZ, G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. **Chemosphere**, Oxford, v.50, n.8, p.1075-1083, mar. 2003.

AZMI, W.; SANI, R.J.; BANERJEE, U.C. Biodegradation of triphenylmethane dyes. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v.22, n.3, p.185-191, feb. 1998.

BANAT, I.M. et al. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresour. Technol.**, Oxford, v.58, n.3, p.217-227, dec. 1996.

BARBIERI, S.M. Biodegradação de compostos aromáticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (eds.). **Microbiologia ambiental**, São Paulo:Embrapa-CNPMA. Cap.10, 1997. p.211-242

**Bioresour. Technol.**, Oxford, v.58, n.3, p.217-227, dec. 1996

BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. Nutrição. In: **Microbiologia Básica**. São Paulo: Atheneu. Cap.4, 1998. p.89-102.

BARCELLOS, I.O; GIOVANELLA R. F; CHIARELLO L.M; BLOSFELD A.M Remoção de cor de soluções de corantes reativos com cinza de casca de arroz. **Dynamis revista tecno- científica** ( 2009 ) , vol 15 n. 2 pp. 1-6

BALAN, D.S.L. Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis. **Revista Brasileira de Técnicos Têxteis - ABTT**. Ano 1, n.1, p. 16-18, 2009. Disponível em: < <http://abtt.org.br/revistas.htm>>. Acesso em: 01 set 2009.

BEGIC S, WOROBEK EA. Fluoroquinolone resistance of *Serratia marcescens*: sucrose, salicylate, temperature, and pH induction of phenotypic resistance. **Canadian Journal of Microbiology**, v;53, n.11, p.1239-1245, 2007

BELISÁRIO, M. ; BORGES P.S. ; GALAZZI,R.M; DEL PIERO,B.;ZORZAL,P.B. ;RIBEIRO,A.V.F. ;RIBEIRO,J.N. ; The Employment Of Natural Waste At Treatment Of FFluents Contaminated With Polluting Medicines . **Revista Científica Internacional** Ano 2, n.10 jan./dez. 2009 – ISSN 1679 – 9844

BEYDILLI, M.I.; PAVLOSTATHIS, S.G. Decolorization kinetics of the azo dye Reactive Red 2 under methanogenic conditions: effect of long-term culture acclimation. **Biodegradation**, New York, v.16, n.2, p.135-146, mar. 2005.

BLONDEAU J.M. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. **Clinical Therapy**. v. 21,n.1, p.:3-40,1999.

BROWN, S.A. Fluoroquinolones in animal health. **Journal Pharmacology Therapy**. v.19, p.1-14, 1996.

BUITRON, G.; QUEZADA, M.; MORENO, G. Aerobic degradation of the azo dye acid red 151 in a sequencing batch biofilter. **Bioresourc. Technol.**, Oxford, v.92, n.2, p.143-149, apr. 2004.

CARLIELL, C. M.; BARCLAY, S. J.; BUCKLEY, C. A. Treatment of exhausted reactive dye bath effluent using anaerobic digestion: laboratory and full scale trials. **Water S A**. v. 22, p. 225-233, 1996.

CARVALHO, T.E.M ; FUNGARO, D.A. ; IZIDORO J.C. ; Adsorção do corante reativo laranja 16 de soluções aquosas por zeólita sintética. **Quím. Nova**. 2010, vol.33, n.2, pp. 358-363. ISSN 0100-4042

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), Diretoria de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia, Setor de treinamento. Tratamento de águas residuárias de indústrias têxteis, Setembro, 2000.

CHAGAS, E.P.; DURRANT, L.R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v.29, n.8-9, p.473-477, nov. 2001

CHANDRAN, C.B.; SINGH, D.; NIGAM, P. Remediation of textile effluent using agricultural residues. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v.102, n. 1-6, p.207-212, jul-dez., 2002.

CHANG, J. S.; CHOU, C.; LIN, Y. C.; LIN, P. J.; HO, J. Y.; HU, T. L. kinetics characteristics of bacterial azo dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **Water Res.** v. 35 (12), p. 2841-2850, 2001.

CHAO, W. L.; LEE, S. L. Decoloration of azo dyes by three white-rot fungi: influence of carbon source. **World J. Microbiol. Biotchnol.** v. 10, p. 556-559, 1994.

CHAPAVAL, L.; OLIVENDO, C.S.; SOUZA, F.G.C; ALVES, F.S.F. ; FROTA, I.M.A ; Detection of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using REP-PCR monitoring goat's milk quality in milking room. **Comunicata Scientiae** 1(1): 49-56, 2010

CHOY, K. K.; MCKAY, G.; PORTER, J. F. Sorption of acid dyes from effluents using activated carbon. **Resources. Conservation and Recycling**, v. 27, p. 57-71, 1999.

CHOPRA I, SCHOFIELD C, EVERETT M, O'NEILL A, MILLER K, et al. Treatment of health-care-associated , p.infections caused by Gram-negative bacteria: A consensus statement. **Lancet Infection Disease** v.8, p.133–139, 2008

CLARKER, E. A. e ANILIKER, R. Organic dyes and pigments. In the Handbook of **Environmental Chemistry**, 3, Part A Anthropogenic Compounds, ed. O huntzinger. Springer, Heidelberg, p. 181-215, 1980.

CORREIA, V.M.; STEPHENSON, T.; JUDD, S. Characterization of textile wastewaters - a review. **Environ. Technol.**, London, v.15, n.10, p.917-929, oct. 1994.

CORRÊA, C.A.R. ; AQUINO, S.R. ; CALDAS, P.C.P. ; SILVA , S.Q. ; Use of yeast extract as source of carbon and redox mediators for the anaerobic degradation of azo dyes. **Eng Sanit Ambient** | v.14 n.4 | out/dez 2009 | 559-568

COSTA, F.P.B.S. O diferencial para a exportação de produtos têxteis. EAN BRASIL, Associação Brasileira de Automação. 03/10/2005. <Disponível em: <http://www.eanbrasil.org.br/servlet/ServletContent?requestId=31&id:press=1081&id:classificationpress=42>> Acesso em: 12/ jul. 2010.

COUGHLIN, M.F.; KINKLE, B.K.; BISHOP, P.L. High performance degradation of azo dye acid orange 7 and sulfanilic acid in a laboratory scale reactor after seeding with cultured bacterial strains, **Water Res.**, New York, v.37, n.11, p.2757-2763, jun. 2003.

COUTURIER M., BAHASSI E.M.; VAN MELDEREN L. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. **Trends Microbiology**, v. 6, n.7, p. 269-275,1998.

FAGUNDES, C.M. 2006. Presença de microrganismos psicotróficos, em especial *Pseudomonas* spp, em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural** 36: 568-572

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wasterwaters: a review. **Environ. Int.**, New York, v.30, n.7, p.953-971, sep. 2004.

FU K. P., GRACE M.E., HSIAO C.L. & HUNG P.P. 1988. Elimination of antibiotic-resistant plasmids by quinolone antibiotics. **Chemotherapy**. v.34, n.:415-418.

FURTADO, M. P. Têxtil: beneficiamento lucra com alta tecnologia. **Química e Derivados**, p. 10-16, 1996.

GEORGIU, D. et al. Decolorization of azo-reactive dyes and cotton-textile wastewater using anaerobic digestion and acetate-consuming bacteria. **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v.19, n.1, p.75-79, Jul. 2004.

GINGELL, R.; WALKER, R. Mechanism of azo reduction by *Streptococcus faecalis*. II. The role of soluble flavins. *Xenobiotica*. n. 1(3), p. 231-239, 1971

GOLOB, V.; VINDER, A.; SIMONIC, M. Efficiency of the coagulation/flocculation method for the treatment of dyebath effluents. **Dyes Pigm.**, Oxford, v.67, n2, p.93-97, nov. 2005.

GRAU, P. Textile industry wastewater treatment. **Water Science Tecnology**, v. 24, p. 97, 1991.

GUARATINI, C. I. C, ZONANI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova** 23 (1), p. 71-79, 2000.

HAO, J.O.; KIM, H.; CHIANG, P.-C. Decolorization of wastewater. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.**, Boca Raton, v.30, n.4, p.449-505, 2000.

HE, F.; HU, W.; LI, Y. Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4BS by a microbial consortium. **Chemosphere**, Oxford, v.57, n.4, p.293-301, oct. 2004.

INFORMATIVO ABIT. Setor têxtil e de confecção: imagem de um Brasil moderno. Revista Brasileira de Técnicos Têxteis - ABTT, ano 1, n. 1, p. 8-9, 2005. Disponível em: < <http://www.abtt.org.br/revistas.htm>> Acesso em: 22 de julho 2010

KECK, A. et al. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. Strain BN6. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, n.9, p.3684-3690, sep. 1997

KEGEELT, MOYLE, M, FROEN K, NIXON, R. The epidemiology of occupational contact dermatitis (1990 - 2007): a systematic review. **Intern J Dermatol.** 2009; 48: 571 – 8

KIRBY, N . Bioremediation of têxtil industry wastewater by white rot fungi. DPhil Thesis, University of Ulster, Coleraine, UK, 1999.

KODAM, K.M. et al. Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v.21, n. 3, p.367-370, apr. 2005.

KONSTANTINOOU, I.K.; ALBANIS, T.A. TiO<sub>2</sub>-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations - a review. *Appl. Catal. B: Environ.*, Amsterdam, v.49, n.1, p.1-14, apr. 2004.

KUDLICH, M. et al. Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, n.9, p.3691-3694, sep. 1997.]

KUMAR, A.; WOROBEK, E.A. Fluoroquinolone resistance of *Serratia marcescens*: involvement of a proton gradient-dependent efflux pump. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**.v. 50, p. 593–596, 2002.

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v.25, p.73-82, jan.-feb. 2002.

LEGISLAÇÃO ESTADUAL. São Paulo, artigo 21. Resolução Conama, nr. 20 de 18/06/86.

LEONAS, K. K. AND LEONAS, M. L. Textileprocess Wastewater permits: an update and strategies. **Am. Dyest. Rep.** v. 83, p. 26-34, 1994.

LIN, S.H.; CHEN, M.L. Treatment of textile wastewater by chemical methods for reuse. **Water Res.**, New York, v.31, n.4, p.868-876, apr. 1997.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L.R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: **Microbiologia**. 4.ed., São Paulo: Atheneu. Cap. 49, 2004. p.359-368.

LONGHINOTTI, E. et al. Adsorption of anionic dyes on the biopolymer chitin. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v.9, n.5, p.435-440, sep.-oct. 1998.

MAAS, R.; CHAUDHARI, S. Adsorption and biological decolourization of azo dye Reactive Red 2 in semicontinuous anaerobic reactors. **Process Biochem.**, London, v.40, n.2, p.699-705, feb. 2005.

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, n. 4, p. 481-487, 2006.

MANU, B.; CHAUDHARI, S. Decolorization of indigo and azo dyes in semicontinuous reactors with long hydraulic retention time. **Process Biochem.**, London, v.38, n.8, p.1213-1221, mar. 2003

MARINHO, G. Viability of the synthetic textile wastewater treatment in a fixed-bed aerobic reactor. **Eng. Sanit. Ambient.** 2010, vol.15, n.1, pp. 99-106. ISSN 1413-4152.

MENDEZ-PAZ, D.; OMIL, F.; LEMA, J.M. Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. **Enzyme Microb. Technol.**, New York , v.36, n. 2-3, p.264-272, feb. 2005.

MENDEZ-PAZ, D.; OMIL, F.; LEMA, J.M. Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under fed-batch and continuous conditions. **Water Res.**, New York, v.39, n. 5, p. 771-778, mar. 2005a

MOUTAOUAKKIL, A.; ZEROUAL, Y.; DZAYRI, Z. F.; TALBI, M.; LEE, K.; BLAGHEN, M. Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. n. 413, p.139-146, 2003.

MURRAY PR, DREW WL, KOBAYASHI SG, THOMPSON JJH. Microbiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.79-95. PAGGA U, BROWN D. The degradation of dye stuffs. Part II. Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. **Chemosphere** 1986;15:479-491.

NIGAM, P., et al. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochem.*, London, v.31, n.5, p.435-442, jun. 1996.

NOZU, L.L. ; SALDANHA, P.C.A. ; SOARES, M. BARBOSA, V.M. ; MACHADO, A.F. ; SILVA, E.R. ; Evaluation of the physical-chemical and biological treatment of residue from dyes produced at a microbiology laboratory. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 1, p. 7-13, 2010

ONEILL, C., et al. Colour in textile effluents-sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, Oxford, v.74, n.11, p.1009-1018, nov. 1999.

PANDEY, B.V. ; UPADHYAY, R.S. ; *Pseudomonas fluorescens* can be used for bioremediation of textile effluent Direct Orange-102 . **Tropical Ecology** 51(2S): 397-403, 2010 ISSN 0564-3295

PEARCE, C.I.; LLOYD, J.R.; GUTHRIE, J.T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes Pigm.**, London, v.58, n.3, p.179-196, sep. 2003.

PEREIRA M.S.V., SIQUEIRA JÚNIOR J.P. ; CAMPOS TAKAKI G.M. Elimination of resistance to drugs by fluoroquinolones in bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n.1, p.11-14, 2004.

PINHEIRO, M, H.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: a review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewater. **Dyes and Pigments**. n. 61, p. 121-139, 2004.

RADHAKRISHNAN V., GANGULY K., GANGULY M., DATIDAR S.G., CHAKRABARTY A.N. Potentiality of tricyclic compound thioridazine as an effective antibacterial and antiplasmid agent. **Journal Experimental. Biology**. v. 37, p.671-675, 1999.

RAFII, F., W. FRANKLIN, AND C. E. CERNIGLIA. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 56, p. 2146–2151, 1990.

RESOLUÇÃO CONAMA. Nº 020, de 18 de junho de 1986.

RISMAYANI, S. et al. Decolorization of orange II by catalytic oxidation using iron (III) phthalocyanine-tetrasulfonic acid. *J. Hazard. Mater.*, Amsterdam, v.114, n.1-3, 175-181, oct. 2004.

ROBINSON, T., et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresour. Technol.**, Essex, v.77, n.3, p.247-255, may. 2001.

RODRIGUES, K; VIDALC.B ; BARBOSA,B.C.A;PESSOA-WANDERLEY,C.R;DUARTE ,I.C.S. ;

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51,p.1109-1117,2003

RUSS. R.; RAU. J.; STOLZ. A. The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66 (4), p. 1429-1434, 2000.

SALEM, V. Corantes na indústria têxtil. Uma abordagem ecológica. **Química Têxtil**. v. 28, p. 8, 1995

SANTOS AB, CERVANTES FJ, YAYA-BEAS RE, VAN LIER JB. Effect of mediator AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor. **Enzyme and Microbial Technology** 2003;33:942-95.

SCHRANK, S. G.; SANTOS, J. N. R.; SOUZA, D. S.; SOUZA, E. E. S. Decolorisation effects of Vat green 01 textile dye and textile wastewater using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV process. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 186, n. 2/3, p. 125-129, 2007.

SESHADRI, S.; BISHOP, P.L.; AGHA, A.M. Anaerobic/aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. **Waste Manag.**, Oxford, v.14, n.2, p.127-137, jul. 1994.

SILVA, J.P., et al. Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains. **Separ. Purif. Technol.**, Amsterdam, v.40, n.3, p.309-315, dec. 2004.

SLOKAR, W. M.; LE MARECHAL. A. M. Methods of decoloration of textile wastewater. **Dyes and Pigments**. v. 37, p. 335-356,1997

SOUZA,A.F; ROSADO,F.R. USE OF FUNGI IN BIODEGRADATION OF BASIDIOMYCETES TEXTILE EFFLUENTS . **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, jan./abr. 2009 - ISSN 1981-9951

SPELLMEIER , J.G. ; STULP, S. ; Avaliação da degradação e toxicidade dos corantes alimentícios eritrosina e carmim de cochonilha através de processo fotoquímico. **ACTA AMBIENTAL CATARINENSE** , v. 6. n.1 jan./jun./2009

SPONZA, D.T.; ISIK, M. Decolorization and inhibition kinetic of Direct Black 38 azo dye with granulated anaerobic sludge. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v.34, n.2, p.147-158, feb. 2004

STOLZ, A.; Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, New York, v.56, n.1-2, p.69-80, jul. 2001.

SUPAKA N, JUNTONGJIN K, DAMRONGLERD S, DELIA M-L, STREHAIANO P. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. **Chemical Engineering Journal** 2004;99:169-176.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. The evaluation of white rot fungi in the decolorization of textile dyes. **Enzyme Microb. Technol**, n. 24, p.130-137, 1999.

TEIXEIRA, J. Têxtil. Química e Derivados, v. 412, fev. 2003. Disponível em: < <http://www.quimica.com.br/indice2003.htm> >. Acesso em 22 de abril de 2005.

TEXTILIA NET, 2004 - Referência Bibliográfica de documentos eletrônicos, <http://www.textilianet.com/> Acesso em: 15 mai 2009.

TOLEDO, M.R.F.; TRABULSI, L.R. Pseudomonas. In: LUIZ RICHAD TRABULSI et al. (Eds.). **Microbiologia**. 3 ed., São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 36, p.269-271.

TORANZOS, G.A.; McFETERS, G.A. Detection of indicator microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. In: CHRISTON J. HURST et al. (Eds.). **Manual of Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology: Washington. 1996, Cap. 19, p. 184-194.

TUNUSSI, J.L.; ALEM SOBRINHO, P. Remoção de cor e nitrificação de efluentes de tinturaria têxtil através de processos biológicos anaeróbio-aeróbio. In: XXVIII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental da AIDIS. Anais... Cancun: México. 2002.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME), The textile industry and environment, Technical Report. n,16, p. 120, 1994.

UZUN, I. Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitosan. **Dyes Pigm.**, Oxford, v.70, n.2, p.76-83, jun. 2006.

ZANONI, M.V.B., CARNEIRO, P.A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.29, n.174, p.61-64, ago. 2001.

WONG, P.K.; YUEN, P.Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS 13. **Water Res.**, New York, v.30, n.7, p.1736-1744, jul. 1996

# CAPÍTULO II

**ELIMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA A DROGAS POR CÁDMIO EM  
*Pseudomonas aeruginosa* UCP 1567 DE ISOLADO CLINICO**

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico

Brazilian Archives of Biology and Technology

# Eliminação de Resistência a Drogas Por Cádmio em *Pseudomonas aeruginosa* UCP 1567

José Carlos Vilar Junior<sup>1,2</sup>, Sany Aila Constâncio Dias da Silva<sup>2</sup>, Carlos Alberto Alves da Silva<sup>1,2</sup>, Galba Maria de Campos Takaki<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de processos ambientais, UNICAP, Recife, PE, Brasil;<sup>2</sup> Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, NPCIAMB, UNICAP, Recife, PE, Brasil

## Resumo

Isolado clínico multiresistente de *Pseudomonas aeruginosa* UCP 1567 foi estudado o processo de eliminação de resistência a drogas usando o metal pesado cádmio. A estirpe foi aclimatada duas vezes em Luria Bertani com glicose, empregando a concentração mínima inibitória determinada para cádmio (32µg/mL e 52 µg/mL, respectivamente) utilizando o método de diluição. Após o processo de aclimação a bactéria foi submetida a novo antibiograma, sendo comparada com a estirpe selvagem. Os resultados obtidos sugeriram que o metal pesado foi eficiente na eliminação de plasmídios de resistência correspondendo a 84,61%, para a aclimação com cádmio a 32µg/mL e 92,30% para 52 µg/mL, respectivamente. Com a eliminação da resistência a drogas pelo cádmio a *P. aeruginosa* UCP 1567 poderá ser amplamente empregada sem causar riscos ambientais nos processos de biorremediação.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; Cádmio, Eliminação de resistência, Antibiograma

## Introdução

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbio, gram-negativo, não fermentador, isolado de solo, água, plantas e animais. É uma bactéria capaz de causar infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos, devido a fatores de virulência capazes de inativar o sistema imune e a ação de antibióticos (De Vos et al. 1997; Koneman et al 2001; Mata, Abegg, 2007).

As infecções devido a *P. aeruginosa* são particularmente problemáticas devida a resistência intrínseca que elas desenvolvem para múltiplas classes de antibióticos, adquirindo resistência

adaptável durante um curso terapêutico (Kollef, 2005).

Desta forma, o tratamento de *P. aeruginosa* requer a associação de antibióticos de várias classes incluindo agentes beta-lactâmicos de terceira e quarta geração, aminoglicosídeos, carbapenemas e quinolonas, entre outros. Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos caracterizam-se como uma das ferramentas iniciais para escolha de antibióticos, como também são testes fundamentais para indicar resistência (Dubois et al. 2001; Galles et al 2001; Bratu et al 2005,).

As bactérias de um modo geral são capazes de desenvolver resistência aos antibióticos por meio de diversos mecanismos, como modificação do sistema de permeabilidade, produção de

beta-lactamases, transferências de fatores R por conjugação ou super expressão do sistema de e uxo (Hernandez et al. 1997, Pai et al. 2001).

A maioria das espécies bacterianas patogênicas para o homem apresentam plasmídios R (resistência) que contêm genes que conferem ao microrganismo resistência a um ou a vários antimicrobianos. Estes podem existir de maneira autônoma ou integrada a plasmídios conjugativos, chamados fatores de transferência de resistência (RTF) (Tavares, 1993).

Devido às mutações e seleções naturais relacionadas ao uso excessivo de antibióticos, algumas cepas de *P. aeruginosa* tornam-se capazes de produzir potentes betalactamases, enzimas que destroem antibióticos, incluindo os carbapenêmicos, convertendo-se em grande ameaça aos pacientes imunocomprometidos (Segretti, 1989; Santos et al., 2002).

Por outro lado, uma variedade de compostos como corantes de acridina, brometo de etidio, rifampicina, sal de bis-amônio, metais como a prata e mais recentemente, a tioridazina, uma fenotiazina, assim como antibióticos inibidores da subunidade B da DNA girase, novobiocina e coumermicina tem sido reportada para eliminar plasmídios resistentes (Weisser, Wiedmann 1985; Fu et al. 1988; Radhakrishnan et al. 1999; Catão et al. 2010). No entanto, são raros os relatos da cura de plasmídios por inibidores da subunidade A da DNA girase, particularmente em linhagens de *P. aeruginosa*.

Por outro lado, o cádmio normalmente está presente em águas naturais em pequenas concentrações, geralmente inferiores a 0,001 mg/L. Sua ingestão provoca disfunção renal, hipertensão, arteriosclerose, inibição no crescimento, doenças crônicas em idosos e câncer. O cádmio apresenta várias aplicações industriais, porém é frequentemente usado para a produção de pigmentos, pilhas elétricas e plásticos. Pequenas

quantidades de cádmio são encontradas naturalmente no ar, na água e no solo. Em organismos intensamente expostos, o cádmio ocasiona graves enfermidades. Existem atualmente algumas descrições de possíveis mecanismos de toxicidade do cádmio, entretanto, o modo real pelo qual este elemento age tem sido pouco estudado (Kumar, Worobec, 2002; Pereira et al., 2004; Begic, Worobec, 2007).

No presente trabalho foi determinada a concentração inibitória mínima do cádmio no isolado clínico em *P. aeruginosa* UFC1567, além da realização do processo de aclimação, investigando a eliminação de plasmídios de resistência a drogas. Os estudos realizados têm a finalidade de ampliar o uso de estirpes clínicas no sentido de minimizar os riscos ambientais nos processos de bioremediação.

## 2. Material e Métodos

### 2.2.1. Microorganismo

*Pseudomonas aeruginosa* UCP 1567, procedente de isolado clínico, resistente a ampicilina, cefepime, cefoxitina, ciprofloxacina, clidamicina, eritromicina, gentamicina, kamicacina, penicilina, perfloxacina, piperaciclina e tazobactan foi cedida do Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais NPCIAMB, UNICAP, Recife, Brasil, sendo mantida no meio Ágar nutriente e armazenado a 4°C

### 2.2.2 Antibióticos, drogas, reagentes e meios de cultura:

Os antibióticos foram obtidos da Sigma. As drogas e reagentes foram adquiridos da Reagen e Vetec, e os meios de cultura da Difco e Oxoid

## 2.2. Eliminação de resistência a Drogas em *P. aeruginosa*

### *Determinação da CMI para o Cádmio x Aclimação de P. aeruginosa*

A determinação da CMI foi estabelecida por duas vezes antes (para estirpe selvagem) e após aclimação. Foi determinada a Concentração Mínima Inibitória (CMI) para estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* (selvagem) pelo método de microdiluição em meio líquido (caldo nutriente) variando as concentrações de cádmio de 4 a 64 µg/ml, tendo como controle a ausência de cádmio. Foram adicionados 10 µl do inóculo bacteriano na concentração de 10<sup>8</sup> UFC/ml aos tubos contendo meio de cultura que foram então incubados a 37° C por 24h. A CMI foi determinada após o período de incubação por turbidez a 600nm. O valor obtido para CMI de concentração do cádmio foi utilizado para realizar aclimação da estirpe em meio AN durante 120 h a temperatura de 37°. Após esse período nova determinação da CMI para o cádmio foi realizada variando as concentrações 32 a 64 µg/mL, mantendo as mesmas condições anteriores, determinando-se uma nova CMI 1,625 maior que a CMI da primeira aclimação (Ledeborg e Ledeborg 1952; Pereira et al. 2004). As amostras de *P. aeruginosa* selvagem e aclimatadas com 32 e 52 µg/mL de cádmio foram submetidas a novos antibiograma, para avaliar a eliminação de resistência a drogas pelo cádmio.

### 2.3 Teste de difusão em disco (Kirby Bauer)

Os ensaios de sensibilidade antimicrobiana foram realizados com as linhagens de *P. aeruginosa* selvagem, após primeira aclimação em cádmio e

após segunda aclimação em cádmio, utilizando o meio Mueller-Hinton (MH) ágar em placas de Petri e discos, segundo recomendações e interpretação do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Os antibióticos utilizados: **aminoglicosídeos** [amicacina (30 µg), gentamicina (10 µg), ]; **cefalosporinas** [cefepime (30 µg), cefoxitina (30 µg) ]; **fluoroquinolonas** [ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg)]; **carbapenemas** [imipenem (10 µg),]; **Penicilinas** [ampicilina (10 µg), pnicilina G (10 µg), piperaciclina (10 µg)]; **ac. Nalidilico** (30 µg), **cloranfenicol** (30 µg), **clidamicina** (2 µg), **eritromicina** (15 µg), **kamikacina** (30 µg), **nitrofurantoina** (30 µg), **perfloxacin** (30 µg), **tazobactam** (10 µg) e **vancomicina** (30 µg), (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). A suspensão de *P. aeruginosa* foi obtida do crescimento em Agar nutriente por 18h, com uma D.O 600nm de 0,8 (10<sup>6</sup> UFC/mL) e 0,1mL foi inoculado em placas de Petri contendo 9,9mL do meio MH sólido, seguido da colocação de discos na superfície do meio. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e os halos formados ao redor dos discos foram lidos utilizando-se um halômetro, sendo o resultado expresso em milímetros

## 3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos com o antibiograma das amostras selvagem, após aclimação com 32 e 52 µg/mL de cádmio estão apresentados na Tabela 1.

Observa-se que ocorre uma frequência de resistência a múltiplos fármacos em *P. aeruginosa* selvagem, compatível com a maioria dos isolados clínicos. Além disso, observou-se resistência cruzada principalmente, em relação aos antibióticos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, sendo corroborado pela literatura (Figueiredo et al., 2007; Mata, Abegg, 2007; Ferreira, Lala, 2010).

O processo de eliminação plasmidial em

*Pseudomonas aeruginosa* UCP 1567 foi estudado utilizando a CMI 32 µg/ml para cádmio, seguido da primeira aclimação na mesma concentração. Ao realizar o antibiograma observou-se que o cádmio foi eficiente eliminando a marca de resistência para os seguintes antibióticos: Ampicilina, Ciprofloxacina, Clidamicina, Eritromicina, Gentamicina, Amicacina, Penicilina, Perfloxacina, Piperaciclina e Tazobactan, correspondendo a frequência de 84,61%.

Um nova aclimação em cádmio foi realizada empregando a nova CMI que correspondeu a 54 µg/mL, sendo observado um aumento na frequência de cura plasmidial para 92,30 % . Essa frequência obtida para *P. aeruginosa* é superior a encontrada em outros produtos com habilidade de realizar cura plasmidial, como brometo de etidio, rifampicina e novobiocina (Pereira et al. 2004).

Uma variedade de compostos tais como corantes de acridina, brometo de etidio, rifampicina, sal de bis-amônio , metais, como a prata e mais recentemente a tioridazina, uma fenotiazina, assim como antibióticos inibidores da subunidade B da DNA girase, novobiocina e coumermicina tem sido relatada na literatura para eliminar plasmídios de resistência a drogas. (Weisser , Wiedmann 1985; Fu et al. 1988; Radhakrishnan et al. 1999; Catão et al. 2010).

Tabela1. Antibiograma das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* selvagem e após aclimatadas em 32 e 52µg/mL de cádmio

ANTIBIOTICOS	Selvagem	Aclimação	
		32ug	52ug
Ácido Nalidilico	S	S	S
Amicacina	S	S	S
Ampicilina	R	I	I
Cefepime	R	R	R
Cefoxitina	R	R	I
Ciprofloxacina	R	S	S
Clidamicina	R	S	S
Clorofenicol	S	S	S
Eritromicina	R	S	S
Gentamicina	R	S	S
Imipinem	S	S	S
Amicacina	R	S	S
Nitrofurantina	R	S	S
Norfloxacina	R	S	S
Penicilina	R	I	I
Perfloxacina	R	S	S
Piperaciclina	R	S	S
Tazobactan	R	S	S
Vancomicina	R	S	S

R= resistente; I = intermediário; S= sensível

Variações entre os percentuais de frequência de cura podem ser encontradas em substâncias de um mesmo grupo farmacológico. De modo que esses resultados estão em concordância com outros relatos que encontraram diferentes percentuais quando avaliaram a capacidade das fluorquinolonas em eliminar marca de resistência para penicilina em linhagens de *S. aureus*, detectando uma frequência de cura de 0,88% e 0,49% respectivamente, para ciprofloxacina e norfloxacina na linhagem 319U. (Pereira et al. 2004). Catão et.al (2010) em estudos realizado com riparinas alcançou um percentual de cura de resistência plasmidial de 61%.

O efeito do cádmio na eliminação da marca de resistência a drogas abre espaço para novas investigações,

principalmente, os mecanismos naturais envolvidos. Contudo, é possível sugerir que o mecanismo envolvido provavelmente está relacionado à complexação com a DNA girase, causando assim a eliminação de plasmídeos. Entretanto é importante ressaltar que a flutuação na eliminação de plasmídeos pode refletir também em uma peculiaridade da linhagem em estudo (Lacey e Chopra 1974; Catão et al. 2010).

Desta forma, estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* desprovidas de resistência a drogas poderá ampliar o potencial de aplicação em processos de bioremediação, minimizando assim a exposição humana a riscos ambientais causados por microrganismos resistentes.

### Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq, do PROCAD- CAPES e da UNICAP

## 5 . Referências

Begic S, Worobec EA.(2007) , Fluoroquinolone resistance of *Serratia marcescens*: sucrose, salicylate, temperature, and pH induction of phenotypic resistance. **Can. Jour. of Microbiol.**, v;53, n.11, p.1239-1245,

Catão R. M. R , Barbosa filho J.M, Lima E.O., Pereira M.S.V, Silva M.A.R., Arruda T.A , Antunes R.M.P,(2010) Evaluation of the antimicrobial activity and biological effect by riparins about elimination the resistance of drugs in samples of *Staphylococcus aureus* **RBAC**, vol. 42(1): 9-14,

De Vos D, Lima Jr A, Pirnay JP, Duinslaeger L, Revets H, Vanderkelen A, Hamers R, Cornelis P.( 1997), Analysis of epidemic

*Pseudomonas aeruginosa* isolates by isoelectric focusing of pyoverdine and RAPD-PCR: modern tools for an integrated anti-nosocomial infection strategy in burn wound centers. **Burns** 23: 379-386,.

Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, Quentin C.( 2001), Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of Cefepime-Amikacin therapy and analysis of -lactam resistance. **J Clin Microbiol** 39:2072-2078

Ferreira,H.;Lala, E.R.P. (2010)*Pseudomonas aeruginosa*:Um alerta aos profissionais de saúde. **Rev Panam Infectol** 12(2):44-50.

Fu K.P., Grace M.E., Hsiao C.L. & Hung P.P. (1988), Elimination of antibiotic resistant plasmids by quinolone antibiotics. **Chemother.** 34:415-418

Hernandez J, Ferrus MA, Hernandez M, Alonso JL. (1997), Comparison of six different methods for typing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from bottled and well waters. **Water Res** 31: 3169-3174

Lacey R. W.; Chopra, I. Genetic studies of multiresistant strain of *Staphylococcus aureus*. **Jour. of Med. Microbiol.**, 7: 285-287, 1974.

Mata PTG, Abegg MA.( 2007) Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arq Mudi.**;11(2):20-25.

Kumar, A.; Worobec, E.A.(2002), Fluoroquinolone resistance of *Serratia marcescens*: involvement of a proton gradient-dependent efflux pump. **Jour. of Antim. Chemoth.**.v. 50, p. 593–596,

Pai H, Kim JW, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh W. (2001), . Carbapenem resistance mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antim. Agents Chemoth.** 45: 480-484,.

Radhakrishnan V., Ganguly K., Ganguly M., Datidar S.G. & Chakrabarty A.N.(1999), Potentiality of tricyclic compound thioridazine as an effective antibacterial and antiplasmid agent. **J. Exp. Biol.** 37:671-675.

Santos FL, Santos BIAML, Xavier DE.( 2002), Determinação da produção de metalo-lactamases em amostras de *Pseudomonas*

*aeruginosa* isoladas. **J Bras Patol Med Lab**;38(4):291-6.

Segretti J.( 1989) , Nosocomial infections and secondary infections in sepsis. **Crit Care Clin.**;5(1):177-89.

Tavares W.( 2001), **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, 3ª . ed.,São Paulo: Atheneu.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL.( 2002), Microbiologia. 6.ed Porto Alegre: **Artmed**; p.321-32.

Weisser J. e Wiedemann B. (1985), Elimination of plasmids by new 4quinolones. **Antimicrob. Agents Chemother.** 28(5):700-702.

Pereira M.S.V., Siqueira Júnior J.P. ;Campos Takaki, G.M.( 2004), Elimination of resistance to drugs by fluoroquinolones in bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n.1, p.11-14,.

# CAPÍTULO III

## SEGUNDO ARTIGO

---

### **DESCOLORAÇÃO DO PRETO REMAZOL POR ESTIRPE DE *Pseudomonas aeruginosa* APÓS ELIMINAÇÃO DE RESITÊNCIA A DROGAS**

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico

**Dyes and Pigments**

**DESCOLORAÇÃO DO PRETO REMAZOL POR ESTIRPE DE *Pseudomonas aeruginosa* APÓS ELIMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA A DROGAS**

**José Carlos Vilar Junior<sup>1,2</sup>, Carlos Alberto Alves da Silva<sup>1,2</sup>, Galba Maria de Campos Takaki<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de processos ambientais, UNICAP, Recife, PE, Brasil;

<sup>2</sup> Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, NPCIAMB, UNICAP, Recife, PE, Brasil

Correspondência do autor: Galba Maria de Campos-Takaki, Departamento de Química, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Boa Vista. 50050-590, Recife - Pe, Brasil. Tel. +00-55-81-2119.4017; Fax: +00-55-81-2119.4043. E-mail: takaki@unicap.br.

## Resumo

A biodegradação do azo corante Preto Remazol B usado em indústrias têxteis foi investigada usando *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 1567) de isolado clínico após eliminação de resistência, sob diferentes condições de cultivo, usando um planejamento fatorial  $2^3$ , que teve como variáveis independentes, a agitação, concentração do corante e tamanho do inóculo, e como variável resposta, a descoloração do corante. De acordo com os resultados *P. aeruginosa* promoveu uma descoloração de 85 -94,4% do corante, sob condições de repouso, 52% sob agitação de 100 rpm e 45% sob agitação de 200 rpm. Nos frascos mantidos em repouso, o pH do meio variou de 5,8 a 8,5. O bioensaio usando *Artemia salina* apresentou mortalidade de > 80%, quando comparada ao controle, indicando a recalcitrância do composto. Os resultados obtidos demonstram que das três variáveis usadas, a agitação, concentração do corante e o tamanho do inóculo são significativas no processo de remoção do Preto Remazol e que a descoloração por *P. aeruginosa* envolve co-metabolismo o qual pode ser fortemente afetado pela aeração, demonstrando ainda que o oxigênio inibe a atividade azoredutase, envolvida no processo de descoloração de azocorantes.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*, descoloração, azo corante Preto Remazol B, co-metabolismo

## 1. Introdução

Devido à natureza sintética e a estrutura química complexa, as moléculas dos corantes permanecem por longos períodos na natureza. Os azo corantes constituem a maior classe de corantes sintéticos, sendo caracterizados por sua típica ligação -N=N- [1]. Estes compostos recalcitrantes podem causar sérios problemas ambientais, devido à formação de compostos carcinogênicos ou mutagênicos. [2]

A elevada solubilidade na água, faz com que os azo corantes não sejam degradados por plantas convencionais de tratamentos de esgotos [3,4]. Deste modo, efluentes coloridos contendo azo corantes reativos têm causado sérios problemas ambientais, principalmente, porque estes compostos, quando presentes na água são altamente visíveis, afetando a transparência e estética do corpo aquático [2,5].

Dessa maneira, é importante que se investigue linhagens microbianas que apresentem elevado potencial de descoloração, através da clivagem redutiva do grupo azo na molécula dos corantes têxteis. Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm demonstrado a habilidade de vários microrganismos em transformar compostos azo em produtos não coloridos, bem como, realizar completa mineralização, sob determinadas condições ambientais [6,7].

As bactérias têm sido citadas como uma aplicação promissora no tratamento de efluentes têxteis, devido aos custos de investimento que são de cinco a vinte vezes menores que em alguns processos de tratamentos químicos, como por exemplo, o ozônio ou peróxido de hidrogênio [8,9]

A biotransformação aeróbica dos azo corantes por fungos e bactérias tem sido bastante estudada. Segundo Abraham et al. [10,9] o tratamento aeróbico é mais atrativo, como método de biodegradação destes compostos. Neste processo, o metabolismo redutivo aeróbico requer enzimas específicas (azoredutases aeróbicas) que catalisam a redução do composto azo através de NAD-dependentes [4]. As azoredutases aeróbicas (flavinas monoméricas) isoladas de *Pseudomonas* K22 e KF46 utilizam NADPH e NADH como co - fatores na redução de diversos corantes sulfurados [11].

Considerando que a descoloração dos azo corantes pode ser influenciada por diversos fatores com variados graus de importância, os modelos fatoriais têm sido usados como uma importante ferramenta tanto para a realização de pesquisas, como para trabalhos aplicados [12, 13,14]. Neste sentido, devem ser considerados parâmetros significativos para um determinado processo, assim como, a interação entre eles, permitindo que processos de otimização nos processos de descoloração sejam alcançados. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de descoloração do Preto Remazol por *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 1567), sob diferentes condições de cultivo, usando um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>

## 2. Material e Métodos

### 2.1.1. Microorganismo

*Pseudomonas aeruginosa* UCP 1567 foi cedida pelo Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais NPCIAMB, UNICAP, Recife, Brasil, registrado no World Federation Culture for Collection-WFCC, sendo mantida no meio Ágar nutriente a 4°C.

### 2.1.2 Corante

O corante utilizado foi o azo reativo Remazol Black B (C.I. 17095) obtido da Sigma (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA).

## 2.2 Descoloração do Preto de Remazol por *P. aeruginosa*

### *Pré- inoculo*

*Pseudomonas aeruginosa* foi previamente cultivada em 100 mL de caldo Luria Bertani (LB) ( $\text{g L}^{-1}$ ) : triptona 10g, extrato de levedura 5g, NaCl 10g, adicionado de glicose 5g distribuído em frasco Erlenmeyer de 250 mL e incubada por 12 h sob agitação de 150 rpm a 37°C, resultando em uma cultura de  $10^8$  UFC/mL.

### *Cinética de descoloração*

Em seguida, inóculos de 1, 3,75 e 5 mL foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio LB adicionado de glicose, pH  $7,0 \pm 0,2$ . Os ensaios foram realizados de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ , por 120 h à 37°C. Amostras eram obtidas a cada 24h para determinação da cinética de descoloração.

## 2.3. Métodos Analíticos

### 2.3.1. Determinação pH.

O pH do meio livre de células foi medido utilizando um pHmetro Orion, modelo 310.

### 2.3.2. Descoloração Preto de Remazol

A remoção do corante foi avaliada, após a centrifugação (10.000 g x 8 min.), temperatura 28°C, através de leitura espectrofotométrica de 597 nm.

O cálculo da descoloração foi realizado através da equação :

$$\text{Remoção da cor (\%)} = \frac{(A) - (B)}{(A)} \times 100$$

onde, (A) indica a absorbância do meio líquido não inoculado e (B) indica a absorbância residual do meio líquido contendo preto remazol

### 2.3.3. Ensaio de toxicidade

O ensaio biológico foi realizado utilizando a metodologia de McLaughlin et al. [15] nos ensaios 1, 2, 3 (maior descoloração). Cerca de 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para frascos contendo a amostra teste (material descolorido) com diferentes concentrações (25, 50, 75%), diluídas em 5 mL de água artificial do mar. Teste controle foi realizado contendo somente água do mar. Os testes foram realizados em triplicata. A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 h de exposição.

## 2.6. Planejamento fatorial

A matriz de planejamento, os níveis inferior e superior foram substituídos por -1 e +1, respectivamente, o que torna os valores dos níveis no ponto central todos iguais a zero. O planejamento fatorial completo  $2^3$  para analisar os efeitos e interações das variáveis independentes: volume do inóculo, concentração do corante e agitação, sobre a

variável resposta, percentual de descoloração após 120 h. Todos os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA versão 5.0 da Statsoft, USA (Tabela 1),

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Descoloração do azo corante

A descoloração dos azo corantes tem como reação inicial a clivagem redutiva do grupo azo. Contudo, sob condições anaeróbicas estas reações podem ser catalisadas por diversos sistemas biológicos, conduzindo ao acúmulo de aminas aromáticas [16]

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm relatado alguns fatores que podem afetar a remoção dos corantes sintéticos durante o processo de descoloração microbiana. Dentre eles, os fatores nutricionais (fontes de carbono e nitrogênio) e fatores físicos (temperatura, agitação e pH, dentre outros) podem influenciar na degradação dos compostos azo (7, 17,18)

Neste sentido, experimentos foram realizados com *P. aeruginosa* (UCP 1567) durante 120 h, usando diferentes combinações das três variáveis escolhidas (agitação, concentração do corante e tamanho do inóculo) de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Dessa forma, observou-se que a melhor taxa de descoloração do corante foi obtida quando todas as variáveis independentes encontravam-se reguladas em seu nível inferior (ensaio 1), promovendo uma descoloração de 94% e sugerindo a clivagem do grupo azo do corante (Tabela 1).

Quando as variáveis independentes se encontravam em seu nível superior (ensaio 8), a taxa de descoloração visivelmente diminuiu, sendo de apenas 38%. No entanto, quando os frascos foram submetidos à agitação moderada (100 rpm), a taxa de descoloração foi maior (52%) (Tabela 1). Nos ensaios com maior descoloração, se observou um aumento no pH do meio, sugerindo a presença de aminas, provenientes da clivagem do corante e reconhecidas pela alcalinidade (Tabela 1).

Para Padmavathy et al. [19] a descoloração dos azo corantes reativos Vermelho RB e Vermelho Remazol usando glicose como co-substrato, contribuiu para uma descoloração de 91-94%.

A cor dos corantes Vermelho Congo e DB 38 foi removida em até 98 e 72%, respectivamente, por *Escherichia coli* sob condições anaeróbicas e nenhuma descoloração ocorreu durante a incubação aeróbica [20]. Segundo Chang et al. [12] a presença do oxigênio não inibe diretamente a atividade azoredutase, sendo esta inibição, provavelmente, um evento dependente do metabolismo microbiano. Bromley-Challenor et al. [21] relataram que agitação suave ocasional promove uniformidade do corante, diminuindo as limitações de difusão.

Silveira et al, [22] em estudo da Seleção de *Pseudomonas* para descoloração de corantes têxteis industriais observou para o metil-laranja, uma descoloração de 98%

após 48h e 78% após 56h respectivamente, sob condições anaeróbicas. Ao estudar o corante têxtil Acid Blue 92, comprovam que as duas linhagens foram capazes de descolorar concentrações inferior a  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , chegando a descoloração de 98% em *P. oleovorans* e 94% para *P. aeruginosa*. No entanto, a descoloração do corante por *P. aeruginosa* diminuiu rapidamente, na concentração de  $70 \text{ mg / L}$  para 50% de descoloração, enquanto *P. Oleovans* foi capaz de remover 90% da cor da tintura na concentração de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  e até 76% a  $90 \text{ mg L}^{-1}$

Chang e Kuo [12] ao estudar a descoloração do corante reativo Vermelho 22, usando *Escherichia coli*, sob condições anóxicas e aeróbicas, também observaram que o nível de oxigênio dissolvido inibiu significativamente a remoção da cor. Segundo Isik e Sponza [20] a descoloração dos azo corantes Vermelho Congo e Preto Reativo 38 em culturas de *Pseudomonas sp.* foi 100 e 83%, respectivamente, após cinco dias de incubação anaeróbica. Contudo, sob condições microaerofílicas, apenas descoloração de 76 e 74%, respectivamente, foi observada. Nenhuma descoloração ocorreu sob condições aeróbicas.

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 1), observa-se que variáveis independentes (tamanho do inoculo, concentração do corante e agitação) exerceram um efeito negativo no processo de descoloração do corante, contudo, somente a agitação apresentou efeito estatisticamente significativo, sugerindo que esta variável é um parâmetro de grande importância no processo de descoloração do preto remazol por *P. aeruginosa*.

### 3.3. Toxicidade

Ensaio de toxicidade usando *A. salina* nas amostras descoloridas (ensaio 1,2 e 3), foram realizados afim de determinar a toxicidade aguda do corante após o tratamento com *P. aeruginosa*.

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade são mostrados na Figura 2. A porcentagem de mortalidade foi comparada com o controle, que não apresentava nenhuma substância tóxica. Dentre as amostras testadas, o ensaio 1 apresentou menor toxicidade (80%). Os demais ensaios apresentaram mortalidade elevada (>80%). Segundo Amoozegar et al. e Evangelista et al. [16 , 24] a mortalidade observada pode ser sugerida pela presença de grupos  $\text{SO}_3\text{H}$ , que freqüentemente resistem a biodegradação ou são degradados somente parcialmente.

Assim, pôde-se observar que a degradação do corante formou metabólitos, que se apresentaram tóxicos para *A. salina*. A presença de ácido sulfanílico, presente no meio pode ter contribuído para a toxicidade apresentada. Segundo Isik e Sponza [20] testes de toxicidade usando *D. magna* mostraram que a parcela não degradável do corante era responsável pela toxicidade.

### 3.4 Deteminação PH

O pH do meio ao longo do cultivo tendeu a faixa alcalina (8,0) (tabela 1). Este fato pode ser explicado pela produção de metabólitos intermediários (aminas aromáticas), a partir da biodegradação do composto. O pH diminuiu com 24h (5,7), tendendo a faixa alcalina ao final do cultivo (8,2) (Figura 3). A diminuição inicial do pH é justificada pelo acúmulo de ácidos orgânicos, resultante da degradação da glicose. [25]

Segundo Adebayo et al. [26] a descoloração total do corante Vermelho de Metila (5 mg L<sup>-1</sup>) usando um consórcio bacteriano, foi observada após 24 h em pH 7 e 8 e de apenas 82 e 65% em pH 5 e 6, respectivamente.

#### 4. Conclusões

Nas condições estudadas *P. aeruginosa* após eliminação da frequência de resistência plasmidial remove efetivamente o azo corante preto de remazol em condições de co-metabolismo. A aplicação do planejamento fatorial demonstra que das três variáveis utilizadas, somente uma (agitação), parece afetar significativamente o processo de descoloração do preto de remazol usando *P.aeruginosa*

#### Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq, do PROCAD- CAPES e da UNICAP.

#### 5 . Referências

- [1] MANU, B., CHAUDHARI, S., R. Decolorization of indigo and azo dyes in semicontinuous reactors with long hydraulic retention time. **Process Biochemistry**. 2003 38, 1212-1221.
- [2] BALAN, D.S.L. Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis. Revista Brasileira de Técnicos Têxteis - ABTT. Ano 1, n.1, p. 16-18, 2009. Disponível em: <<http://abtt.org.br/revistas.htm>>. Acesso em: 01 set 2009
- [3] PAGGA, U, BROWN, D. ; The degradation of dye stuffs. Part II. Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. **Chemosphere** 1986; 15:479-491.
- [4] KUDLICH M, HETHERIDGE MJ, KNACKMUSS HJ, STLOZ A. Autoxidation reactions of different aromatic o-aminohydroxynaphthalenes that are formed during the anaerobic reduction of sulfonated azo dyes. **Environmental Science & Technology** 1999; 33:896-901.
- [5] SUPAKA N, JUNTONGJIN K, DAMRONGLERD S, DELIA M-L, Strehaiano P. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. **Chemical Engineering Journal** 2004;99:169-176.

- [6] BLUMEL S, KNACKMUSS H-J, STOLZ A. Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F. **Applied and Environmental Microbiology** 2002;68:3948-3955
- [7] MARINHO,G. Viability of the synthetic textile wastewater treatment in a fixed-bed aerobic reactor. **Eng. Sanit. Ambient.** 2010, vol.15, n.1, pp. 99-106. ISSN 1413-4152.
- [8] MARCO, A., ESPLUGAS, S., SAUM, G.,. How and why combine chemical and biological processes for wastewater treatment. **Water Science Technology.** 1997 35, 321-327.
- [9] PANDEY,B.V. ; UPADHYAY,R.S. ; *Pseudomonas fluorescens* can be used for bioremediation of textile effluent Direct Orange-102 . **Tropical Ecology** 51(2S): 397-403, 2010 ISSN 0564-3295
- [10] ABRAHAM T.E; SENAN R.C; SHAFFIQU T.S.; ROY J.J.; POULOSE T.P.; THOMAS PP. Bioremediation of textile azo dyes by an anaerobic bacterial consortium using a rotating biological contactor. **Biotechnology Progress** 2003;19:1372-1376.
- [11] ZIMMERMANN T; GASSER F; KULLA, H.G.; LEISINGER, T. Comparison of two bacterial azoreductases acquired during adaptation to growth on azo dyes. **Archives of Microbiology** 1984;138:37-43.
- [12] Chang, J.-S., Kuo, T.-S., Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. **Bioresource Technology** 2000; 75, 107-111.
- [13] Mielgo, I., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, J.M., A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). **Journal of Biotechnology** 2001; 89, 99-106.
- [14] CHEN K; YAO, Y.L.; Process optimization in pulsed laser micromachining with applications in medical device manufacturing. **International Journal Advances Manufacturing Technology** 2000;16:243-249.
- [15] McLaughlin JL, Saizarbitoria TC, Anderson JE. Três bioensayos simples para químicos de productos naturales. **Revista Sociedad Venezolana de Química**, 1995;18:13-18
- [16] Amoozegar M.A , Hajighasemi M. , Hamed J., Asad S., Ventosa A. Azo dye decolorization by halophilic and halotolerant microorganisms. **Ann Microbiol**,2010, DOI 10.1007/s13213-010-0144-y
- [17] Mielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). **Journal of Biotechnology** 2001;89:99-106.
- [18] Chang J-S, Kuo T-S. Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. **Bioresource Technology** 2000;75:107-111.
- [19] Padmavathy, S., Sandhya, S., Swaminathan, K., Subrahmanyam, Y.V., Chakrabarti, T., Kaul, S.N.,. Aerobic decolorization of reactive azo dyes in presence of various cosubstrates. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly** 2003;17, 147-151.
- [20] Isik M, Sponza DT. Effect of oxygen on decolorization of dyes by *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp. and fate of aromatic amines. **Process Biochemistry** 2003;38:1183-1192.

[21] Bromley-Challenor KCA, Knapp JS, Zhang Z, Gray NCC, Hetheridge MJ, Evans MR. Decolorization of an azo dye by unacclimated activated sludge under anaerobic conditions. **Water Research** 2000;34:4410-4418.

[22] E. Silveira ,, P.P. Marques , S.S. Silva , J.L. Lima-Filho , A.L.F. Porto , E.B. Tambourgi,. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. **International Biodeterioration & Biodegradation** 63 ,2009 230–235

[23] Isik M, Sponza DT. Monitoring of toxicity and intermediates of C.I. Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. **Journal of Hazardous Materials B** 2004;114:29-39.

[24] EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; FRANCO, L.; VIEIRA R.H.S.F.; CAMPOS-TAKAKI, G. Cinética de crescimento do *Geobacillus stearothermophilus* frente ao azo corante Alaranjado II. In: Resumos... **IX Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental**, Curitiba, 2004.

[25] AMBRÓSIO, S. T. Remoção de corantes utilizados em indústria têxtil por *Cunninghamella elegans* UCP 542. Recife, 2002. Tese de doutorado.Universidade Federal de Pernambuco, 2002.

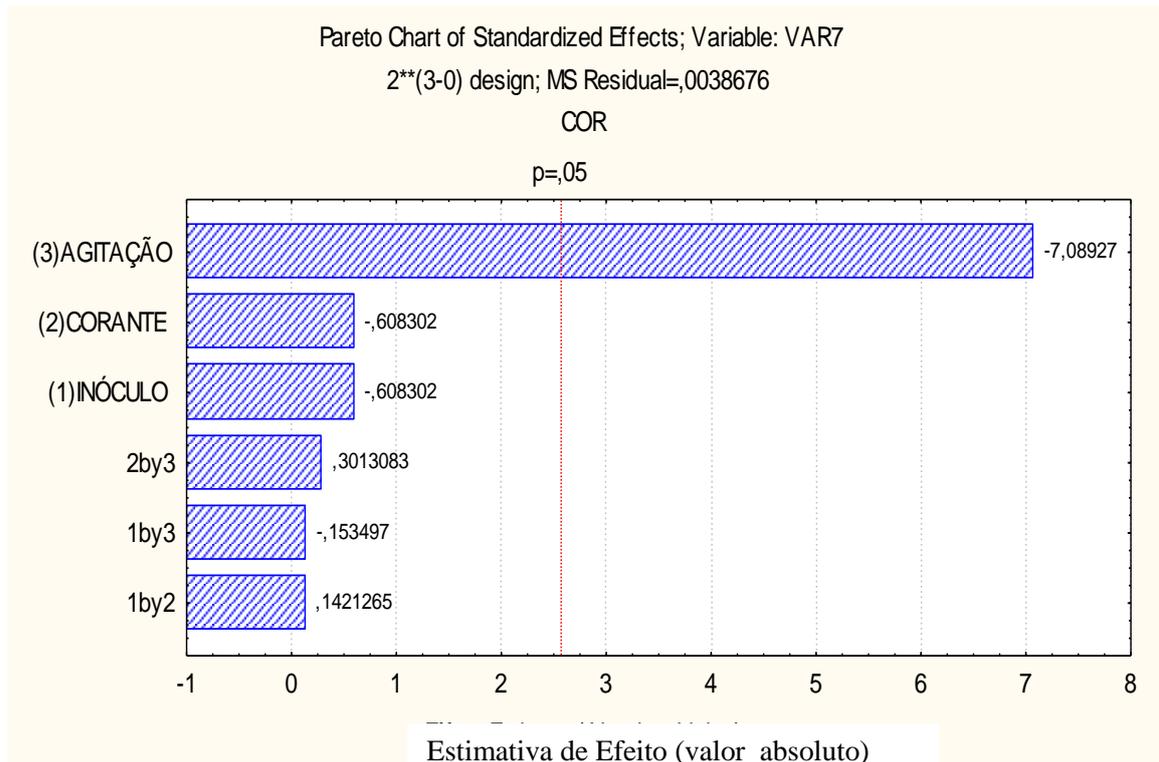
[26] ADEDAYO, O., JAVADPOUR, S., TAYLOR, C., ANDERSON, W. A., MOO-YOUNG, M. Decolourization and detoxification of methyl red by aerobic bacteria from a wastewater treatment plant. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.20, p.545-550, 2004.

# ANEXOS

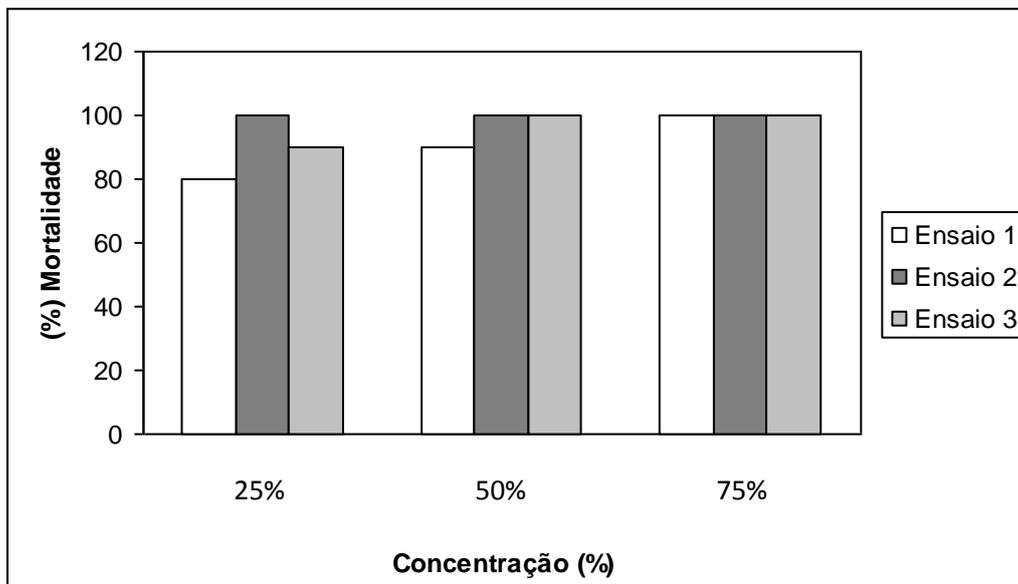
**Tabela 1.** Matriz codificada do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> em relação à resposta de descoloração do Preto Remazol B e pH por *Pseudomonas aeruginosa* UCP 1567 após 120de cultivo a 37°C .

Amostra	Níveis dos Fatores <sup>a</sup>			Descoloração (%) <sup>b</sup>		PH final <sup>c</sup>
	Inóculo	Corante	Agitação	24h	120h	
1	-1	-1	-1	14,3%	94,4%	8,2
2	+1	-1	-1	7,0%	89,1	8,0
3	-1	+1	-1	9,0%	86,9 %	8,2
4	+1	+1	-1	11,0 %	85 %	7,9
5	-1	-1	+1	9,4%	45%	7,6
6	+1	-1	+1	5,8 %	40,2 %	8,0
7	-1	+1	+1	7,0 %	43 %	8,2
8	+1	+1	+1	7,1 %	38 %	8,2
9	0	0	0	12%	52,6%	8,0
10	0	0	0	9,7%	53,4%	8,3
11	0	0	0	6%	52,3%	7,9
12	0	0	0	8,4	52,2%	8,0

<sup>a</sup> Níveis dos fatores, codificados como valores de -1 e +1 e 0 (ponto central) na tabela, como segue: Inóculo (10<sup>8</sup>): 2,5 mL para o nível -1; 3,75 mL nível 0; 5 mL nível +1; Concentração do corante: 1mM para o nível -1; 1,5 mM nível 0; 2,0 mM nível +1; Agitação: 0 rpm para nível -1; 100 rpm nível 0; 200 rpm nível +1. <sup>b</sup> Resposta obtida com cada ensaio referente a descoloração do Preto Remazol B por *Pseudomonas aeruginosa*. <sup>c</sup> pH final do meio ao termino do experimento em cada ensaio.



**Figura 1.** Diagrama de Pareto mostrando os efeitos principais e interações das variáveis independentes no processo de descoloração do Preto Remazol B por *Pseudomonas aeruginosa* UCP 1567, após 120 h de cultivo a 37°C. (1) Tamanho do Inóculo, (2) Concentração do corante e (3) Faixa de agitação.



**Figura 2.** Avaliação da toxicidade dos metabólitos formados durante o processo de descoloração do Preto Remazol B, por *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 1567), após 120 h de cultivo a 37°C, usando *Artemia salina*.

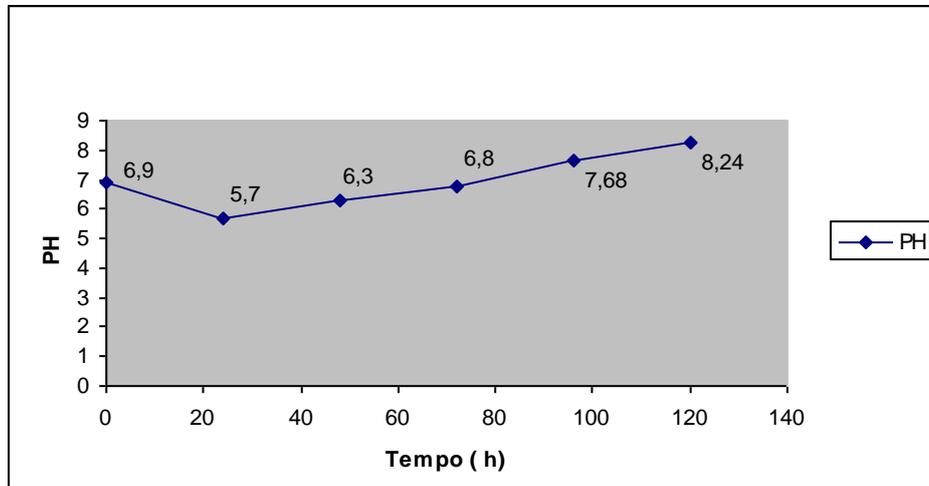


Figura 3 . Variação de PH durante o processo de remoção do azo corante Preto Remazol por *Pseudomonas aeruginosa* por 120h a 37° C. (ensaio 1)

# CAPÍTULO IV

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

A partir dos resultados obtidos conclui-se

- O cádmio mostrou – se eficiente no processo de eliminação de plasmídeos de resistência em *Pseudomonas aeruginosa* UCP 1567;
- O processo de aclimação em maiores concentrações de cádmio aumentou o percentual de eliminação de resistência a drogas em *P. aeruginosa* em 7,69%;
- A eliminação da frequência de resistência plasmidial não altera o potencia de biorremediação do gênero *P. aeruginosa*.
- *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 1567) apresenta elevado potencial de descoloração do azo corante Preto de Remazol.;
- Dentre as variáveis de partida concentração do corante, tamanho do inóculo e agitação exerceram um efeito negativo no processo de descoloração do corante, contudo, somente a agitação apresentou efeito estatisticamente significativo.

# **INSTRUÇÕES DAS REVISTAS**

The **Brazilian Archives of Biology and Technology**, publishes original research papers, Short notes and Review articles in English in the interdisciplinary areas of biological sciences and engineering/technology

### **Preparation of manuscripts**

Submission of paper implies that it has not been published or being considered for publication elsewhere. Care should be taken to prepare a compact manuscript with precision in presentation, which will help authors in its acceptance. All the papers are subjected to review by referees.

### **Manuscript**

Three copies of the single-spaced typed manuscript (maximum 12 pages) on a high grade A-4 size paper (210x297 mm), with margins (left 25, right 20, superior and inferior 30 mm) should be prepared. This should be divided under the following headings: ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS, RESUMO, REFERENCES. These headings should be typed in bold upper case (12 font).

### **Title**

The title (18 font, bold) of the paper should clearly reflect its contents. It should be followed by the name(s) of author(s) with expanded initials (12 font, bold) and the address(s) (*italic*, 10 font) of the institution(s) where the work has been carried out.

### **ABSTRACT**

Each paper should be provided with an abstract (*italic*) of 100-150 words, describing briefly on the purpose and results of the study. It should be prepared as concisely as possible.

### **Key words**

Authors should provide three to six key words that will be used in indexing their paper.

### **INTRODUCTION**

This should describe the background and relevant information about the work. It should also state the objective of the work.

### **MATERIALS AND METHODS**

Authors must take care in providing sufficient details so that others can repeat the work. Standard procedures need not be described in detail.

### **RESULTS AND DISCUSSION**

Results and Discussion may be presented separately or in combined form (authors may decide easier way for them). Preliminary work or less relevant results are not to be described. The reproducibility of the results, including the number of times the experiment was conducted and the number of replicate samples should be stated clearly.

## RESUMO

An abstract of the paper should also be prepared in Portuguese and placed before the list of References. Authors from other than Latin American countries can seek the help of Editor's office to prepare Portuguese resumo of their papers.

## REFERENCES

References in the text should be cited at the appropriate point by the name(s) of the author(s) and year (e.g. Raimbault & Roussos, 1996; Raimbault *et al.*, 1997). A list of references, in the alphabetic order (10 font), should appear at the end of the manuscript. All references in the list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished results should not be included in the list. Examples of references are given below.

### *In journals:*

Pandey, A. (1992), Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem.*, 27, 109-117

### *Thesis:*

Chang, C. W. (1975), Effect of fluoride pollution on plants and cattle. PhD Thesis, Banaras Hindu University, Varanasi, India

### *In books:*

Tengerdy, R. P. (1998), Solid substrate fermentation for enzyme production. In-*Advances in Biotechnology*, ed. A. Pandey. Educational Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13-16

Pandey, A. (1998), *Threads of Life*. National Institute of Science Communication, New Delhi

### *In conferences:*

Davison, A. W. (1982), Uptake, transport and accumulation of soil and airborne fluorides by vegetation. Paper presented at 6<sup>th</sup> International Fluoride Symposium, 1-3 May, Logan, Utah

## Tables and Figures

Tables and figures, numbered consecutively with arabic numerals must be inserted at appropriate place in the text. These should be used to present only those data, which can not be described in the text.

### **Units and Abbreviations**

The SI system should be used for all experimental data. In case other units are used, these should be added in parentheses. Only standard abbreviations for the units should be used. Full stop should not be included in the abbreviation (e.g. m, not m. or rpm, not r.p.m.). Authors should use '%' and '/' in place of 'per cent' and 'per'.

### **Manuscript lay-out**

It is suggested that authors consult a recent issue of the journal for the style and layout. Except the title, abstract and key words, entire text should be placed in two columns on each page. Footnotes, except on first page indicating the corresponding author (8 font) should not be included. The entire manuscript should be prepared in Times New Roman, 11 font (except reference list, which should be in 10 font).

### **Spacing**

Leave one space between the title of the paper and the name(s) of the author(s), and between the headings and the text. No space should be left between the paragraphs in the text. Leave 0.6-cm space between the two columns.

### **Electronic submission**

Manuscript should be accompanied by a diskette indicating the name and version of the word processing programme used (use only MS Word 6/7 or compatible).

### **Referees**

When submitting the manuscript authors may suggest up to three referees, preferably from other than their own countries, providing full name and address with email. However, the final choice of referees will remain entirely with the Editor.

### **Page charges and reprints**

There will be no page charges. Reprints can be ordered up on acceptance of the paper. Manuscripts and all correspondence should be sent to the Editor, Prof. Dr. Carlos R. Soccol - **Brazilian Archives of Biology and Technology**

## **Dyes and Pigments**

### **Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

### **Article structure**

#### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

## **Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

## **Theory/calculation**

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

## **Results**

Results should be clear and concise.

## **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

## **Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

## **Appendices**

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## Essential title page information

**Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

**Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

**Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

**Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## Graphical

## abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

## High

## lights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

## Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

## Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

## Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

## Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In

principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

## Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

*Table* *footnotes*  
Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

## Artwork

### ***Electronic artwork***

#### *General points*

Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.

Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.

Number the illustrations according to their sequence in the text.

Use a logical naming convention for your artwork files.

Provide captions to illustrations separately.

Produce images near to the desired size of the printed version.

Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

⇒ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".  
TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.  
TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

### **Please do not:**

Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, PG); the resolution is too low;

Supply files that are too low in resolution;

Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### **Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### **Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

## **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

## **References**

### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### ***References in a special issue***

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### ***Reference style***

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–934) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).