

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**APLICAÇÃO DE *Neurospora crassa* PARA A
AVALIAÇÃO DA BIOSORÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE
CORANTES ÁCIDO, XANTENO, DIRETOS E REATIVO**

GISELE JANE DE JESUS

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Corso

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

Junho - 2005

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Quem sou completamente louca de amor!

Ao Prof. Dr. Carlos Renato Corso, por grande paciência nos momentos de dúvidas e divergências. Por grande carinho e amizade em todas as situações, compreensão nas horas de turbulência, apoio moral diante da ausência de respaldo material, com seu incentivo sempre muito forte, presente e fundamental. Sem dúvida alguma, pelo enorme respeito acima de tudo! Que Deus possa manter em ti, a sabedoria e a verdadeira felicidade em ser exatamente o que é! **“Tem dia que de noite é assim!”**. Por mostrar-me que o desenvolvimento de uma pesquisa de doutorado é muito mais importante que, o simples stress e a correria do dia-dia de laboratório, sendo fundamental conservar o bom humor, a alegria de viver e o prazer em se fazer o que gosta. Por compartilhar comigo um pouco de seus conhecimentos científicos, pessoais e humanos. Procurei palavras para exprimir tudo o que você significa para mim, e encontrei as mesmas que há algum tempo lhe escrevi, as mesmas porque nelas estão contidas as verdades absolutas que o meu coração senti! Obrigada por me ajudar a crescer.

Aos meus pais, meus maiores e mais valiosos tesouros. Eu os amo incondicional e eternamente.

A minha grande e especial família, todos os meus tios, tias, primos e primas, por todo o incentivo e apoio recebido de todos vocês. Na hora da decisão entre permanecer em Rio Claro ou voltar pra Dourados/MS, todos vocês me deram a força necessária para a tomada de decisão. Amo muito todos vocês.

A Profa. Dra. Dejanira F. de Angelis, que sempre me ofereceu consolo nos momentos de saudade de casa, dando-me a orientação de que na vida nem sempre as coisas são como gostaríamos mas, como devem ser. E que a escolha por um caminho nos impede de caminhar em outro.

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero, que como coordenador do curso de Pós Graduação em Microbiologia Aplicada, sempre mostrou-se atento às

necessidades e prioridades do curso, bem como a amizade sempre demonstrada.

A Profa. Dra. Sandra Mara, sempre companheira e disposta a transmitir seus conhecimentos, a respeito da química e de sua beleza existente. Obrigada por ajudar-me a entender um pouco mais sobre o que se passa em horizontes mais distantes, até mesmo os que aparentemente estão tão próximos.

A Profa. Dra. Sâmia Tauk Tornisielo, por colocar em mim, o desejo de ser responsável pela melhoria na qualidade de vida das pessoas a minha volta.

Ao Prof. Ederio D. Bidoia, por auxiliar-me nas dúvidas surgidas no decorrer de minha pesquisa, principalmente pelo respeito, atenção e disposição.

Ao Prof. Dr. José Carlos Marconato, por toda contribuição ao desenvolvimento desta pesquisa, e também, por estar sempre pronto a atender-me e ajudar-me.

A Profa. Dra. Antônia Marli pela concessão do Laboratório 5, para a execução de parte dos experimentos. Por partilhas em diálogos e trocas de conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Hércules Menezes, pela concessão do laboratório 5, por ter sido sempre prestativo e disponível a atender-me nas mais diversas necessidades.

A Ângela Scatolin, que mais que a secretária do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, tornou-se uma amiga, mostrou-me que o convívio e relacionamento profissional pode e deve ser selado com muito respeito e cordialidade. Sou muito grata a você.

Ao desenhista Ronaldo Bella, por demonstrar carinho e amizade, obrigada por partilhar comigo um pouco de suas qualidades e capacidades profissionais.

Ao Roberto José Pedro, por ensinar-me que o dia-a-dia de um laboratório deve ser decorado com muito humor, alegria e desejo de se fazer o que realmente acha importante na vida. Seu auxílio sempre foi mais que fundamental, passou a ser necessidade pessoal, devido a sua presteza e

satisfação em poder ajudar. Principalmente por deixar sempre viva a presença MARCANTI.

A Inês e Luiza, por me fazer crescer muito na fé, na compreensão familiar, nos relacionamentos e também em meu próprio amadurecimento.

Ao Luis Rosário e Carmem, sempre exemplo de pessoas amigáveis, dispostas a ajudar o próximo.

A “Nega”, pessoa encantadora, de bem com a vida e radiando felicidade para os que dela se aproximam, você será inesquecível, durante toda minha vida terei recordações maravilhosas de você.

Ao amigo “Zito”, pelas conversas de corredor e bate-papo no café, que me ajudaram um pouco mais a entender a vida.

Aos demais professores, técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, meu agradecimento.

A minha Família do Coração: D. Neusa, Sr. Ivo, Hosana, Moisés, Hellen e Diego, por terem me acolhido não só em vossas casas físicas, mas, principalmente, por terem me recebido em vossos corações. Com toda gentileza, espontaneidade e veracidade me receberam como “Filha gerada no coração por Deus”. Muito Obrigada! Deus os abençoe!

A amiga Gisela Régis, obrigada por tudo o que vivemos juntas, muitas histórias para contar e recordar, você é demais.

A amiga Cassiana Coneglian pelo apoio, companhia e sempre forte laços de amizade, aprendi muito com você, principalmente nos “bastidores” da vida laboratorial, são lições que me acompanharam por toda a minha vida.

A Aline Silva, Elaine Cristina M. Silva Zacarin, Claudia Helena Bracco Luccas, Giuliano Grici Zacarin, Wonder Passoni Higino, vocês se destacam na minha vida. São pessoas muito importantes e sempre terei saudades de todos os momentos de convivências, discussões, choros, carinhos e demonstrações de fidelidade e companheirismo.

A Claudia Celina Pigati, inexprimível tudo o que sinto, você rompeu a barreira da amizade e adentrou ao meu coração de uma forma que,

deixará sempre suas pegadas e suas marcas. Imensurável o amor que tenho por você, por tudo o que contigo e de ti aprendi, por ter me feito mais humana e mais Gisele, por ter me ajudado a me conhecer mais, que ao longo destes 5 anos de convivência, passamos por momentos de turbulências, revoltas, esfriamentos e principalmente verdades, em cada situação a manutenção da realidade e da veracidade fundamental. Obrigada por fazer da minha vida, uma vida mais Cristã e temente ao Nosso Senhor Jesus Cristo e Nossa Senhora.

Aos meus amados irmãos da Família Renovação Carismática Católica: Roberto, Neli, Cíntia, Naíinha, Soninha (também Claudia e Hosana), sem vocês a minha vida seria muito vazia, aprendi a amá-los mesmo nas diferenças, estas que me fizeram entender que as pessoas em suas diversidades completam em mim o que de vazio há! Obrigada por serem minhas preciosidades, jóias que só o verdadeiro Joalheiro Cristo Jesus, poderia possuir! Amo muito vocês e a saudade de todos me acompanhará por toda a minha vida.

A Vó Tica, Maria Luiza, Paulinha, por ser também a Família que o Senhor me concedeu, vocês são oásis no deserto da minha solidão, quando por diversas vezes derrubei lágrimas de saudade de casa. Não imaginam o bem que me fazem e certamente um vazio deixará em meu coração, quando a partida se fizer necessária, vazio este que, com ótimas recordações serão preenchidos.

Aos amigos Serginho (Sé), Júlio Bruetto e Émerson Brigatto, pelos momentos de alegria, brincadeiras e diversões e por terem me mostrado que a vida deve ser vivida com muita responsabilidade, visando o respeito e o bem-comum do próximo.

A Maria Neves e Lara Maria, vocês são tesourinhos que o Senhor me confiou para, mesmo que o tempo passe e a distância física nos afaste, estarei sempre velando por vocês e rogando a Deus que Ele se digne a abençoá-las a cada instante de suas vidas. Obrigada por terem me ensinado a viver em família e a sofrer com ela as suas dores.

A Solange Marques e Rosinéia Moreno, obrigada por permanecerem comigo ao longo de tantos anos, vocês são mais que amigas, são irmãs. Amo vocês.

A todos os meus amigos que me receberam em seus corações e que me ensinaram a viver melhor e intensamente, amigos que o Próprio Jesus Cristo os atraiu a mim. Nada existe por acaso e ninguém entra em nossas vidas por acaso, todos vocês têm suas parcelas de responsabilidade e culpas, por hoje ser quem sou!

A conquista deste título de Doutorado não me torna em nada superior a vocês, pelo contrário, implica em mim uma responsabilidade ainda maior com vocês, e principalmente com toda a sociedade, pois, todos somos filhos e filhas de Deus, que merecem respeito e consideração. Esta conquista também é de cada um que ao meu lado, sonhou, desejou e esperou por este momento. Amo muito a todos vocês.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Pós-graduação em nível de doutorado.

A JESUS CRISTO

Meu grande amor,

*Sem a **Tua luz**, este trabalho não se realizaria, se perderia na escuridão do infinito!*

*Sem a **Tua Bênção**, de nada valeria tanto esforço!*

*Sem a **Tua Permissão**, eu estaria cansada de tentar descobrir sozinha o caminho a seguir!*

*Sem o **Teu Amor**, minha vida não teria motivos para existir!*

*Sem a **Tua misericórdia**, meus pecados seriam jamais perdoados!*

*Sem a **Tua Piedade**, meu coração seria uma pedra... Sem vida, fria e insensível!*

*Sem **Tua Compaixão**, minhas ações seriam insensatas e meu agir não seria humano.*

*Sem a **Tua Morte de Cruz**, eu também estaria morta para a vida!*

*Sem o **Teu Sangue na Cruz**, minha alma viveria nas trevas e a sujeira do pecado estaria sobre mim, mas fui lavada!*

*Sem o **Teu Espírito Santo**, eu não seria ninguém, jamais encontraria razão para viver, sentir, agir, pensar!*

*Sem **Tu Senhor**, eu não quero viver! Minha vida está em tuas mãos!*

*Sem **Tu sendo o Senhor da minha vida**, eu não sou nada! Reina Senhor!*

A VIRGEM MARIA

Minha grande Rainha,

Quantas noites mal dormidas, rolando de um lado pro outro da cama, ouvindo o barulho do silêncio, tendo por companhia a escuridão da noite. Desejando o que de mim estava longe, articulando uma forma de anestésiar minha dor, dor que insistia em me visitar sempre que a noite caía dor que me fazia prisioneira de mim mesma, que me torturava e me acorrentava no vazio da imensidão do nada. A cama vazia me transportava para um mundo que minha imaginação criava, sem que eu pudesse evitar, meu travesseiro inundava, lágrimas que o mundo me obrigava a derrubar, lágrimas não de

sangue, só d'Ele era sangue, mas que em mim doía como se parte de mim estivesse sendo arrancado, chorava e soluçava como criança que parte do seguro para um mundo desconhecido

Exatamente assim me sentia, toda a dor e toda a lágrima que me custava a própria vida, era de saudades de meus pais, minha amada mãe e meu amado pai. Queria e queria que estivesse perto de mim, cuidando de mim e fazendo-me companhia, segurando a minha mão e rezando comigo até que eu adormecesse. Isto não era possível, longe demais estavam, gritar não escutariam, bater na porta não adiantaria, a solução era me entregar nos braços que desde a minha fecundação já me amparavam, sonhava-me e desejava-me, sem que eu percebesse me sustentavam... Em todos estes momentos, era nos braços de Nossa Senhora que eu me encontrava, minhas lágrimas eram enxugadas por seus cabelos, meu soluço era acalentado por seu mimo, o sono me visitava cada vez que para mim ela cantarolava, Quando mãos e braços físicos de meus pais estavam ausentes, eram seus braços espirituais que Nossa Senhora me oferecia. Toda a dor que eu sentia era, por seu Imaculado Coração, curado, a chaga de meu peito eram por suas lágrimas restauradas, pois, cada lágrima que o filho rejeita e cada dor que o filho sente, é o coração da mãe que se parte de dor e se derrama de tanto amor. Obrigada Minha Mãezinha Virgem Imaculada, sem a tua Graça e tua Presença, desistir já teria sido a solução para o meu mal de solidão. Voltado pra casa teria sido o caminho mais curto, quando na verdade a Senhora queria-me mais próxima de ti, usando do sacrifício a espera em Ti, por Ti e Contigo! Sou desesperadamente dependente de ti!

*Por isso Senhor, dedico o fruto do meu trabalho... **Toma Senhor que ele é Teu!***

*Por isso Senhora, dedico o fruto do meu trabalho... **Toma Senhora que ele é Teu!***

RESUMO

Este trabalho utilizou *Neurospora crassa* 74A em sua forma paramorfogênica, para avaliar o processo inicial da remoção da cor de efluentes aquáticos, que se desenvolveu em duas etapas; a biosorção e a biodegradação.

Os corantes utilizados foram “Acid Alizarin”, “Acid Blue 25”, “Acid Blue 29”, “Acid Blue 40”, “Acid Red 44”, “Acid Red 114”, “Acid Red 151”, “Acid Yellow 25”, “Direct Violet 51”, “Direct Red 23”, “Erythrosine B” e “Procion Red MX-5B”. Dentre estas as que apresentaram uma característica básica, de maior diferenciação colorimétrica após 120 horas de contato, foram analisados quanto as suas capacidades biosortivas. Os resultados demonstraram que as biomassas autoclavadas removeram mais corante do meio, do que as biomassas não autoclavadas; à medida que o valor de pH aumentou, diminuiu a capacidade de remoção dos corantes.

Com as melhores condições de remoção no teste de biosortividade, isto é, pH 2,50; foi realizado o estudo da aplicabilidade das equações das isotermas de Freundlich e Langmuir.

Foi feita interação “corante-parede celular” e outra “corante-corante”, como ficou evidenciado nos coeficientes de correlação da isoterma de Freundlich (multicamadas de moléculas de corante sobre o substrato adsorvivo), em detrimento a de Langmuir, que só admite a interação “corante-parede celular” (monocamada de moléculas de corante sobre o substrato).

O estudo da biodegradação foi possível a partir dos espectros no Ultra-Violeta (UV) e Visível (Vis), e Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR). As principais modificações estruturais de cada corante puderam ser presumidas pelos deslocamentos de picos no UV-Vis, ou de deslocamento e aparecimento de bandas em FT-IR. Nos espectros de UV-Vis foi possível estabelecer o grau de remoção do corante por biosorção, seguido, após um tempo mais longo de contato, do início de processo biodegradativo; em que ficou caracterizado, principalmente, o aparecimento de bandas, indicando a presença de aminas primárias, após 120 horas de contato. Deste modo, pode-se deduzir que o fungo após esgotar sua fonte de carbono decorrente do inóculo, recorreu à fonte de carbono alternativo, vindo do substrato mais próximo, ou seja, das moléculas de corantes.

No estudo da tolerância ficou evidenciado que todos os corantes estudados apresentaram fatores que provocaram uma diminuição da produção de biomassa, contudo, foi possível com a determinação da Concentração Efetiva (EC_{50}), que caracteriza a inibição ou mortalidade de 50% dos organismos testados, para saber o grau de toxicidade destes corantes. Os mais tóxicos foram “Procion Red MX-5B” em pH 2,50; seguido do “Acid Red 151” em pH 2,50. Menos tóxicos foram “Direct Red 23” no pH 6,50 e “Erythrosine B” no pH 4,50.

ABSTRACT

In this research *Neurospora crassa* 74A in its paramorphogenic form was used to evaluate the initial process of the dye removal from water effluents, which was carried out in two steps; biosorption and biodegradation.

The dyes used were: Acid Alizarin, Acid Blue 25, Acid Blue 29, Acid Blue 40, Acid Red 44, Acid Red 114, Acid Red 151, Acid Yellow 25, Direct Violet 51, Direct Red 23, Erythrosine B and Procion Red MX-5B.

Those that showed a basic characteristic of major colorimetric differentiation after 120-hours contact, their biosorptive capacities were analyzed. The results showed that the autoclaved biomass removed more dye from the medium than the non-autoclaved biomass; as the pH value increased the dye removal capacity decrease.

With the best removal conditions in the biosorptive test, that is, pH 2.50, an applicability study of the isothermal equations of Freundlich and Langmuir was performed.

An interaction of "cellular wall-dye" and the other "dye-dye" was done, as it was proved in the correlation coefficient of the Freundlich isotherm (multi layers of the dye molecules on the adsorptive substrate), in detriment to the Langmuir isotherm, just the interaction "dye-cellular wall" is admitted (mono layers of the dye molecules on the substrate).

The biodegradation study was possible from the spectra in Ultraviolet (UV) and Visible (Vis), and the Fourier Transformed in Infra Red (FT-

iR). The main structural modifications of each dye could be presumed by the displacement of the peaks in the UV-Vis, or the displacement and bands appearance in FT-IR. It was possible to establish in the UV-Vis spectra a dye removal degree through biosorption, soon after a longer contact time between the microorganism and the dye, beginning the biodegradative process. In which it was mainly characterized the band appearance, pointing out the presence of primary amines after 120-hours contact. Thus, it can be deduced that the fungus after exhausting its carbon source due to the inoculum, it came after the alternative carbon source, coming from nearer substrate, that its, the dye molecules.

The tolerance study showed that all dyes presented factors, which induced a decrease in the biomass production; however, it was possible to know the toxicity of the dyes because of the determination of the EC_{50} . The most toxics were (Procion Red MX-5B at pH 2.50); followed by (Acid Red 151 at pH 2.50). The less toxics were (Direct Red 23 at pH 6.50) and (Erythrosine B at pH 4.50).

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Corantes Azóicos	3
2.1.1. Classificação dos corantes	4
2.2. Adsorção	6
2.3. Biodegradação	9
2.4. Espectrofotometria de Infravermelho	12
2.5. <i>Neurospora crassa</i>	14
2.6. Paramorfogênese química em <i>Neurospora crassa</i>	14
2.7. Tolerância	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Microrganismo utilizado	18
3.2. Manutenção da cultura fúngica	18
3.3. Revigoração e preparo dos <i>pellets</i>	19
3.4. Corantes utilizados	21
3.4.1. Preparo das soluções de corantes	22
3.4.2. Teste de estabilidade dos corantes em diferentes valores de pH	23
.....	23
3.5. Interação Biomassa/Corante	23
3.5.1. Análise Espectral no Ultra-Violeta (UV)	23
3.5.2. Análise Espectral no Visível	23
3.5.3. Isolamento da parede celular de <i>Neurospora crassa</i> (BHANOORI e VENKATESWERLU, 2000, modificado)	24
3.5.4. Análise em Espectrofotômetro Infra-Vermelho (BHANOORI e VENKATESWERLU, 2000, modificado)	24

3.5.5. Escolha dos corantes mais susceptíveis à biodegradação	25
3.5.6. Teste de biosortividade	25
3.5.7. Aplicação das Equações das Isotermas de Adsorção no estudo da interação biosortiva entre o <i>Neurospora crassa</i> e os corantes selecionados.	25
3.5.8. Avaliação da tolerância a diferentes tipos de corantes sobre <i>Neurospora crassa</i> 74A	28
3.5.8.1. Padronização do inóculo de <i>Neurospora crassa</i> 74A	27
3.5.8.2. Preparo das soluções dos corantes	27
3.5.8.3. Curva de crescimento (HARTLEY et al., 1987b)	28
3.5.8.4. Determinação da Concentração Efetiva (EC ₅₀) do corante que inibe 50% do desenvolvimento microbiano	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Espectro UV-Vis do “Acid Alizarin” a diferentes valores de pH	31
4.2. Espectro UV-Vis do “Acid Blue 25” a diferentes valores de pH	36
4.3. Espectro UV-Vis do “Acid Blue 29” a diferentes valores de pH	43
4.4. Espectro UV-Vis do “Acid Blue 40” a diferentes valores de pH	49
4.5. Espectro UV-Vis do “Acid Red 44” a diferentes valores de pH	55
4.6. Espectro UV-Vis do “Acid Red 114” a diferentes valores de pH	61
4.7. Espectro UV-Vis do “Acid Yellow 25” a diferentes valores de pH	67
4.8. Espectro UV-Vis do “Direct Violet 51” a diferentes valores de pH	73
4.9. Espectro UV-Vis do “Acid Red 151” a diferentes valores de pH	79
4.10. Espectro UV-Vis do “Direct Red 23” a diferentes valores de pH	100
4.11. Espectro UV-Vis do “Erythrosine B” a diferentes valores de pH	121
4.12. Espectro UV-Vis do “Procion Red MX-5B” a diferentes valores de pH	142
5. CONCLUSÕES	163
6. LITERATURA CITADA	171

1. INTRODUÇÃO

As mais bonitas imagens da Terra, aquelas que são agradáveis aos olhos, à imaginação, as que são um convite ao relaxamento, sempre têm a água em sua composição: as ondas do mar, as cachoeiras, um riacho cristalino, a neve sobre as montanhas, os lagos espelhados, a chuva caindo sobre as plantas, o orvalho, entre outros.

A água é um elemento essencial à vida. Mas, a água potável não estará disponível infinitamente. Ela é um recurso limitado. Parece inacreditável, já que existe tanta água no planeta.

A quantidade de água existente no planeta não aumenta nem diminui. A abundância de água é relativa. É preciso levar em conta os volumes estimados de água acumulados e o tempo médio que ela permanece nos ambientes terrestres.

Água também se encontra ameaçada pela poluição, pela contaminação e pelas alterações climáticas que o ser humano vem provocando. Além do perigo que representa para a saúde e bem-estar do homem, a degradação ambiental é apontada pela Organização Mundial de Saúde como uma importante ameaça ao desenvolvimento econômico.

O descarte de compostos tóxicos nos sistemas aquáticos representa um problema ambiental crescente, envolvendo um impacto ecológico na água e efeitos potenciais na saúde do homem.

As fontes naturais de água têm sofrido grandes agressões com o avanço do mundo moderno. Inúmeras são as causas diretas desta lamentável realidade, entre elas, destacamos as instalações industriais têxteis. Estas contêm grandes concentrações de compostos coloridos e por esta razão, são facilmente visíveis ao penetrar em corpos d'água. A liberação destes compostos, normalmente tóxicos, representa um dos maiores problemas ambientais, pois, tais substâncias apresentam alta persistência no meio aquático, devendo-se à composição química que envolve normalmente anéis aromáticos, ligações azóicas, aminas e grupos sulfônicos. Estes fatos conferem aos efluentes têxteis contendo corante, um lento processo de biodegradação natural, além disso, estes compostos e seus resíduos apresentam um potencial tóxico capaz de provocar problemas mutagênicos, carcinogênicos ou bioacumulativos nas cadeias alimentares, inclusive para o homem, que posteriormente venha a fazer uso dessas águas.

Vários estudos têm sido realizados no sentido de descobrir microrganismos que sejam capazes de adsorver e/ou degradar tais corantes removendo-os, portanto, do meio em que se encontram.

Os corantes que demonstraram maiores tendências à degradação foram analisados, de forma particular, alguns fatores como: A biosorção em diferentes valores de pH, tanto para as células vivas como autoclavadas, as equações das isotermas de adsorção, e o grau de tolerância ao desenvolvimento do fungo em diferentes concentrações dos corantes selecionados, frente as melhores condições de desenvolvimento da biomassa fúngica.

OBJETIVOS: Este trabalho visou à utilização de *Neurospora crassa* linhagem 74A, em sua forma paramorfogênica ("pellets"), para promover a remoção e a biodegradação de alguns corantes azóicos e não azóicos em solução aquosa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Corantes azóicos

Alguns microrganismos têm recebido grande atenção, quanto a sua capacidade e habilidade no processo de descoloração de efluentes de indústrias têxteis. Descoloração microbiana de corantes foi o método mais eficiente para remover poluentes do meio ambiente. (BANAT, 1996).

Dentre os compostos produzidos pela síntese química, temos o numeroso grupo dos compostos azo, que envolvem muitas moléculas de corantes. Essas substâncias, se por um lado promovem o bem estar social e psicológico do homem, por outro lado, acarretam mudanças ecológicas e sanitárias nos recursos hídricos, no solo e na atmosfera. (ANGELIS, 1982).

Entre os vários grupos de corantes estão os compostos azóicos que são sintetizados a partir de compostos aromáticos. Estes apresentam na maior parte das vezes alta persistência à degradação e são dispersos pelas águas dos efluentes e esgotos das indústrias que os sintetizam ou utilizam. (TRINDADE et al., 1986).

Geralmente os corantes azos contêm entre uma e quatro ligações azo (-N=N-), ligando radicais fenil e naftil que são usualmente substituídos com algumas combinações de grupos funcionais incluindo: amino (-NH₂), cloro (-Cl),

hidroxi (-OH), metil (-CH₃), nitro (-NO₂), ácido sulfônico e sais de sódio: (SO₃Na). (SHAUL et al., 1986).

O tratamento dos efluentes provenientes de indústrias têxteis inclui várias etapas, dependendo do tipo de fabricação e matéria-prima, para se obter um efluente tratado, que atenda à legislação em vigor. As principais etapas aplicadas às estações de tratamento de efluentes têxteis são: equalização, correção de pH, coagulação/floculação, sedimentação/flotação, filtração e tratamento biológico. Cada uma dessas etapas compõe uma fase importante da Estação de Tratamento de Efluentes, o que garante a performance da mesma, HALLER (1993).

Culturas anaeróbias e aeróbias capazes de remover a cor em amostras de efluentes têxteis foram isoladas, depois de promover enriquecimento da cultura de amostras de efluentes têxteis. A remoção da coloração de alguns componentes de corantes do efluente e de uma mistura de corante foi realizada sob condições de aerobiose, indicando que a bactéria foi capaz de quebrar grupos cromóforos nas moléculas de corante. Em condições anaeróbias os corantes permaneceram sem nenhuma mudança na cor, BANAT et al., (1996).

2.1.1. Classificação dos corantes

(Encyclopedia of Chemical Technology, 1979).

Corantes ácidos: são corantes aniônicos solúveis em água, para aplicação em nylon, seda, acrílicos modificados e lã. São também usados em papel, alimentos e cosméticos. Os membros originais desta classe têm um ou mais grupos ácidos sulfônicos ou carboxílicos em suas moléculas. Quimicamente consistem de compostos azo, antraquinonas e triarilmetanos em compostos azina, iminocetona, nitro, nitroso e quinoline.

Corantes básicos: são corantes catiônicos solúveis em água para aplicação em acrílicos modificados, nylons modificados, poliésteres modificados e papel. Produzem cátions coloridos em solução, e suas principais classes químicas

são azo, antraquinona, triarilmetano, metano, thiazine, oxazine, acridina e quinolina. Alguns corantes básicos têm atividade biológica e são usados na medicina como anti-sépticos.

Corantes diretos: são corantes aniônicos solúveis em água quando na presença de eletrólitos (sais que aumentam sua afinidade pela fibra), e em solução aquosa são substantivos para fibras celulósicas, não necessitando de mordentes. Seu principal uso é no tingimento de algodão e celulose regenerada, papel, couro e em menor extensão para nylon. Muitos são compostos azo, com tiazóis, ftalocianinas e oxazinas.

Corantes dispersos: são noniônicos substancialmente insolúveis em água para aplicação em fibras hidrofóbicas de dispersão aquosa. São usados principalmente em poliéster, nylon, diacetato de celulose e fibras acrílicas. Seu transporte pela fibra é na forma dissolvida monomolecularmente.

Fluorescentes (brighteners), xantenos: grupos dos xantenos são compostos sem cor, que absorvem luz Ultravioleta (UV) incidente, e remitem na região visível (azul), do espectro. Estritamente falando, não são corantes, mas devido sua ampla aplicação em tecidos e outros materiais, o Colour Index fez sua classificação. Produzem seu efeito óptico pela adição de luz para a parte visível da radiação, refletida dele ou transmitida pelo substrato. No caso dos corantes, o efeito óptico é devido à remoção, por absorção, de alguns comprimentos de onda da luz incidente.

Corantes reativos: formam ponte covalente com a fibra, normalmente algodão, lã ou nylon, com grupo compatível hidroxila de celulose. Esta classe de corantes foi primeira introduzida comercialmente em 1956 e tem grande propriedade de fixação por métodos simples de tingimento. Uma marcante vantagem sobre os corantes diretos é que sua estrutura química é muito simples, seu espectro de absorção apresenta estreita faixa de captação e o

tingimento possui características brilhantes. As principais classes são azo, antraquinona e ftalocianinas.

Corantes sulfurosos: são aplicados ao algodão após banho de redução alcalina, com sulfito de sódio como agente redutor. Numericamente é um grupo pequeno. Contudo, o baixo custo e suas boas propriedades de fixação tornam esta classe importante, devido ao ponto de vista econômico.

Corantes vat: são insolúveis em água e são aplicados principalmente em fibras celulósicas, como sais leuco-solúveis, após redução em banho alcalino, normalmente com hidrossulfito de sódio. Seguindo à exaustão na fibra, são reoxidados para a forma ceto-insolúvel e após tratamento, normalmente por soda, desenvolve estrutura cristalina. As principais classes são antraquinonas e índigos.

Precusores de corantes: são obtidos de materiais crus e simples como benzeno e naftaleno, por uma variedade de reações químicas. Normalmente os materiais crus são compostos aromáticos cíclicos e derivados de 2 fontes principais: petróleo e carvão (alcatrão, breu).

2.2. Adsorção

O emprego da biotecnologia na área têxtil, principalmente no que se refere à proteção ambiental, trouxe novas idéias e iniciativas relevantes como a utilização de microrganismos no tratamento de efluentes para a remoção da coloração, compostos tóxicos e metais pesados, (USSMAN, 2001).

Comparando a biosorção de vários corantes azóicos por lodo ativado, DOHÁNYOS et al., (1978), estabeleceram uma série de fatores que influenciavam este fenômeno. Quanto maior o tamanho da molécula do corante e quanto mais grupos azo e hidroxilas presentes, maior é a adsorção e maior o

número de grupos sulfato na molécula, maior a capacidade do lodo ativado em adsorvê-la.

TRINDADE et al., (1986), observaram a remoção dos corantes azóicos Amaranto e Crisoidina por culturas puras de três espécies de leveduras crescidas em meio sólido de malte acrescido de meio mineral mínimo e demonstraram que *Rhodotorula mucilaginosa* conseguiu remover níveis maiores do corante Amaranto dentre as três espécies estudadas. A adsorção máxima atingida por tal espécie foi de 99% do total de corante utilizado. Por outro lado, *Rhodotorula longissima* foi a que se apresentou mais eficiente na remoção de Crisoidina, sendo seu nível máximo de remoção de 55%.

CORSO et al., (1996), realizaram um trabalho com a meta de substituir o carvão ativado por biomassa microbiana. Os autores utilizaram *Saccharomyces cerevisiae*, que é um subproduto descartável dos processos fermentativos da indústria, sendo uma promissora matéria-prima para remoção. Esta biomassa foi ativada por ultra-som em diferentes condições de irradiação ultra-sônica, tomando como referência a estimativa de remoção total do corante reativo "Procion Blue".

Um fungo isolado, *Aspergillus foetidus* foi avaliado como eficiente na remoção de cor, no meio contendo corantes azos reativos. O processo de remoção foi maior que 95% em 48 horas de interação biosortiva, quando utilizada biomassa pelletizada. Este fungo também foi capaz de remover a cor do meio contendo misturas de corantes, numa taxa de 85% em 72 horas de crescimento, SUMATHI e MANJU (2000).

Em experimento que visava estudar a biosorção de corantes por lodo ativado, PAGGA e BRAUN, (1986), determinaram que altas concentrações de Ca^{++} na solução em que se desenvolvia tal processo, aumentavam o poder de biosorção do lodo pesquisado, enquanto baixas concentrações de Ca^{++} tinham o efeito oposto. Foi sugerido, então, que os íons Ca^{++} , presentes na superfície das células, ligar-se-iam às partes da molécula dos corantes carregadas negativamente, propiciando assim um aumento da biosorção. Outro mecanismo proposto para a remoção de tais corantes foi à precipitação destes com os íons Ca^{++} .

Estudando a biosorção e a biodegradação de dois corantes azóicos reativos por diferentes tipos de lodo ativado, GANESH et al., (1994), verificaram que um dos corantes contendo grupo vinil sulfona apresentava acentuada biosorção, associada a algum grau de biodegradação aeróbia. Estas conclusões foram obtidas devido aos decréscimos na absorvância da solução corante/biomassa e de Carbono Orgânico Total (COT). O corante é biosorvido em altos níveis devido à característica hidrofóbica do grupo acima mencionado. Por outro lado a forma hidrolisada, ou seja, iônica, desse mesmo grupo é biosorvido em menores níveis que no primeiro estudo, o que demonstra que a biosorção, nesse caso, aumenta com a diminuição de polaridade da molécula testada.

Existem estudos relacionados a metais pesados também, neste sentido FOUREST e ROUX, (1992), estudando o fenômeno da biosorção de quatro metais pelo fungo micelial *Rhizopus arrhizus*, afirmaram que a biosorção é baseada em algumas premissas, podem ser por exemplo os íons metálicos que são quimicamente adsorvidos em número fixo de sítios bem definidos. Cada sítio liga-se a um íon, todos os sítios são energeticamente equivalentes e não há interação entre os íons adsorvidos e os sítios vizinhos.

Experimentos de biosorção em grande escala foram feitos para uma série de linhagens fúngicas selecionadas, para efeito de remoção de diferentes metais e concentrações de biomassa. A biosorção de Pb^{2+} foi fortemente afetada pelo pH. A biomassa fúngica de *Mucor rouxii* atingiu sua maior capacidade adsorvativa em pH 6,0 e a biomassa estimada foi 769 mg/g na equação de Langmuir. (WH et al., 1999).

KAPADAN et al., (2000), utilizaram a biomassa fúngica de *Coriolus versicolor* na biosorção do corante reativo Turquesa Blue-G. O pH 4,5 foi o mais adequado. Compararam-se também, fontes de carbono, nitrogênio e glicose, para promover melhor desempenho na remoção da cor. Em concentrações acima de 500mg/L observaram remoção parcial da cor, abaixo desta concentração ocorreu remoção total da coloração.

MANU e CHAUDHARI, (2002), estudaram a descoloração em bioreatores, dos corantes azóicos "Orange II", "Black 3HN", em condições de

anaerobiose, temperatura ambiente, pelo período de 10 dias. Os dados indicam que, para o corante “Black 3HN”, a metanogênese foi inibida sob concentrações altas destes corantes, superior a 400 mg/L.

CHRISTOV et al., (1999), utilizaram a biomassa fúngica de *Rhizomucos pusillus* como adsorvente da coloração de efluente, que continha uma fração de 50% de compostos coloridos, notando que ocorria atividade de descoloração parcial, o que sugeria se tratar de uma remoção quimiosortiva destes compostos.

2.3. Biodegradação

A degradação bacteriana é um aspecto relevante dos estudos de biodegradação de corantes azóicos. A habilidade para biodegradar corantes azóicos tem sido encontrado em *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Shigella* e *Klebsiella*, Porém, em condições de aerobiose os corantes azóicos mostram-se mais resistentes ao ataque bacteriano. (HU, 1998).

No que se diz respeito à produção de proteínas e enzimas, a partir da biodegradação pela ação microbiológica, CAMBRAIA et al., (2000), utilizou *Rigidoporus lignosus* para a produção de lacase, a enzima foi purificada e comparada com parâmetros pré-determinados. Constatou-se que o efeito do pH, temperatura e solventes orgânicos alterava as condições de estabilização e atividade desta enzima. Os resultados indicaram que a produção e purificação desta proteína extracelular, produzida por este fungo, pode ser amplamente utilizada em aplicações biotecnológicas.

WANG e YU, (1998), realizaram um trabalho de adsorção e biodegradação de corantes sintéticos, utilizando micélio fúngico de *Trametes versicolor*, concluindo que na primeira hora de interação corantes-hifas, ocorreu adsorção e que, a capacidade e afinidade de adsorção dependem da estrutura individual de cada corante. Observaram também que, as hifas saturadas de

corantes podem ser regeneradas por processos físicos e degradação enzimática para próximos processos biosortivos.

T. versicolor produz um pouco de enzima extracelular em sua fase primária de crescimento, mas liberando enzimas como metabolismo secundário em uma fase estacionária. Estas enzimas desempenham um papel fundamental na degradação dos corantes, elevando a uma descoloração do efluente da industrial têxtil. (WANG e YU, 1998).

AZMI et al., (1998), relataram a biodegradação do “Crystal Violet” por *Phanerochaete chrysosporium*. Em cultura líquida o corante Violet desapareceu, porém, outros subprodutos surgiram. Ainda afirmaram que o sistema lignolítico é responsável pela degradação do corante Crystal Violet, entre outros corantes tri-fenil-metano.

A aplicação da constante de Michaelis é utilizada para se determinar a velocidade máxima da reação do corante utilizado por hora. WALKER e WEATHERLEY, (2000), sugerem que trabalhos futuros nesta área devam envolver análises químicas dos produtos biodegradados, para confirmar a biodegradação e também o efeito da concentração de oxigênio dissolvido (OD) na biocinética. Também afirmam que, a adsorção física do corante ocorre na primeira hora e que a partir disto, sugere-se o início da biodegradação.

ZISSI e LYBERATOS, (2000) afirmam que a oxidação biológica de corantes azóicos é muito importante no tratamento de efluentes industriais, pois a maior parte destes corantes é prejudicial para o meio ambiente, e encontram-se presentes na indústria têxtil. Baseados nesta afirmação fizeram uma pesquisa com efluente da indústria têxtil, para avaliar o poder de biodegradação do *Bacillus subtilis*, em crescimento no meio sintético, pois esta bactéria é capaz de utilizar nitrito ou nitrato sob condições de anaerobiose. A degradação de p-aminoazobenzeno por *Bacillus subtilis* foi avaliada para elucidar o mecanismo de degradação do corante azóico. Os resultados comprovaram que esta bactéria co-metaboliza p-aminoazobenzeno sob condições de desnitrificação, estando na presença de glicose como fonte de carbono, produzindo anilina e p-fenilenodiamina.

ZEE et al., (2001), aplicaram lodo ativado em câmara laminar de fluxo ascendente, em condições anaeróbias, em 20 tipos de corantes azóicos. Conseguiram reduções significativas da coloração. O experimento ocorreu em tempos que variaram de 1 a 100 horas. Como no lodo havia presença de sulfeto, acompanharam 8 corantes no possível processo de descoloração química. Os resultados indicaram redução na coloração, possibilitando uma remoção pela biomassa, embora atribuída à reação extracelular não específica, ou seja, a uma possível biodegradação.

KIRBY et al., (2000), utilizaram *Phlebia tremellosa* na descoloração de 8 corantes têxteis sintéticas (200 mg/l), alcançando uma redução superior a 96% dentro de 14 dias, sob condições de incubação estacionárias. Análise em cromatografia líquida do sobrenadante indicou que Preto Remazol foi degradado pelo fungo, porém, não ocorreu completa mineralização. Ocorreu também atividade de Lacase no sobrenadante de cultura com 5 dias de acompanhamento, quando o fungo foi desenvolvido na presença de um efluente têxtil artificial.

Dois metabólitos foram submetidos à transformação microbiana, um álcool e “dehydropinguisenol”, usando *Aspergillus niger* e *Aspergillus cellulosa*. Destas estruturas foram estabelecidas 10-oxo-lejeuneapinguisenol e lejeuneapinguisenol como base de análise dos dados em espectrofotômetro. O último composto foi obtido após 4 e 9 dias de incubação com *A. cellulosa* a 30°C e 25° C, respectivamente. Uma possibilidade de formação desse composto é discutida juntamente com, a atividade antimicrobiana dos fungos utilizados. (LAHLOU et al., 2000).

A biodegradação e descoloração de corantes azóicos foram investigadas por CHU e YIZHONG, (1999). A remoção dos corantes “Reactive Yellow KD-3G”, “Red Reactive 15”, “Red Reactive 24”, “Blue CationicX-GRL” como indicador, ocorreu em solução aquosa, atingindo até 90% de descoloração com 20-30 minutos de tratamento fotolítico. A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) aumentou, enquanto que, a Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Carbono Orgânico Total (COT) diminuíram. A associação de fototratamento e biodegradação apresentou-se eficiente na remoção da cor.

A remoção de corantes têxteis pela reutilização de lodo ativado, no processo de coagulação foi estudado e otimizado por CHU, (2001). Este processo não foi indicado para a remoção de corantes hidrofóbicos, devido à alta concentração destes corantes no meio, o que resultaria numa má qualidade da água durante o processo de purificação.

MARTINS et al., (2001), realizaram um experimento visando a biodegradação de corantes azóicos têxteis por *Phanerochaete chrysosporium*. Através dos resultados observou-se que a concentração de açúcar, estrutura do corante e a concentração do corante utilizado interferem no processo de biodegradação.

Também concluíram que, a bioaceitação dos corantes têxteis azóicos por cultura de *Phanerochaete chrysosporium*, indicaram que à medida que se diminui a concentração do açúcar glicose no meio, diminui a biomassa fúngica, sendo que a absorbância máxima dos corantes esteve diretamente ligada à concentração de açúcar presente no meio.

VITOR (2005), realizou estudo sobre a biodegradação do corante “Direct Violet 51” por *Candida albicans*, comprovando que um dos sítios mais vulneráveis na estrutura deste corante e prováveis de rompimento, são as ligações de nitrogênio nas aminas secundárias. Estas poderiam passar para aminas primárias e nas ligações azo terciárias que também poderiam passar para primárias em processo de redução, o que é mais favorável em valores de pH baixos.

2.4. Espectrofotometria de Infravermelho

MARIEY et al., (2001), utilizaram espectrofotometria em FTIR para discriminar, classificar e identificar microrganismos. O método obteve sucesso para se determinar estudos a respeito de taxonomia classificatória e discríção da susceptibilidade a antibióticos.

ORSINI et al., (2000), descreve leitura em FTIR para análise biomassa crescida em meio de cultura diversificada, e afirmam que a banda em 2343 cm^{-1} é característica da presença de CO_2 .

BHANORI e VENKATESWERLU, (2000), realizaram um estudo sobre o complexo quitina-cadmio em *Neurospora crassa* utilizando FTIR (Infravermelho com Transformada de Fourier) e observando a alteração da parede celular deste fungo.

SURESH e SUBRAMANYAM, (1998), isolaram parede celular de *Neurospora crassa* para um estudo de FTIR, visando a comparação e análise do micélio fúngico, na presença ou ausência de quantidades tóxicas de cobre.

KAMNEV et al., (1997), quantificaram através de FTIR, o crescimento celular da bactéria *Azospirillum brasiliense*, fixadora de nitrogênio do solo, na presença de quantidade elevada de metais pesados. A análise estrutural da parede celular foi obtida, juntamente com resultados fornecidos pela espectrometria de absorção atômica.

GALICHET et al., (2001), afirmaram que quando se analisa biomassa por FTIR, os espectros das bandas são diferenciados, de acordo com a variação da linhagem microbiana.

Espectrofotometria de Infravermelho também pode ser aplicado na quantificação simultânea de β -frutofuranosidade e glicana, presentes no início da produção enzimática foram encontrados por SCHINDLER e LENDI, (1999). A aproximação é baseada na evolução quimiométrica medida em espectro Infravermelho, com transformada de Fourier (FTIR). Duas áreas pré-estabelecidas foram utilizadas como modelo de calibração. O primeiro modelo foi calculado da reação mistura após a ação padrão das duas enzimas. A outra foi obtida após a mistura do substrato (maltose e sacarose) e produtos (frutose e glicose), sem a ação enzimática. O estabelecimento do 2º modelo realizou-se mais rápido, como se espera de uma ação enzimática. Ambos os modelos apresentaram resultados comparativos, tendo 0-2,0 U/mL de cada enzima, com erros entre 0,08 e 0,05 U/mL.

2.5. *Neurospora crassa*

A produção enzimática do complexo celular em fungo *N. crassa* foi estudada por ROMERO et al., (1999), que observaram os efeitos de temperatura, pH inicial, produção de beta – glucosidase, atividade extracelular e proteína micelial. Quando a temperatura era de 25° C diminui a produção enzimática, considerando que o valor de proteína micelial era mais alto. Mudanças no pH inicial induzem à diminuição da produção de enzimas, porém o crescimento fúngico é favorecido. (ROMERO et al., 1999).

SU e HE (1997), realizaram estudos com o objetivo de produzir enzimas extracelulares, a partir de pellets fúngicos mantidos em reatores, observando o tempo de retenção celular. *Neurospora crassa* foi utilizada como parâmetro para este sistema, onde se avaliou a produção enzimática extracelular e ácido fosfórico. Os pellets fúngicos foram cultivados em reator com sucesso por 30 dias, após este período iniciou-se uma fase de limitação fosfórica, reduzindo sua taxa.

THEVISSSEN et al., (1999), realizaram ensaios baseados em Sytox verde, um composto orgânico que fluoresce sob a interação com ácidos nucléicos e membranas plasmáticas, para investigar a permeabilização da membrana fúngica. A permeabilização da membrana induzida por defensivos de plantas em *Neurospora crassa* dependeu da dose utilizada. Os elevados níveis de defensivos (10 para 40 μM) foram detectados forte permeabilização, que pode ser facilmente suprimida pelo cátion do meio. Esta permeabilização demonstra a interação direta de peptídeo-fosfolípido. Em níveis menores de defensivos (0.1 para 1 μM), ocorre uma fraca resistência catiônica na permeabilização.

2.6. Paramorfogênese química em *Neurospora crassa*

L-Sorbose foi extensivamente usada para induzir o crescimento colonial em *Neurospora crassa* que é geneticamente mono-colonial, descobrindo assim, o efeito de paramorfogênese, através de estudos realizados por TATUM et al., (1949). Um método direto para determinar as regiões de mutação na *Neurospora* foi testado somando 1.0% sorbose e 1.0%

sacarose no meio de incubação, assim a mono-colônia selvagem de *Neurospora* poderia ser usada. Quando foram executados experimentos sob estas condições, a viabilidade esperada do inóculo não foi obtida. Esta observação conduziu a estudos mais detalhados no qual a *Neurospora crassa* linhagem 74A, foi utilizada para testar a influência de vários fatores que poderiam efetuar a viabilidade da colônia crescida no meio. (SERRES, 1962).

EL-SHAFEI, (1997), utilizou L-sorbose para testar seus efeitos no crescimento, morfologia do fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*. L-sorbose induz colônias paramorfogênicas neste fungo. A colônia fúngica cresce de maneira limitada e a hifa mostra-se morfologicamente diferente, sendo mais acentuada, a medida que se aumenta a concentração deste açúcar. A taxa de crescimento específico e o rendimento de seu peso diminuíram de 11,5 e 21%, respectivamente, com adição de 1% de L-sorbose. A adição de 0,5% de sorbose às culturas de *Aspergillus fumigatus* disputaram com *Micrococcus sp* o aumento da atividade β -glucanase e atividade da parede celular, mas decaiu a atividade de quinase. Após 48 horas de incubação a atividade da quinase começou a aumentar, acompanhada de um decréscimo na glucanase e nas atividades da parede celular, chegando ao máximo depois de 4 dias de incubação.

JESUS, (2001), desenvolveu uma pesquisa sobre a remoção de corantes azóicos pela forma paramorfogênica de *Neurospora crassa*, comparando a eficiência das células autoclavadas e vivas, concluindo-se que para o processo biosortivo, as células autoclavadas são mais eficientes, sendo necessária uma menor quantidade de biomassa para promover a remoção.

2.7. Tolerância

Muitos trabalhos na literatura já foram realizados, a respeito da tolerância de diferentes tipos de organismos, principalmente com metais pesados, por exemplo, BAKER (1987); BAKER e WALKER (1989) e MEHARG (1994). Apesar do conhecimento que se tem hoje a respeito do fato de fungos

crecerem ou se manterem vivos em locais com alta concentração de metais, ainda não se tem um estudo detalhado.

Os termos sensibilidade e tolerância ao potencial tóxico de metais, são usados para definir o grau de modificações no desenvolvimento de microrganismos, quando crescem em diferentes concentrações de poluentes. Alguns autores, contudo, definem cada um deles de maneira distinta, segundo HARTLEY et al., (1997a), “Sensibilidade” pode ser definida como a variação da resposta a metais encontrada em uma variedade selvagem, quando ela é colocada para sobreviver em uma concentração do metal que ela usualmente não está acostumada. “Tolerância” é definida como sendo uma adaptação genética que tenha ocorrido nesta espécie, para poder crescer em ambientes com altas concentrações do metal.

Estes termos, porém, continuam sendo utilizados sem estas definições nos diferentes trabalhos encontrados na literatura.

No caso de tolerância em relação à corantes, ainda é um campo que se inicia, uma vez que, trata-se de pesquisa não ligada especificamente a microbiologia do solo, a qual direciona o estudo da relação metal/microrganismos com mais intensidade.

GLENN e GOLD (1983), utilizaram o fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, na degradação de alguns corantes. Os resultados indicaram que este fungo reduz a intensidade de cor do corante estudado (Poly R), quando submetido a análises de absorvância, esta diminuía significativamente. Estabeleceu-se uma razão originada do decréscimo proporcional da intensidade da cor, com as mudanças provocadas na resistência de sobrevivência do fungo a este meio adverso.

COLPAERT et al., (2004), realizaram estudo de adaptação de populações fúngicas de *Suilloid*, retirada de florestas de pinos, em 14 locais diferentes, na presença de Zinco (Zn). Entre as espécies avaliadas, *Suillus luteus* foi a que apresentou maior adaptação genética aos gradientes de poluição pelo Zn, ou seja, revelou Concentração Efetiva (EC₅₀) maior que as demais espécies testadas.

HARTLEY et al., (1997b), avaliou a interação tóxica de alguns íons metálicos frente à produção de biomassa fúngica ectomicorrizal. Determinações significativas ocorreram nesta relação, com variações inter-específicas de sensibilidade para os íons Cd^{2+} e Zn^{2+} e Pb^{2+} e Sb^{3-} , individualmente provocaram pequeno efeito sensitivo. A influencia do Zn^{2+} variou de acordo com as espécies de ectomicorrizas, dependendo da concentração de metal testada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo utilizado: *Neurospora crassa* linhagem 74A.

3.2. Manutenção de cultura de *Neurospora crassa* linhagem 74A.

Vidrarias: de uso comum em laboratório.

Aparelhos: mesa rotatória modelo EMAAQ da Equilabor, filtro acoplado a bomba a vácuo (Primar, modelo 141), autoclave FABBE modelo 104 C, estufas de cultura Fanem modelo 315, microscópio óptico Carl-Zeiss, pHmetro Digimed modelo DMPH 2, balança Mettler modelo P1000 e balança analítica Mettler modelo H6T, refrigerador Continental 460L, Brastemp 280 I.

Meio YEPD:

Glicose.....	20,00g
Peptona.....	20,00g
Extrato de levedura.....	10,00g
Ágar.....	18,00g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

3.3. Revigoramento e preparo dos “pellets” de *Neurospora crassa* 74A.Meios:Meio de Vogel:**Solução traços de elementos:**

Ácido cítrico - H ₂ O.....	5,00g
ZnSO ₄ - H ₂ O.....	5,00g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) - 6H ₂ O.....	1,00g
CuSO ₄ - H ₂ O.....	0,25g
MnSO ₄ - H ₂ O.....	0,05g
H ₃ BO ₃ anidro.....	0,05g
Na ₂ MoO ₄ - 2H ₂ O.....	0,05g
H ₂ O destilada q.s.p.....	100,00mL

Solução de biotina:

Biotina.....	5,00mg
H ₂ O destilada q.s.p.....	50,00mL

Solução estoque de Vogel, (Vogel, 1956):

Citrato de Na. 5 H ₂ O.....	15,00g
KH ₂ PO ₄	25,00g
NH ₄ NO ₃	10,00g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	1,00g
CaCl ₂ . 2H ₂ O.....	0,50g
Solução de Biotina.....	0,5mL
Solução de traços de elementos.....	0,5mL
Água destilada q.s.p.....	100,0mL

Adicionar 0,2-0,3mL de clorofórmio para guardar em refrigerador. Para se preparar o meio de Vogel dilui-se 1 volume de solução estoque a 50,0mL com água destilada (1:49).

Cultura fúngica: *Neurospora crassa* 74A foi mantida em Meio YEPD a 4°C, por ocasião de revigoração da cultura (repiques) passou por dois processos paramórficos: físico, descrito por MARCANTI-CONTATO, (1997) e químico por TATUM et al., (1949).



FIGURA 1. *Neurospora crassa* 74A (crescimento normal)

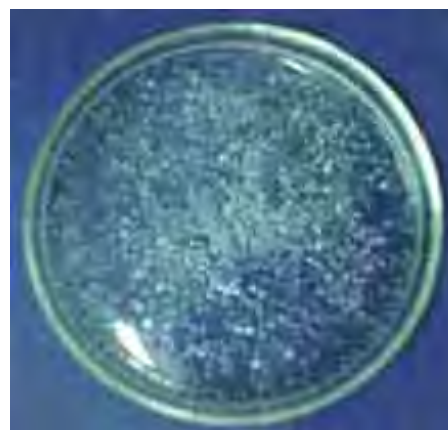


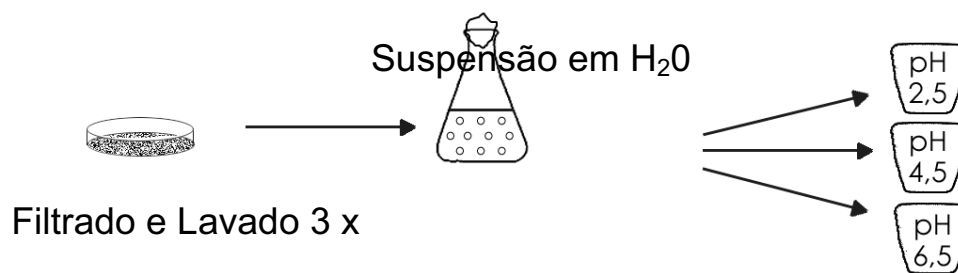
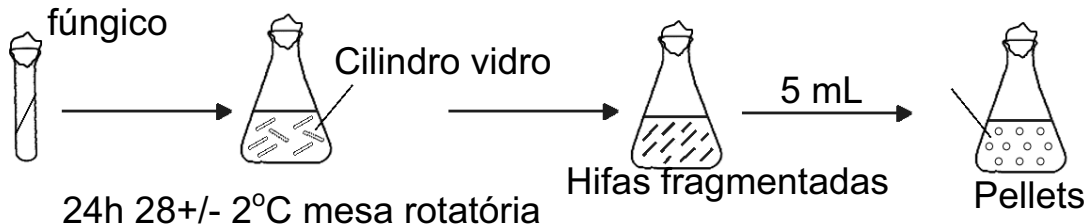
FIGURA 2. *Neurospora crassa* 74A após pelletização

A partir do meio YEPD com *Neurospora crassa* 74A, retirou-se aproximadamente 1cm de micélio fúngico, que foi transferido para um erlenmeyer contendo 10,00g de cilindros de vidro, solução estoque de Vogel, água destilada e sacarose; colocada em mesa giratória 250rpm por 24h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Decorrido este tempo, a suspensão apresentou-se turva (hifas fragmentadas), e transferiu-se 30,0mL desta suspensão para outro erlenmeyer, contendo solução estoque de Vogel, água destilada, sacarose (0.05% - m/v), frutose (0.05% - m/v) e sorbose (1.0% - m/v), permanecendo em mesa giratória 250 rpm por 24h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, para possibilitar o crescimento e desenvolvimento dos pellets miceliais. Passado este tempo, os pellets foram filtrados e lavados 3 vezes com água destilada. Foi adicionada à suspensão 25ppm de quemicetina

250,00mg para inibição bacteriana na razão de 1:100, e guardada a baixa temperatura para posterior emprego no processo de biosorção.

Paramorfogênese Física

1 cm +/- micélio
fúngico



Paramorfogênese Química

Após 24 horas acrescentou sorbose (1%) e reteve-se em mesa giratória até completar 48 horas.

3.4. Corantes utilizados:

1. **“ACID ALIZARIN”** - λ de leitura: 502,5nm; grau de pureza 65%; massa molar: 366,33g/mol
2. **“ACID BLUE 25”**- λ de leitura: 603nm; grau de pureza 45%; massa molar: 416,39g/mol
3. **“ACID BLUE 29”** - λ de leitura: 602nm; grau de pureza 40%; massa molar: 616,50g/mol

4. **“ACID BLUE 40”** - λ de leitura: 616nm; grau de pureza 50%; massa molar: 473,44g/mol

5. **“ACID RED 44”** - λ de leitura: 511nm; grau de pureza 80%; massa molar: 502,44g/mol

6. **“ACID RED 114”** - λ de leitura: 522,5nm; grau de pureza 45%; massa molar: 830,83g/mol

7. **“ACID YELLOW 25”** - λ de leitura: 389nm; grau de pureza 50%; massa molar: 549,56g/mol

8. **“DIRECT VIOLET 51”** - λ de leitura: 544,5nm; grau de pureza 50%; massa molar: 719,71g/mol

9. **“ACID RED 151”** - λ de leitura: 505,5nm; grau de pureza 40%; massa molar: 454,44g/mol

10. **“DIRECT RED 23”** - λ de leitura: 506nm; grau de pureza 30%; massa molar: 813,74g/mol

11. **“ERYTHROSINE B”** - λ de leitura: 523 nm; grau de pureza 90%; massa molar: 879,87g/mol

12. **“PROCION RED MX-5B”**- λ de leitura: 536nm; grau de pureza 50%; massa molar: 615,34g/mol

3.4.1. Preparo das soluções dos corantes

Vidraria: uso comum em laboratório

Aparelhos: balança analítica Mettler H6T, refrigerador Cònsul 280 litros.

Espectrofotômetros: Shimadzu UV-2401 PC e Metrolab modelo 1.700

Cada um dos corantes foi pesado 1mg (pó), e colocados em balão volumétrico e ajustados para 100mL (Solução Estoque), estando prontos para análise. Concentrações dos corantes variaram de 20 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para análise quantitativa, proporcionando a confecção das retas padrões, em suas bandas máximos de absorbância, característicos de cada corante estudado, para confecção das retas padrões (Análise Quantitativa).

3.4.2. Testes de estabilidades dos corantes em diferentes valores de pH

Os corantes com concentração inicial de 1mg/mL, foram diluídas com água destilada, os valores de pH ajustados para 2,5; 4,5 e 6,5 com H_2SO_4 0,01Mol/L e NaOH 0,02Mol/L.

Varreduras espectrais com concentrações de corantes variando de 20 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entre 200 e 800nm, foram realizadas, visando determinar os comprimentos de onda máximos de absorção de cada corante (Análise Qualitativa).

3.5. Interação Biomassa/Corante

3.5.1. Análise Espectral no Ultra-Violeta (UV)

Os corantes em solução original e após 120 horas de contato (sobrenadante), foram submetidos à análise em Espectrofotômetro Shimadzu, no comprimento de onda de 200-350nm, com concentração inicial de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e caminho óptico de 5mm.

3.5.2. Análise Espectral no Visível

Os corantes em solução original e após 120 horas de contato (sobrenadante), foram submetidos à análise em Espectrofotômetro Shimadzu,

no comprimento de onda de 350-800nm, com concentração inicial de 100 ug/mL e caminho óptico 5mm.

3.5.3. Isolamento da parede celular de *Neurospora crassa* (BHANOORI e VENKATESWERLU, 2000, modificado).

As paredes celulares foram isoladas do micélio controle no tempo zero hora e após 120 horas de interação. As paredes celulares destas culturas de corantes foram consideradas como corantes tratadas ou parede celular colorida. As paredes celulares foram isoladas por um processo de lavagem em água destilada e o micélio fresco foi seco por 12h à 105°C e homogeneizado, e então, transformado num fino pó.

3.5.4. Análise em Espectrofotômetro Infra-Vermelho, método de BHANOORI e VENKATESWERLU, 2000 (modificado).

Foram traçados espectros de absorção no Infravermelho (IV) das amostras de corante original, o sobrenadante (120 horas), parede celular não corada (tempo zero) e das amostras das paredes celulares com os corantes adsorvidos (biomassa-corante), com 120 horas de contato.

As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr, isto é, misturou-se o pó da parede celular triturada, com KBr seco, e compactou-se esta biomassa por 2,5 minutos, a 30kN de pressão. A faixa de leitura do IV foi de 4000–400cm⁻¹ e realizada no espectrofotômetro IV com transformada de Fourier (FT-IR), marca Shimadzu FTIR 8300, com resolução de 4cm⁻¹.

Para o preparo das pastilhas do sobrenadante, foram coletadas 1,5mL da solução e misturada em 0,3mg de KBr, após, colocadas em estufa a 105°C, por 2 dias.

Estas análises foram realizadas após o contato, biomassa-solução de corante. Este contato foi realizado, em estufa, a 30°C, durante 120 horas. Após estes tempos, as amostras foram retiradas e processadas de acordo com a recomendação literária e encaminhada para análise em FT-IR.

3.5.5. Escolha dos corantes mais susceptíveis à biodegradação

As soluções de corantes após 120 horas de contato com a biomassa, sofreram análise visual, tendo como padrão de escolha os que apresentavam aparência de mudanças relevantes, consideradas significativas, devido a mudanças nas cores originais, pois diminuíram a intensidade da cor.

3.5.6. Teste de biosortividade

Material

Vidrarias: uso comum de laboratório

Aparelhos: pHmetro Digimed modelo DMPH 2, espectrofotômetro UV-2401 PC, autoclave FABBE modelo 104C, estufa Fanem modelo 315, geladeira Cònsul 280 litros, centrífuga Fanem modelo Excelsa 2.

Método:

Os corantes escolhidos pela análise visual foram colocados em contato com a biomassa de *Neurospora crassa* 74A, com concentração de biomassa variável, pelo período de 2 horas, em estufa de crescimento com temperatura mantida em $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Com valores de pH ajustados para 2,50; 4,50 e 6,50. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas e levadas para análise espectral, em espectrofotômetro Shimadzu, com caminho óptico de 5mm.

3.5.7. Aplicação das Equações das Isotermas de Adsorção no estudo da interação biosortiva entre o *Neurospora crassa* e os corantes selecionados.

Material

Vidrarias: uso comum de laboratório

Aparelhos: pHmetro Digimed modelo DMPH 2, espectrofotômetro UV-2401 PC, autoclave FABBE modelo 104C, estufa Fanem modelo 315, geladeira Cònsul 280 litros, centrífuga Fanem modelo Excelsa 2.

Método:

Para o estudo da aplicabilidade das Equações das Isotermas de Adsorção de Freundlich e Langmuir na interação entre a forma paramorfogênica de *Neurospora crassa* 74A e os corantes, foram realizados as seguintes correlações:

Os corantes foram preparados na concentração de 100µg/mL, com o pH ajustado para 2,50, adicionando a biomassa de concentração variada, em forma de “pellets”, e a solução dos corantes. Estas foram mantidas a 30°C por 120 minutos, para se estabelecer o tempo de equilíbrio. Após este período os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm e a concentração do corante remanescente foi determinado em espectrofotômetro, UV-Vis.

Com os dados obtidos, foi possível a realização do estudo da aplicabilidade das isotermas, OLIVEIRA et al., (1983), conforme segue:

- Equação de Freundlich:

$\ln(x/m) = \ln k + n \ln C_r$, sendo:

x/m = concentração de corante adsorvido por unidade de massa de biomassa (µg/µg)

C_{eq} = concentração de corante remanescente em solução (µg/mL)

K = x/m quando C_r é igual a 1

$\log k$ = intercepto em y

n = inclinação

- Equação de Langmuir:

$C_r(m/x) = 1/(K_1K_2) + (1/K_2) \cdot C_r$, sendo:

K_1 = índice de capilaridade

K_2 = quantidade de soluto que satura uma unidade de adsorvente com uma monocamada.

C_r = concentração do corante remanescente no equilíbrio (µg/mL)

3.5.8. Avaliação da tolerância a diferentes tipos de corantes sobre *Neurospora crassa* 74A

3.5.8.1. Padronização do inóculo de *Neurospora crassa* 74A

Os inóculos foram preparados a partir de colônias puras, que estavam em meio de vogel sólido e repicado em meio de vogel líquido, nas condições acertadas para paramorfogênese física. Aguardou-se o período de 24 horas de incubação em mesa giratória, em temperatura ambiente e com auxílio de pipeta graduada, transferiu-se o volume de 15mL de inóculo para erlenmeyer de 250mL para início do experimento.

3.5.8.2. Curva de crescimento (HARTLEY et al., 1997b).

A etapa de estabelecimento da curva de crescimento de *Neurospora crassa* 74A é necessária para determinar o tempo de incubação deste fungo nos testes de tolerância para diferentes concentrações de corantes.

Foram preparados 60 erlenmeyer de 250mL, cada um contendo 50mL de meio de Vogel líquido + 15mL de inóculo + 5mL de água destilada com pH ajustado para 6,50 com a adição das concentrações determinadas de corantes, para se obter as concentrações de 20; 40; 60; 80 e 100ug/mL. Para cada dia de coleta foi preparado um frasco sem corante (branco).

Determinou-se que as amostras fossem recolhidas após 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 10; 13 e 17 dias de incubação. De cada amostra recolhida, o micélio foi separado do meio líquido por filtração em membrana filtrante com 205µm de espessura, (previamente pesada). O micélio foi colocado em estufa a 80°C por 48 horas, para a obtenção da massa seca constante e, através destes dados, foi elaborada curva de crescimento. Os valores obtidos foram organizados para a elaboração da curva de crescimento, permitindo a estimativa do período de crescimento inicial, exponencial e máximo do fungo utilizado, que ficou evidenciado em 7 dias de cultivo.

3.5.8.3. Determinação da Concentração Efetiva do corante que inibe 50% do desenvolvimento microbiano (EC_{50})

Neste método de determinação, HARTLEY et al., (1997b), a taxa de crescimento foi estimada através da biomassa produzida em meio de cultura líquida nas diferentes concentrações de corante.

O teste de EC_{50} determina a efetiva concentração ([]) de determinado agente que inibe ou prejudica 50% do desenvolvimento dos organismos testados.

Após a determinação do tempo em que o controle atingiu o máximo de sua fase exponencial, os dados de todos os experimentos obtidos neste tempo foram colocados em gráficos cartesianos, com concentração de biomassa, em função da concentração de corante.

Para a obtenção da porcentagem (%) de inibição para cada concentração de corante, foi comparada a biomassa obtida na presença de uma determinada concentração de corante, com a biomassa obtida com o controle (sem adição de corante). Calculada a % inibitória de cada concentração de corante, foi possível estabelecer a correlação entre % de inibição x [] corante, e então, determinar o EC_{50} e o EC_{100} de cada corante, para o fungo *Neurospora crassa* 74A, naquelas condições de cultivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados teste de análise visual de descoloração dos corantes, destacando as alterações ocorridas após 120 horas de contato com a biomassa de *Neurospora crassa* 74A, na temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

TABELA 4.1. Análise visual de atenuação da cor dos corantes

Corantes	Cor original	Análise visual após 120 horas	
		Biomassa	Sobrenadante
1. "Acid Alizarin"	Laranja ⁺⁺	laranja	laranja claro
2. "Acid Blue 25"	Azul ⁺	azul	azul claro
3. "Acid Blue 29"	Azul ⁺⁺⁺	azul	azul claro
4. "Acid Blue 40"	Azul ⁺⁺	azul	azul claro
5. "Acid Red 44"	Vermelho ⁺⁺⁺⁺	vermelha	vermelho claro
6. "Acid Red 114"	Vermelho ⁺⁺⁺⁺⁺	vermelha	vermelho claro
7. "Acid Yellow 25"	Amarelo	amarela	amarelo claro
8. "Direct Violet 51"	Violeta	violeta	violeta claro
9. "Acid Red 151"	Vermelho ⁺⁺	amarela*	amarelo*
10. "Direct Red 23"	Vermelho ⁺⁺⁺	vermelha/pontos claros*	vermelho claro+
11. "Erythrosine B"	Laranja ⁺	laranja/pontos claros*	vermelho*
12. "Procion Red MX-5B"	Vermelho ⁺	rosa/pontos claros*	vermelho claro*

+ = grau de intensidade da cor;

* = indicativo de alterações estruturais mais profundas dos corantes da parede celular;



FOTO 1. Amostra dos corantes com concentração de 100 μ g/mL



FOTO 2. Amostra dos corantes com concentração de 100 μ g/mL

4.1. Espectro UV-Vis do corante “Acid Alizarin” a diferentes valores de pH

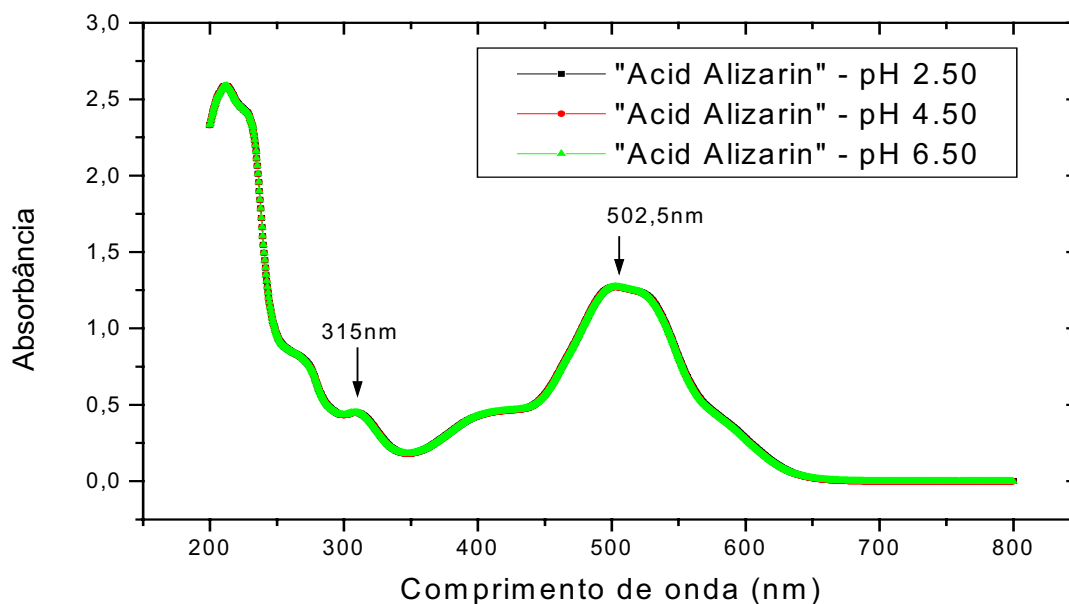


FIGURA 4.1.1. Varredura espectral do corante “Acid Alizarin”, nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100µg/mL; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{502,5\text{nm}} = 0,0014 + (0,01194 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99995

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{502,5\text{nm}} = 0,0043 + (0,02286 \times \text{concentração do corante})$$

R= 0,99999

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{502,5\text{nm}} = 0,0224 + (0,07320 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99998

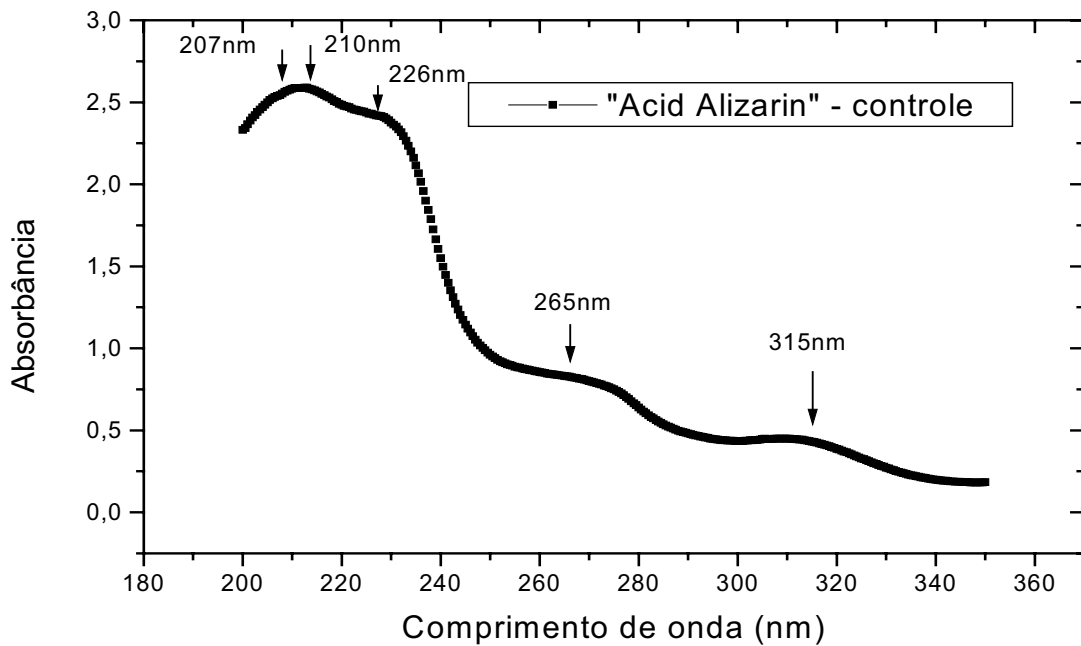
Análise em Espectro UV-Vis

FIGURA 4.1.2. Varredura espectral do corante “Acid Alizarin” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

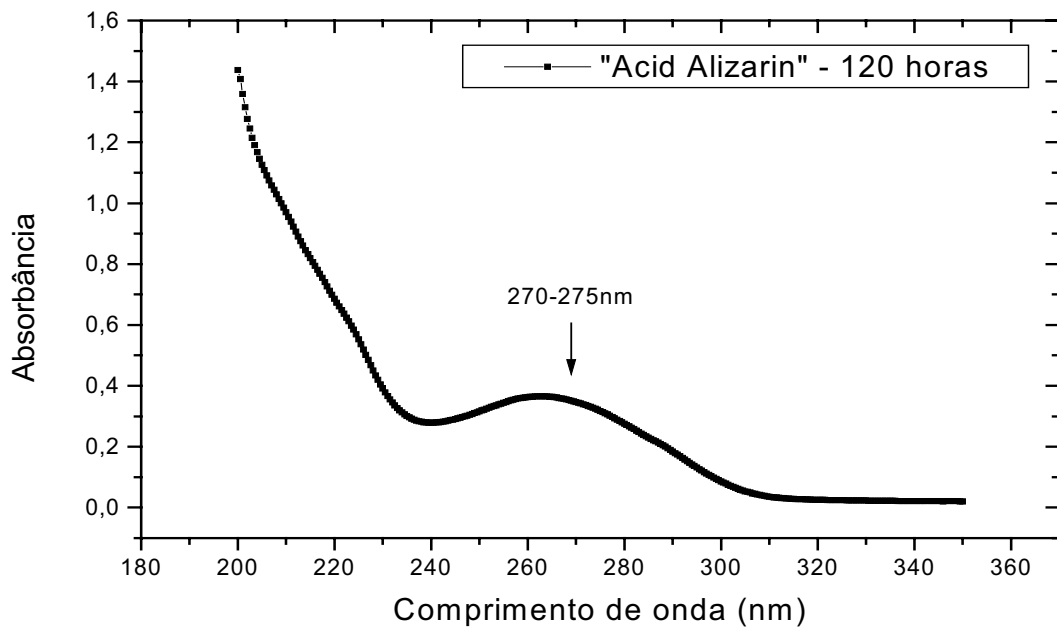


FIGURA 4.1.3. Varredura espectral do corante “Acid Alizarin” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

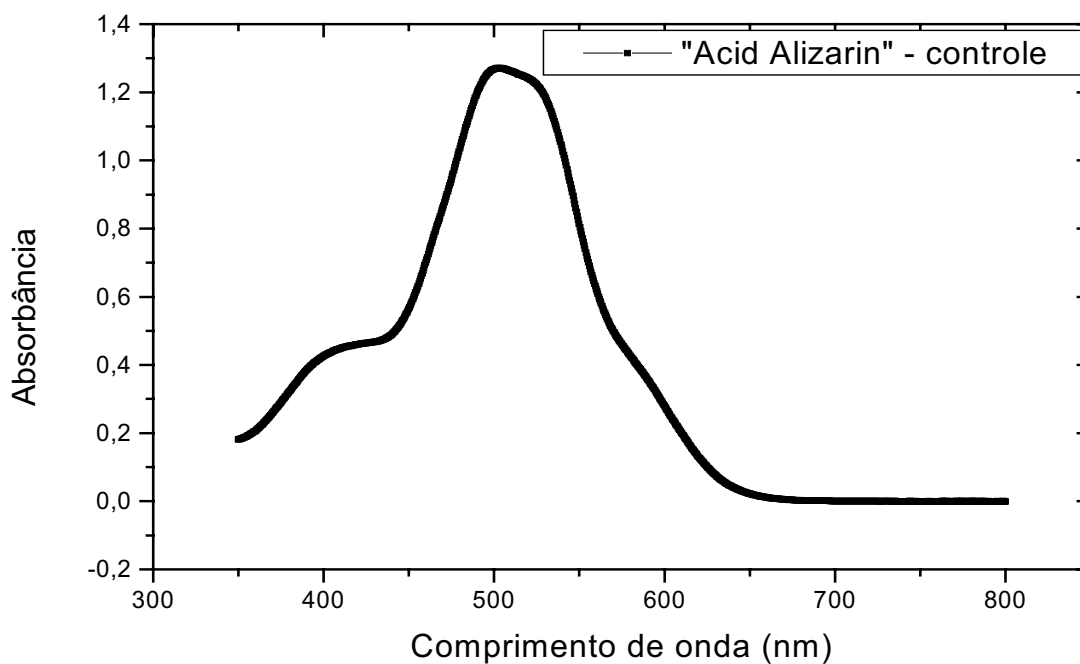


FIGURA 4.1.4. Varredura espectral do corante “Acid Alizarin” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

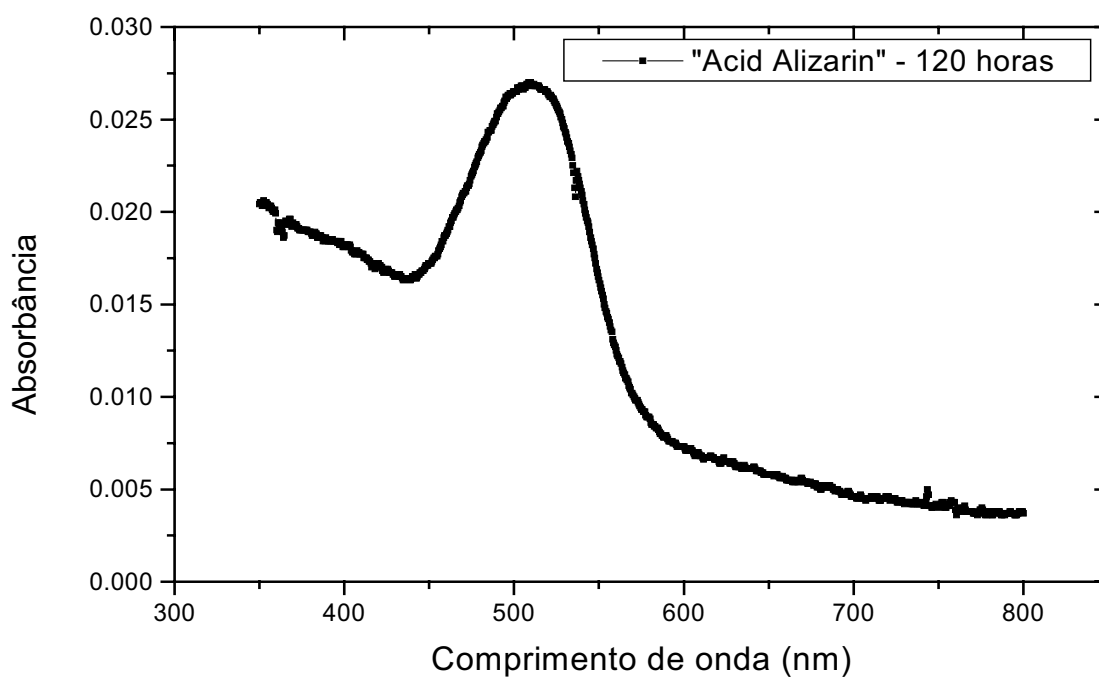


FIGURA 4.1.5. Varredura espectral do corante “Acid Alizarin” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

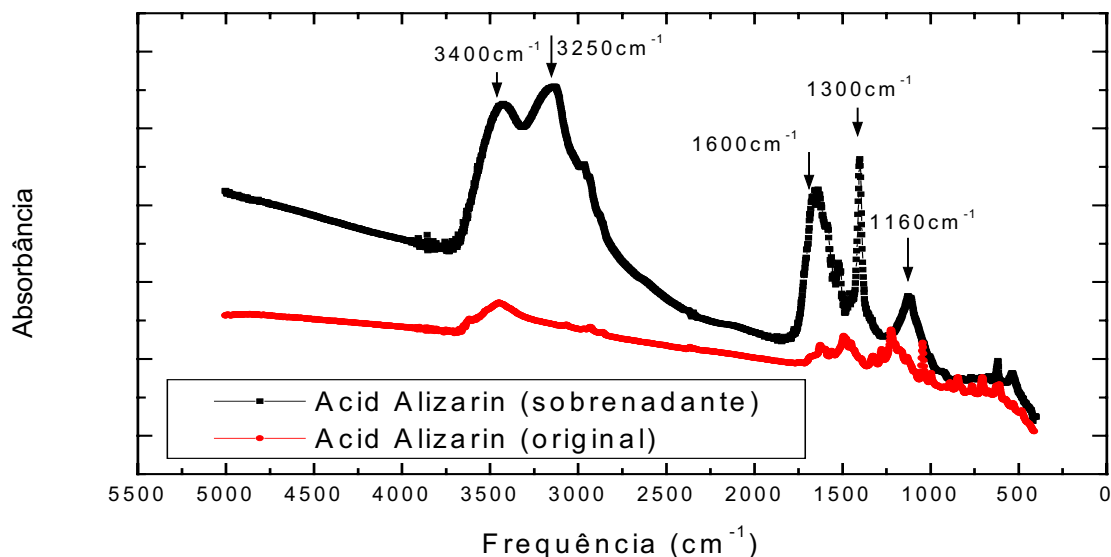


FIGURA 4.1.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} do corante "Acid Alizarin" no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

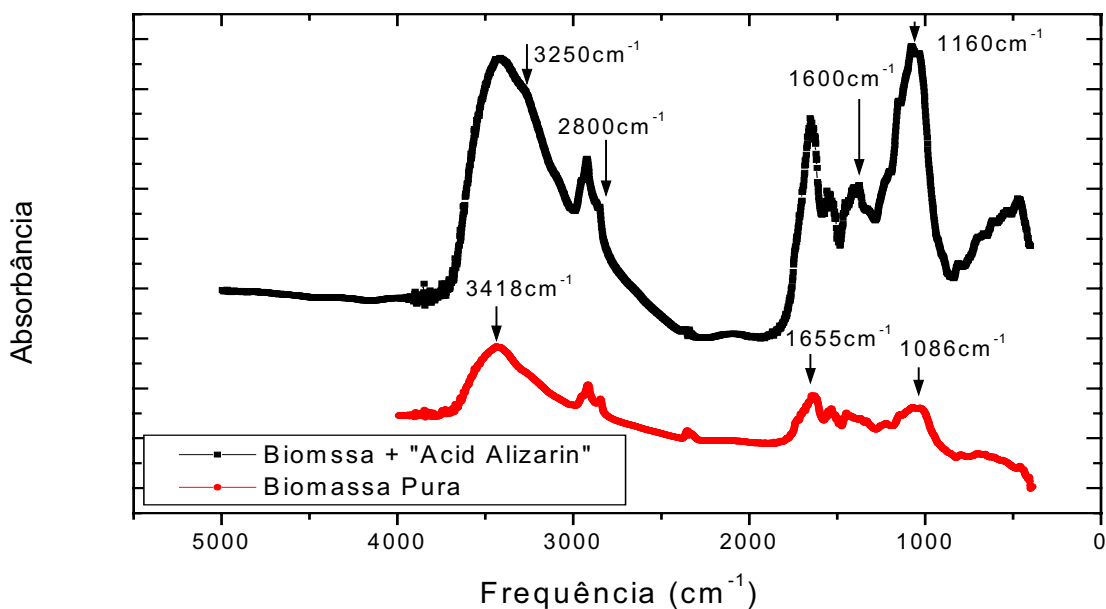


FIGURA 4.1.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante "Acid Alizarin" por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

Com o objetivo de avaliar as mudanças ocorridas, foram realizados estudos na região do UV-Vis, estes espectros oferecem informações a respeito da estrutura do corante. Apesar do corante “Acid Alizarin” ser considerado “pH estável”, como indica a FIGURA 4.1.1. cujo espectro apresenta bandas bastante homogêneas, do ponto de vista estrutural, pode-se verificar que a somatória dos sítios cromóforos mostram banda máximo de absorbância em 502,5nm (FIGURA 4.1.4.). Porém, na região do UV, observa-se que ocorrem bandas entre 207 e 210nm, característicos de núcleos fenólicos sulfonados, em 226, 265 e 315nm, SILVERSTEIN et al., (1987), característicos do naftol (FIGURAS 4.1.2.). Após 120 horas de contato, várias dessas estruturas perdem suas características espectrais, e aparece uma banda na região de 270 a 275nm, típico da formação naftol, segundo INDEX MERCK, (1976). Podemos verificar também que durante este tempo de contato ocorreu uma significativa remoção do corante, como mostra a FIGURA 4.1.5., em que a absorbância se apresenta muito reduzida.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

A FIGURA 4.1.6. revela que o controle apresenta uma banda na região entre 3300 e 3400cm⁻¹, característicos dos grupos fenol e naftol. Após 120 horas de contato surge uma banda nova entre 3250 e 3000cm⁻¹, sugerindo a formação de amins primárias, com a apresentação também de banda fraca entre 2800 e 3000cm⁻¹, característicos também de amina primária. Ainda no sobrenadante podemos constatar o aparecimento de uma banda em 1550 a 1600cm⁻¹ devido às amins primárias e outra, entre 1300 e 1160cm⁻¹, característico segundo DYER, (1969), da formação de compostos benzenos sulfonados. Estes compostos provavelmente se formaram em virtude da ação das enzimas azoredutases, sobre a ligação azo do corante “Acid Alizarin”.

Os espectros de FTIR, da FIGURA 4.1.7. indicam que ambos são similares, e as vibrações entre 3418, 1655 e 1560cm⁻¹, podem, segundo

BHANOORI e VENKATETESWERLU (2000), ser atribuídos à quitina, presentes na parede celular de *Neurospora crassa*. Na região de 3400cm^{-1} , coincidem também com a banda referente aos grupos fenol e naftol do corante. Há também o aparecimento da sensibilidade na região entre 3250 e 2800cm^{-1} , característico da presença de aminas primárias, assim como, o aumento da intensidade das bandas entre 1550 e 1600cm^{-1} e outra 1370 e 1160cm^{-1} , típico segundo DYER, (1969), da formação de compostos benzeno sulfonados, indicando que ocorreram modificações estruturais, tanto no sobrenadante como no corante aderido a parede celular.

Pode também ocorrer hidrólise química, dependendo das condições do meio, porém, há necessidade de confirmação em Espectrofotometria de Massa.

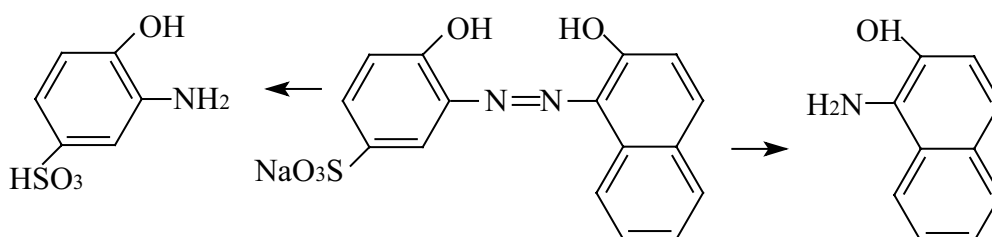


FIGURA 4.1.8. Corante “Acid Alizarin”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

4.2. Espectro UV-Vis do corante "Acid Blue 25" a diferentes valores de pH

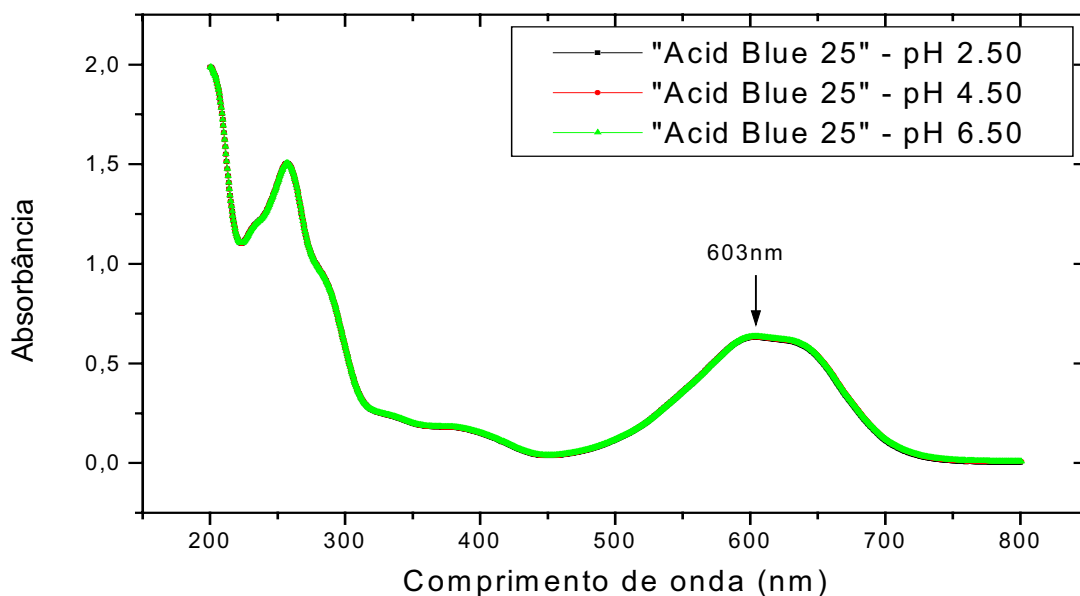


FIGURA 4.2.1. Varredura espectral do corante "Acid Blue 25", nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100µg/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{603\text{nm}} = 0,00497 + (0,01191 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99995

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{603\text{nm}} = 0,01548 + (1,01032 \times \text{concentração do corante})$$

R= 0,99991

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{603\text{nm}} = 0,01123 + (0,07321 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99998

Análise em Espectro UV-Vis

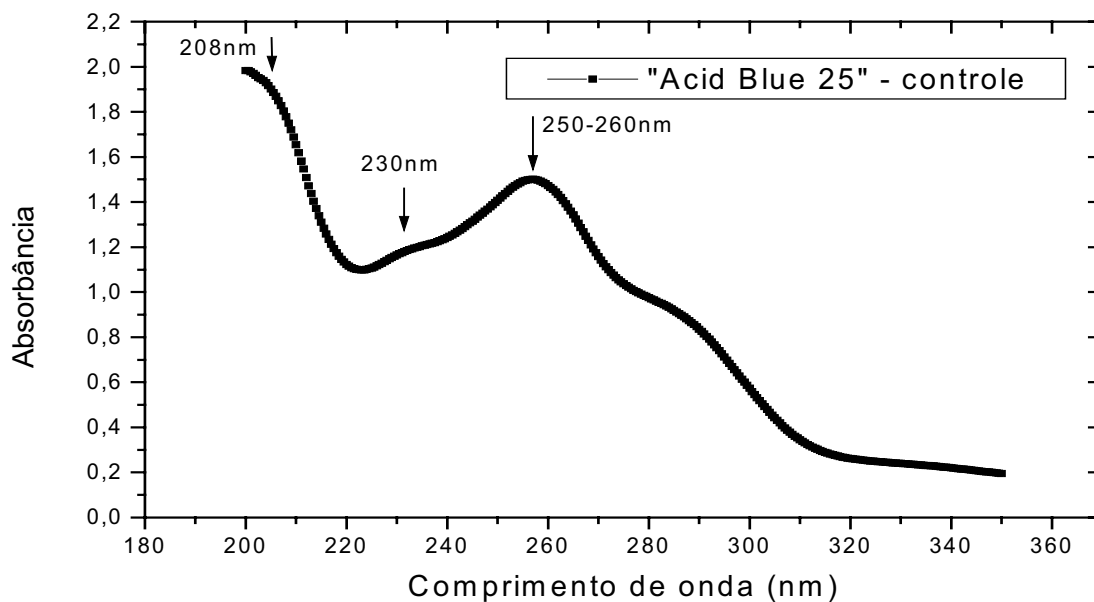


FIGURA 4.2.2. Varredura espectral do corante "Acid Blue 25" de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

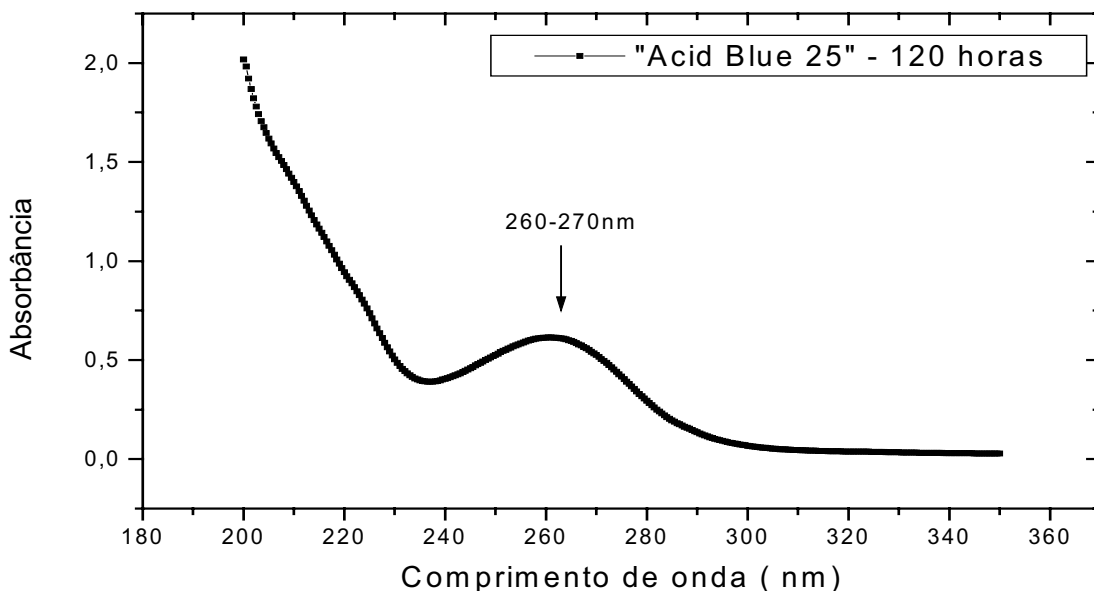


FIGURA 4.2.3. Varredura espectral do corante "Acid Blue 25" de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

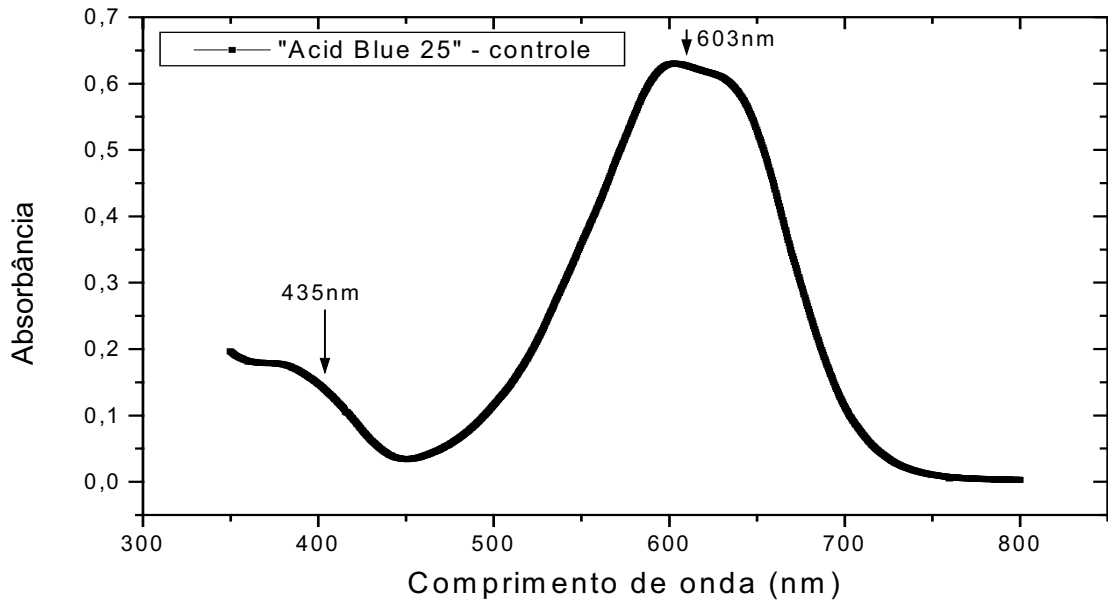


FIGURA 4.2.4. Varredura espectral do corante “Acid Blue 25” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

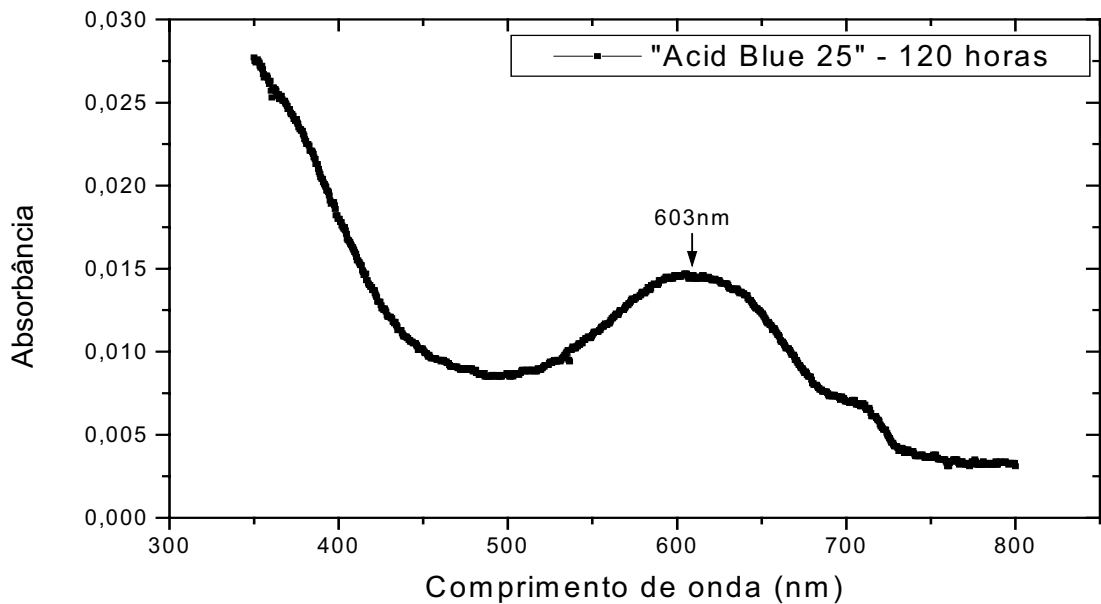


FIGURA 4.2.5. Varredura espectral do corante “Acid Blue 25” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

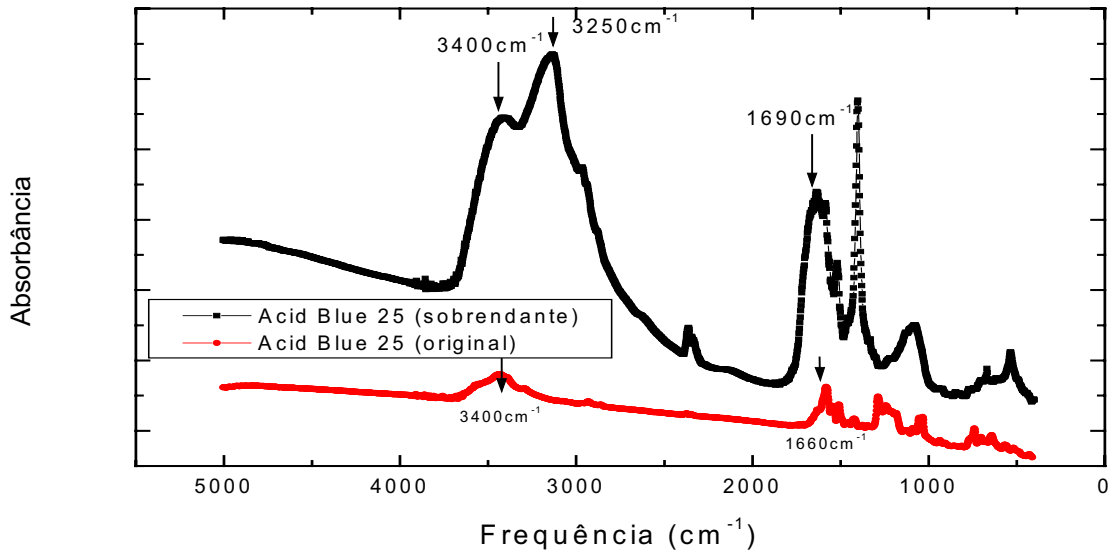


FIGURA 4.2.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} do corante “Acid Blue 25” no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

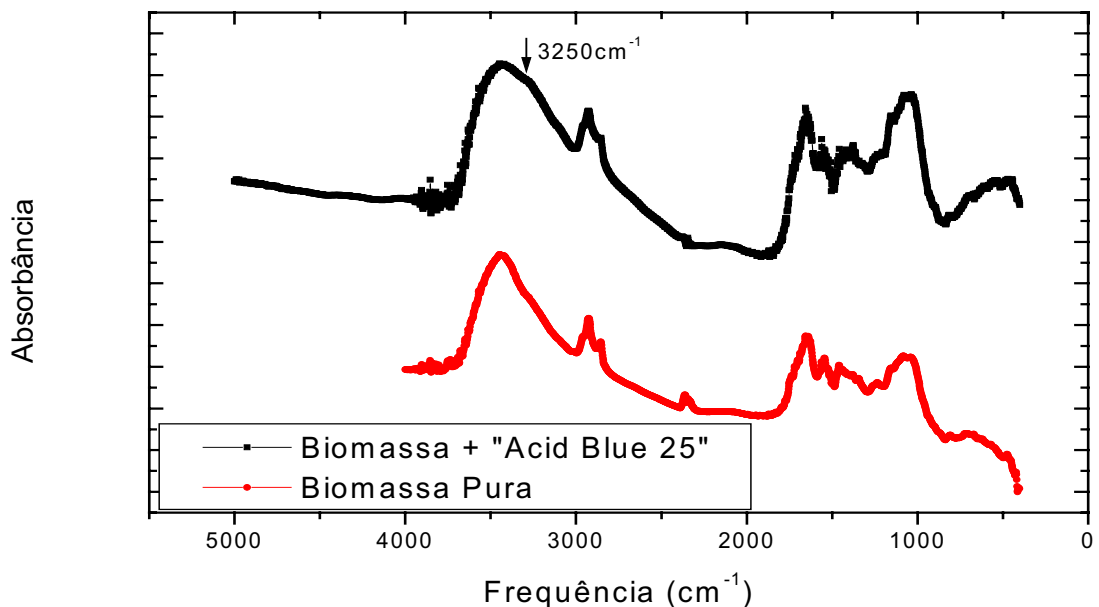


FIGURA 4.2.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante “Acid Blue 25” por 120

horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

Através da FIGURA 4.2.1. pode-se observar que este corante apresenta características de valores de pH estável, segundo os espectros de absorvância.

A FIGURA 4.2.2. revela região de banda em 208nm referente à ramificação benzeno sulfonado, bandas pequenas em 230nm indicando presença amina primária no corante controle, com bandas entre 250 e 260nm, provavelmente derivado do grupo quinólico. Na FIGURA 4.2.3. após 120 horas, ocorreu deslocamento de banda 260-270nm, devido presumivelmente, formação de fenol. A FIGURA 4.2.4 apresenta ondulação em 435nm referente à ramificação quinólica (SILVERSTEIN et al., 1987), a qual desapareceu na FIGURA 4.2.5. Região de sítios cromóforos em 603nm no controle, permanece após o tempo de contato.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

Na FIGURA 4.2.6. observa-se uma banda em 3400cm^{-1} , presumivelmente devido à presença de amino benzeno e ligeira oscilação em 2980cm^{-1} e 1660cm^{-1} , segundo PASTO e JOHNSON, (1977), resultante da presença do grupo quinólico. Após 120 horas, além da banda 3400cm^{-1} surge também maior concentração de amina primária em 3250cm^{-1} . O mesmo aconteceu em 1690cm^{-1} . Na região de 3400cm^{-1} , coincide também com a banda referente ao grupo fenólico do corante tratado. Há também o surgimento de bandas na região de 3000cm^{-1} a 2800cm^{-1} , correspondente a presença de aminas primárias. Segundo SILVERSTEIN et al., (1987), as bandas encontradas entre 1600 e 1550cm^{-1} e em 1140 e 1370cm^{-1} indicam formação de compostos benzenos sulfonados, resultantes de modificações estruturais do corante residual, bem como, do corante aderido à parede celular, (FIGURA 4.2.7.), com características idênticas ao corante anterior.

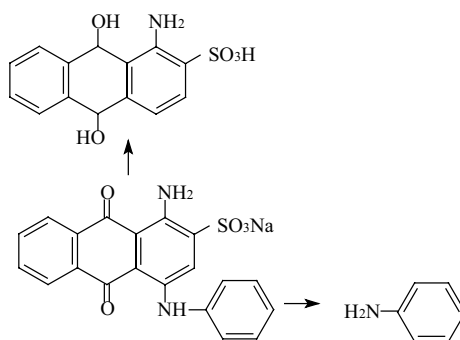


FIGURA 4.2.8. Corante “Acid Blue 25”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

4.3. Espectro UV-Vis do corante "Acid Blue 29" a diferentes valores de pH

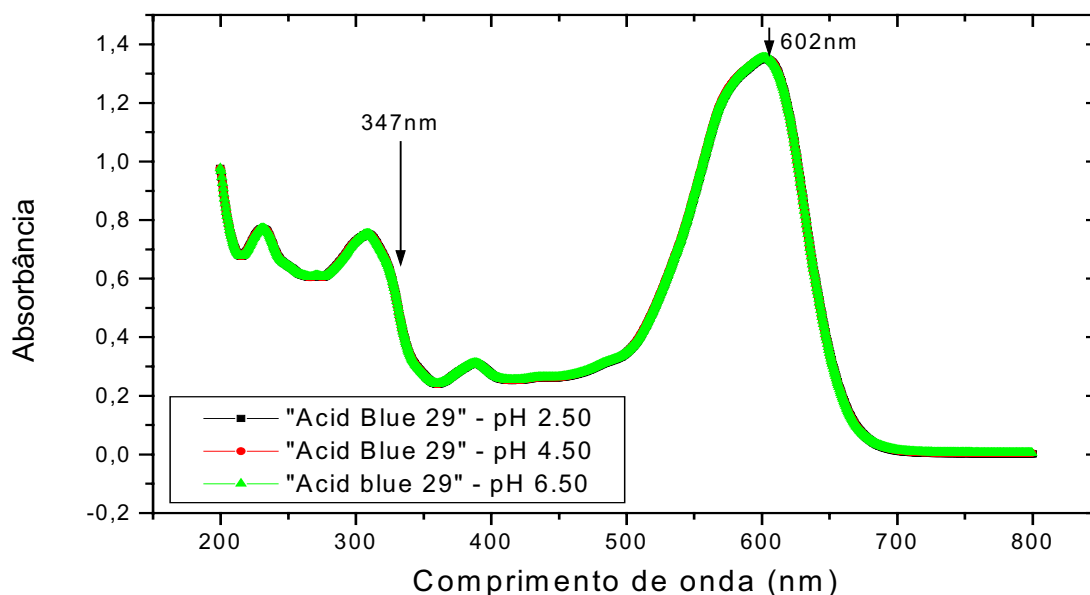


FIGURA 4.3.1. Varredura espectral do corante "Acid Blue 29", nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100µg/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{602\text{nm}} = 0,01003 + (0,01022 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99996

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{602\text{nm}} = 0,11330 + (0,03446 \times \text{concentração do corante})$$

R= 0,99993

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{602\text{nm}} = 0,23233 + (0,75621 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99998

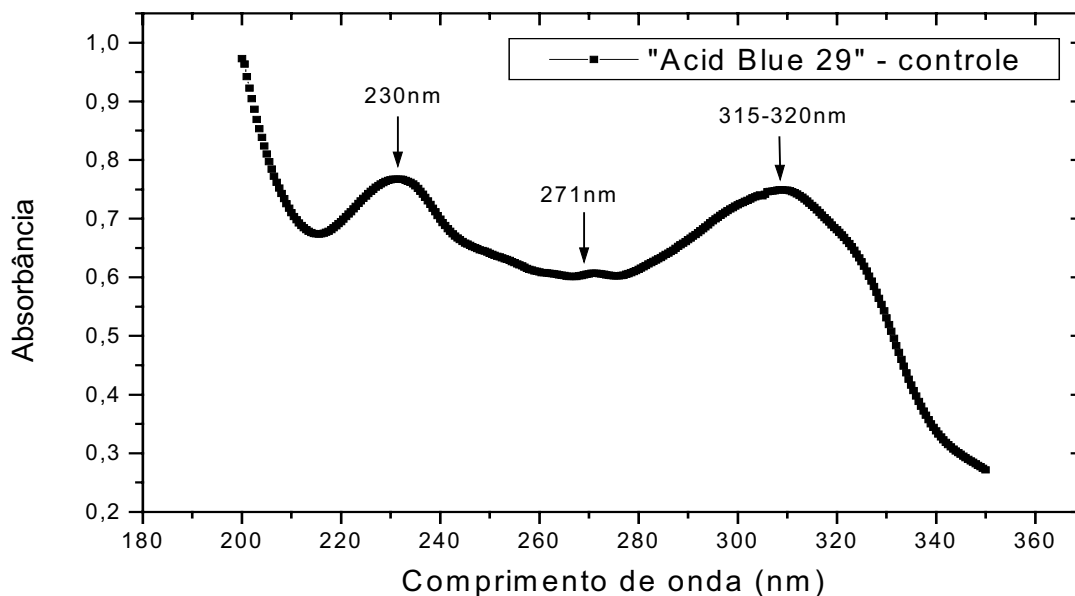
Análise em Espectro UV-Vis

FIGURA 4.3.2. Varredura espectral do corante “Acid Blue 29” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

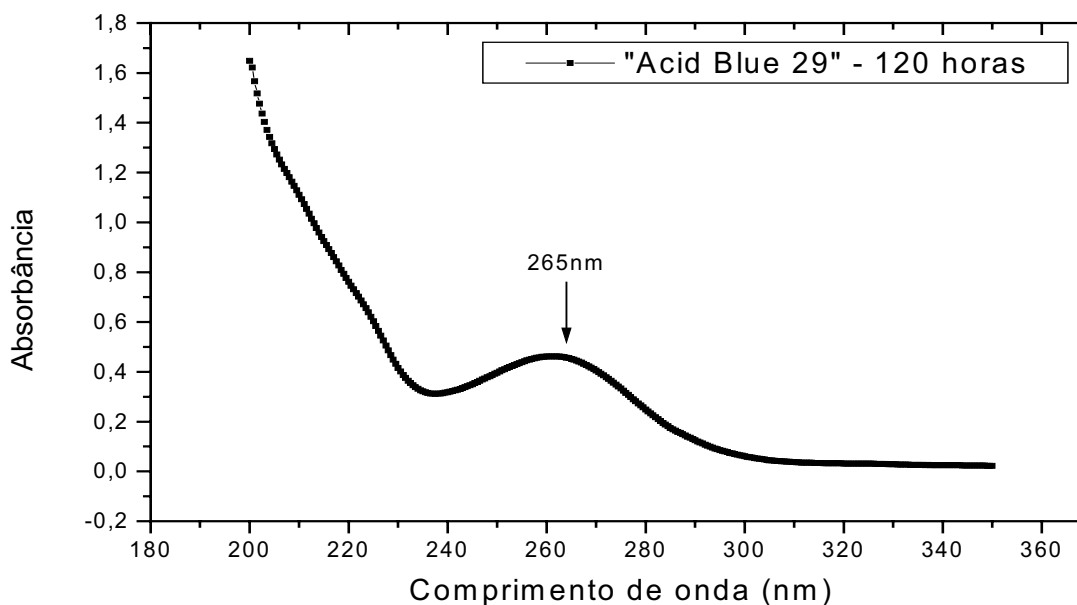


FIGURA 4.3.3. Varredura espectral do corante “Acid Blue 29” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

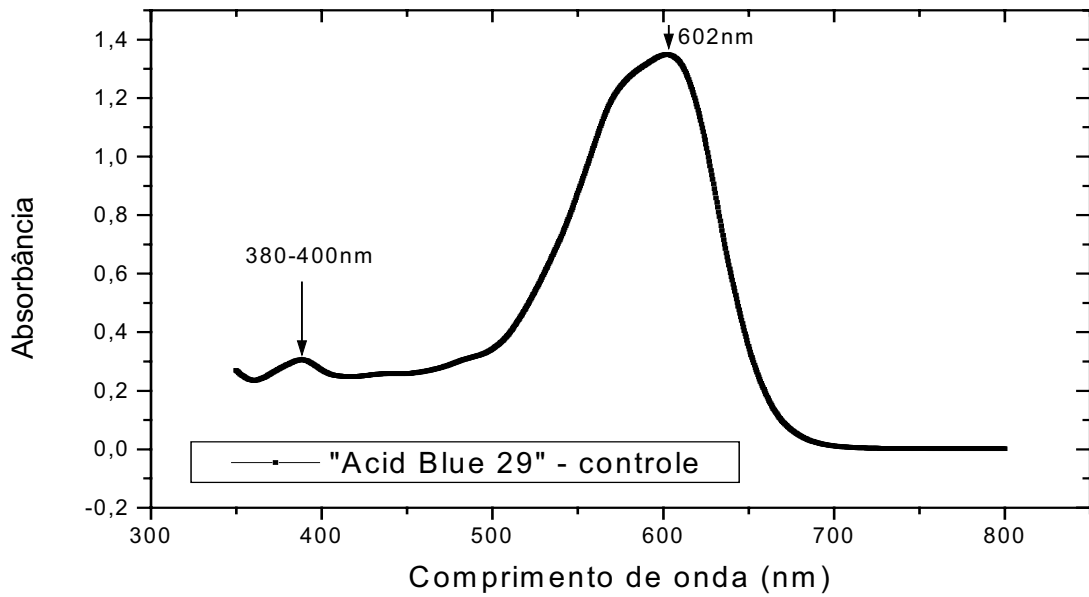


FIGURA 4.3.4. Varredura espectral do corante “Acid Blue 29” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

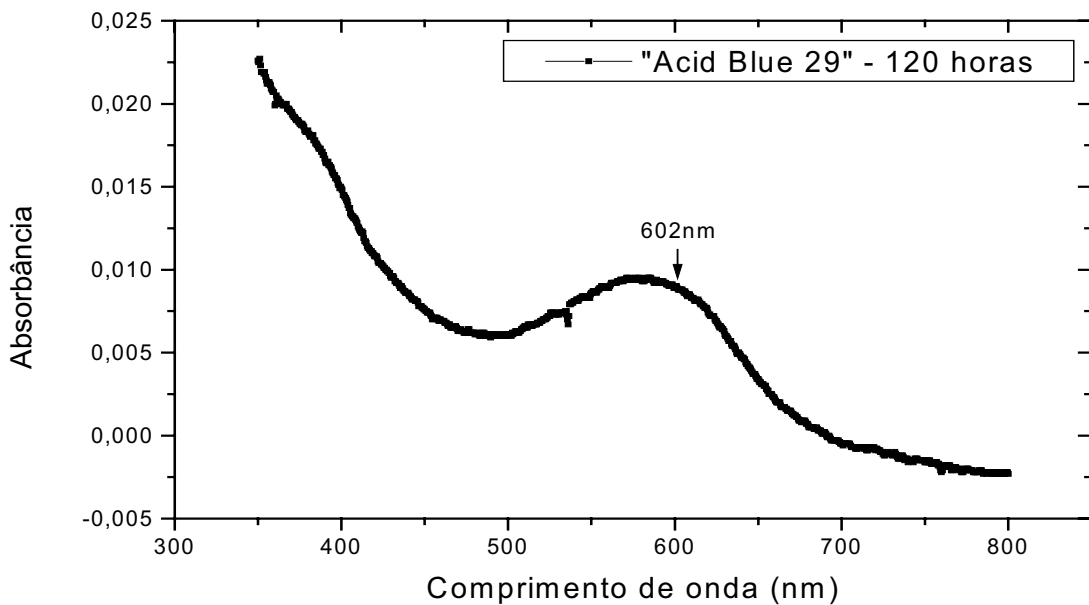


FIGURA 4.3.5. Varredura espectral do corante “Acid Blue 29” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

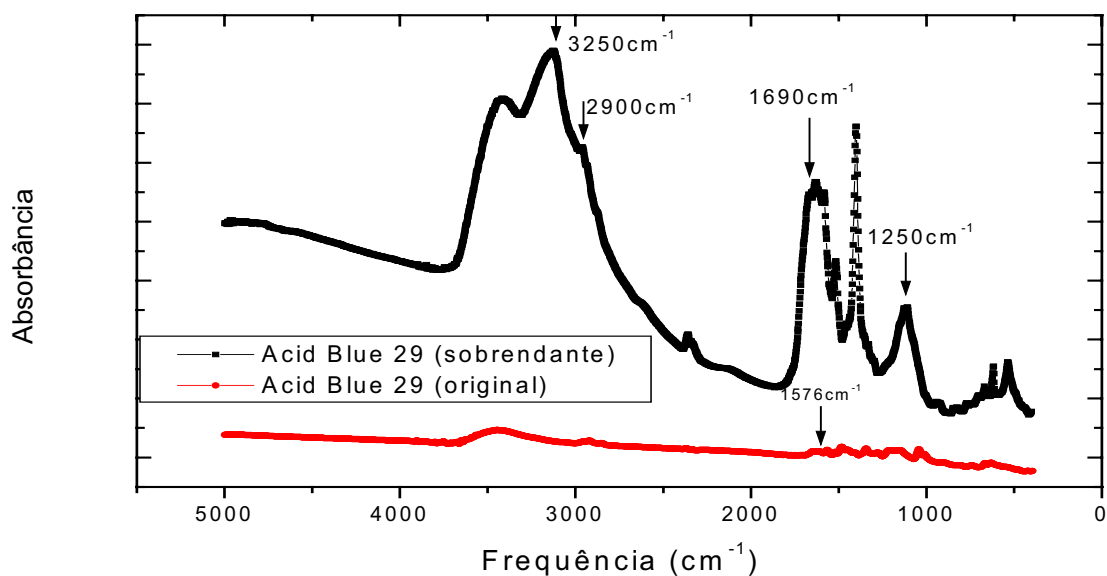


FIGURA 4.3.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} do corante “Acid Blue 29” no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

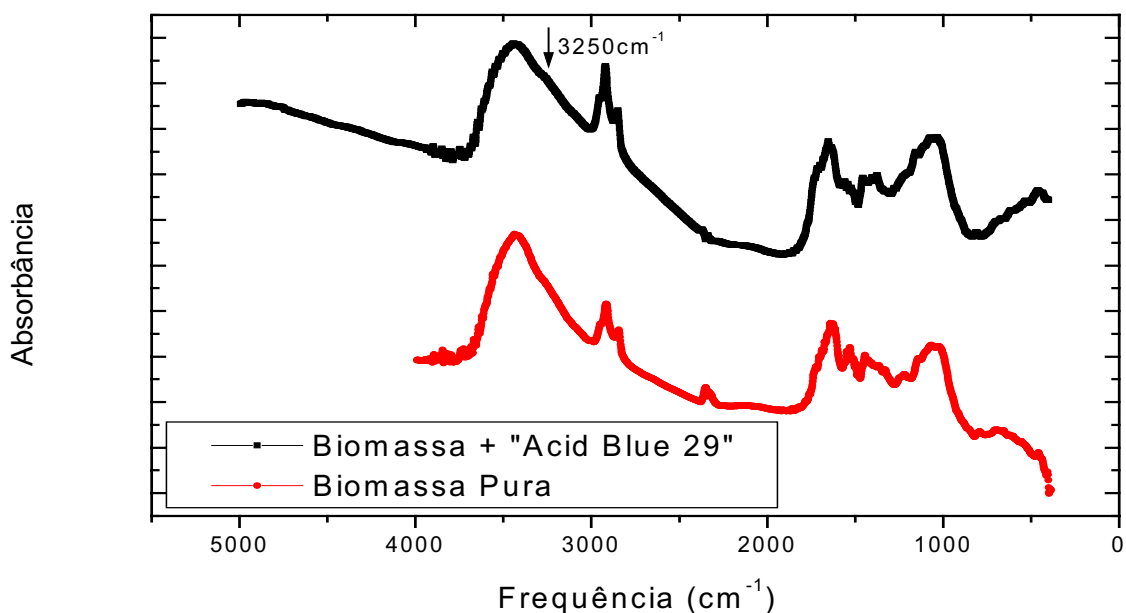


FIGURA 4.3.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante “Acid Blue 29” por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

Conforme resultados semelhantes na FIGURA 4.3.1, pode-se observar que o corante não apresenta alterações em absorbância, quando exposto a variação de valores de pH.

A FIGURA 4.3.2. mostra regiões de banda em 230nm, segundo DYER (1969), pode ser amina primária, em 271nm pequena banda correspondente, segundo SILVERSTEIN et al., (1987), ao nitrobenzeno e em 315-320nm referente ao naftol. Após 120 horas de contato (FIGURA 4.3.3.), está expresso apenas a banda do naftol em 265nm. Na FIGURA 4.3.4. observa-se, segundo PASTO e JOHNSON (1977), pequena região de banda entre 380-400 nm, devido à presença de ligações diazo. O sítio cromóforo está localizado a 602nm. Decorrido o tempo de 120 horas (FIGURA 4.3.5.), ocorreu grande diminuição da absorbância, mantendo sítio cromóforo no mesmo comprimento de onda do controle.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

FIGURA 4.3.6. revela no controle absorção em 3400cm^{-1} resultante da presença de fenol/naftol (DYER, 1969), segundo SILVERSTEIN et al., (1987), a presença de bandas a partir de 1576cm^{-1} revelam azo compostos. Após 120 horas de tratamento surgem bandas em 3250, 2900, 2690 e 1250cm^{-1} típica da presença de aminas primárias. Os espectros de absorção são muito semelhantes nas regiões 3418, 1655 e 1560cm^{-1} , que podem corresponder à quitina. Em 3400cm^{-1} há coincidência da banda referente ao fenol/naftol presente no corante. Havendo o surgimento de bandas na região de 3600 a 2800cm^{-1} , correspondente à presença de aminas primárias, (FIGURA 4.3.7).

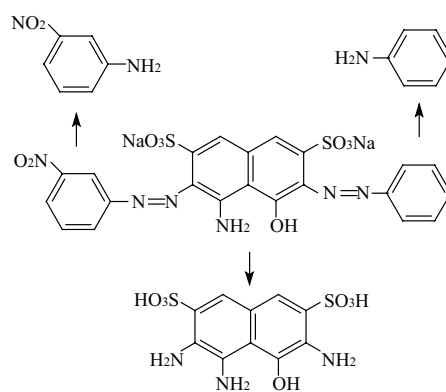


FIGURA 4.3.8. Corante “Acid Blue 29”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

4.4. Espectro UV-Vis do corante "Acid Blue 40" a diferentes valores de pH

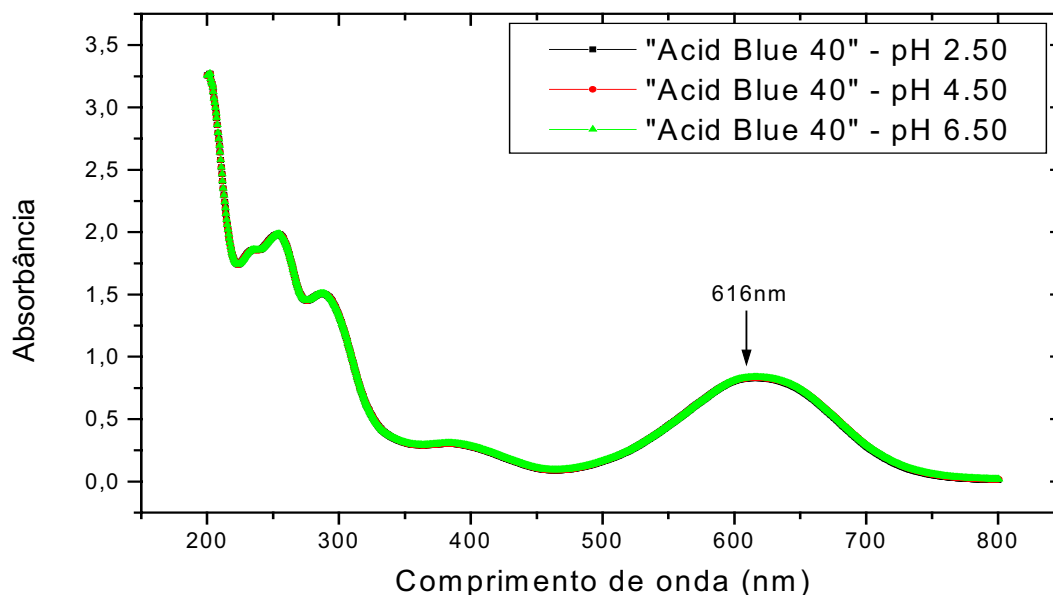


FIGURA 4.4.1. Varredura espectral do corante "Acid Blue 40", nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100µg/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{616\text{nm}} = 0,0022 + (0,03686 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99999

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{616\text{nm}} = -1,33333\text{E-}04 + (4,37944\text{E-}04 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99997

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{616\text{nm}} = 0,33331 + (0,52283 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99996

Análise em Espectro UV-Vis

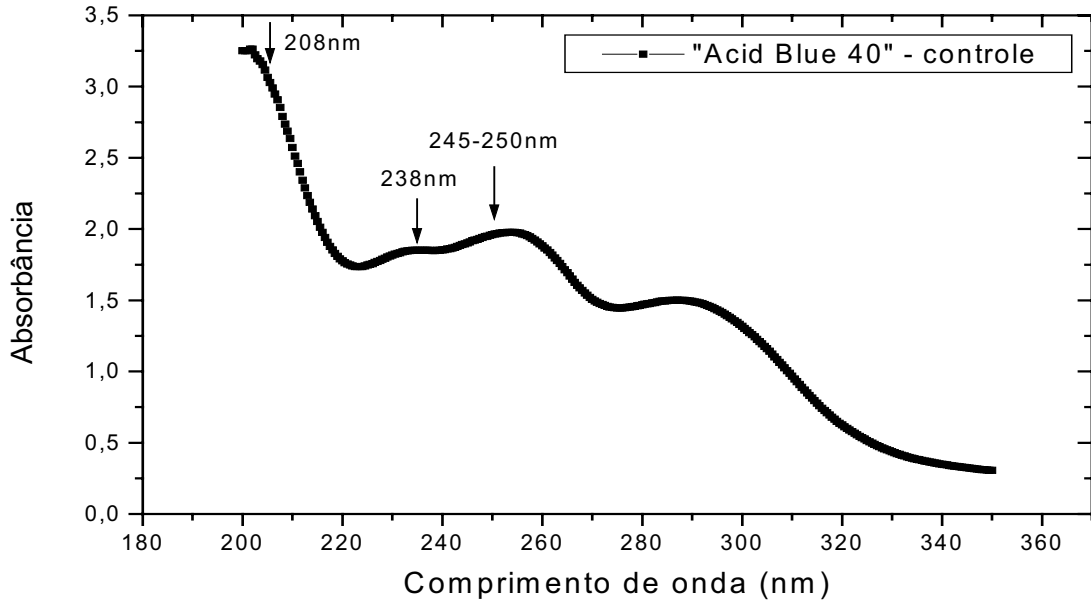


FIGURA 4.4.2. Varredura espectral do corante “Acid Blue 40” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100µg/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

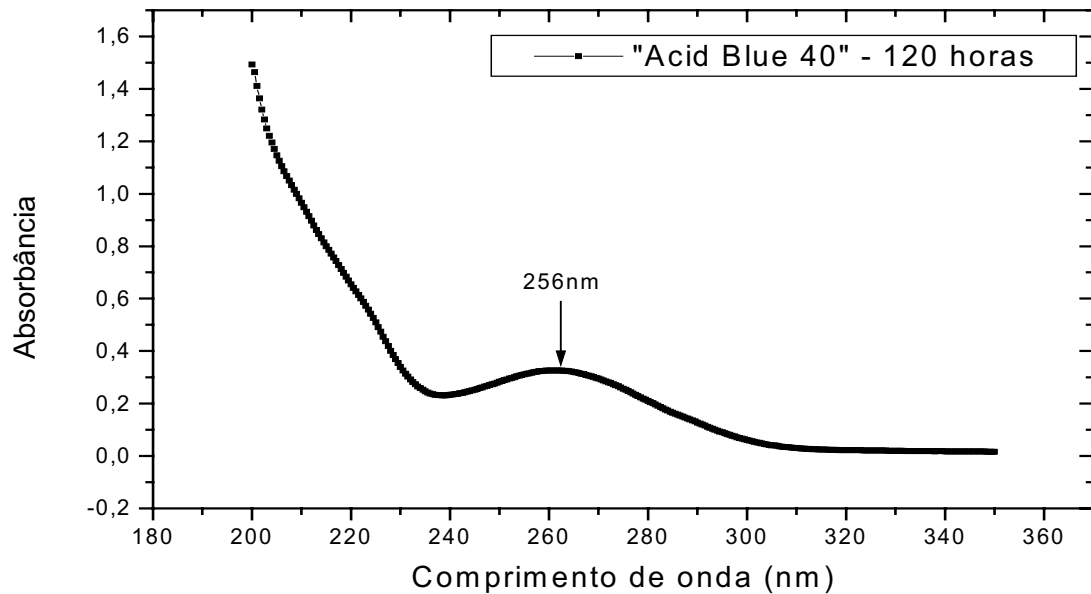


FIGURA 4.4.3. Varredura espectral do corante “Acid Blue 40” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100µg/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

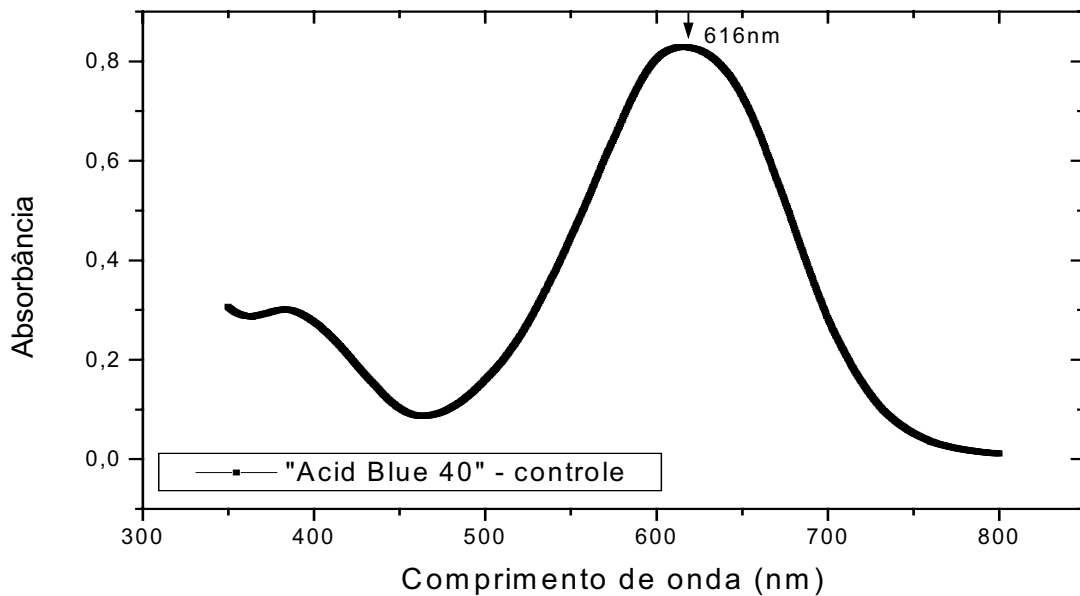


FIGURA 4.4.4. Varredura espectral do corante "Acid Blue 40" de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

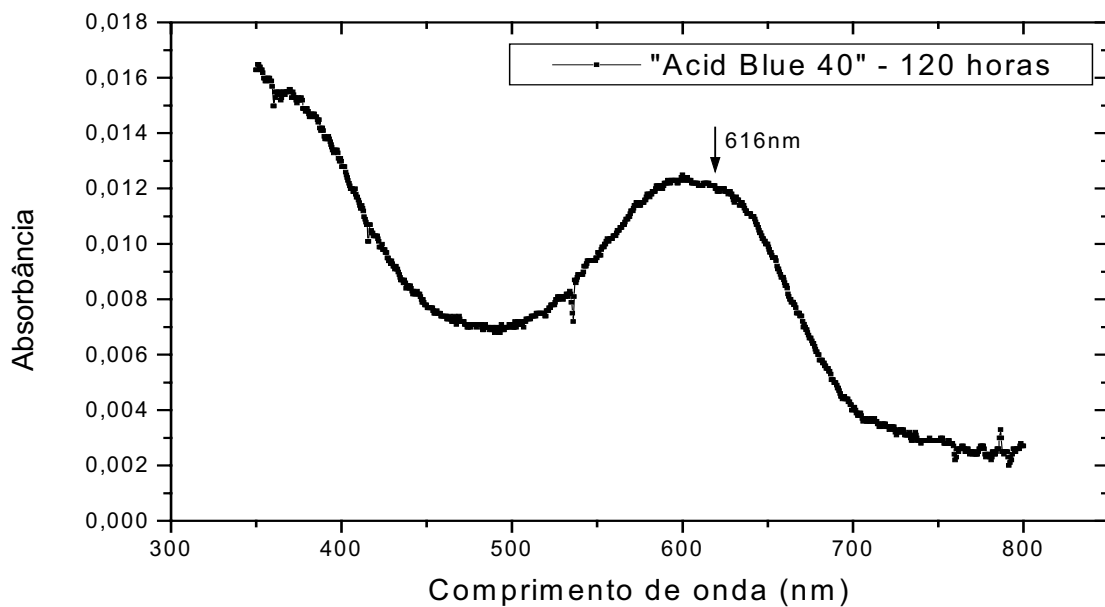


FIGURA 4.4.5. Varredura espectral do corante "Acid Blue 40" de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; após 120 horas de contato; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

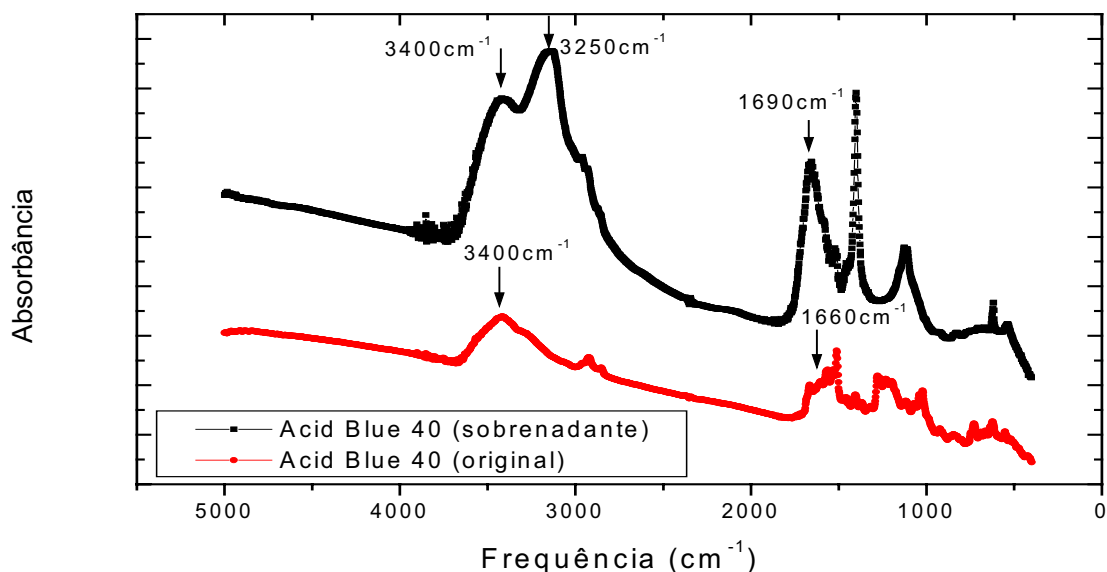


FIGURA 4.4.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} do corante “Acid Blue 40” no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

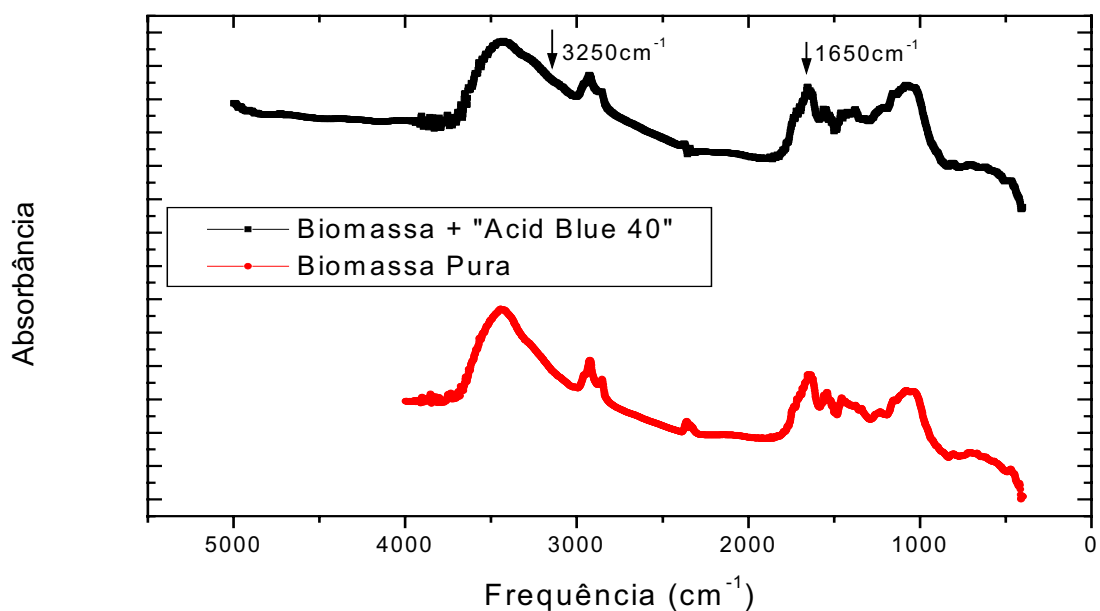


FIGURA 4.4.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante “Acid Blue 29” por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

A FIGURA 4.4.1. mostra a estabilidade nos valores de pH deste corante, segundo os espectros de absorbância.

A FIGURA 4.4.2. mostra banda na região de 208nm, devido ao benzeno sulfônico. Em 238nm, segundo DYER (1969) é devido à presença de amidas secundárias. Na região de 245 a 250nm devido, segundo PASTO e JOHNSON (1977), aos grupos quinólicos. Após 120 horas (FIGURA 4.4.3.), verificou-se o aparecimento de banda em 256nm, característico do surgimento de fenol. A FIGURA 4.4.4. revela a somatória dos sítios cromóforos em 616nm, também para a FIGURA 4.4.5., após 120 horas de interação corante-biomassa.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

A FIGURA 4.4.6. do controle apresenta banda específica em 3400cm^{-1} devido à presença de amida secundária (SILVERSTEIN et al., 1987), e bandas na região 1660cm^{-1} , resultante do grupo quinólico. Após 120 horas pode-se verificar que, além da região de 3400cm^{-1} também aparece bandas em 3250 , 2900 , 1690 e 1250cm^{-1} , devido presumivelmente, ao aparecimento das aminas primárias. Na (FIGURA 4.4.7.), pode-se verificar que os espectros são muito semelhantes nas regiões em 3418 , 1655 e 1560cm^{-1} , que podem ser atribuídas à quitina. Na região de 3400cm^{-1} , coincide também com a banda referente aos grupos fenol/naftol do corante tratado. Há também o surgimento de bandas na região de 3250cm^{-1} a 2800cm^{-1} , correspondente a presença de aminas primárias. Segundo SILVERSTEIN et al., (1987), as bandas encontradas entre 1650cm^{-1} são aminas primárias, e em 1160cm^{-1} é devida à formação de compostos benzenos sulfonados, resultantes de modificações estruturais do corante residual, bem como, do corante aderido à parede celular.

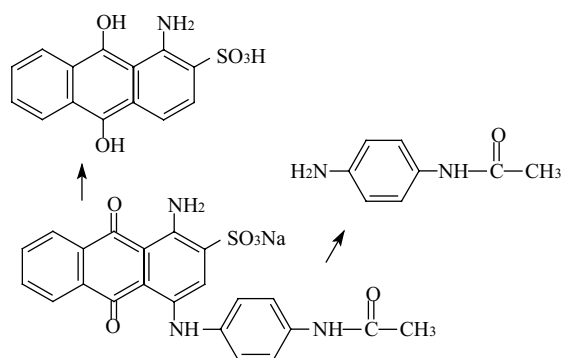


FIGURA 4.4.8. Corante “Acid Blue 40”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

4.5. Espectro UV-Vis do corante "Acid Red 44" a diferentes valores de pH

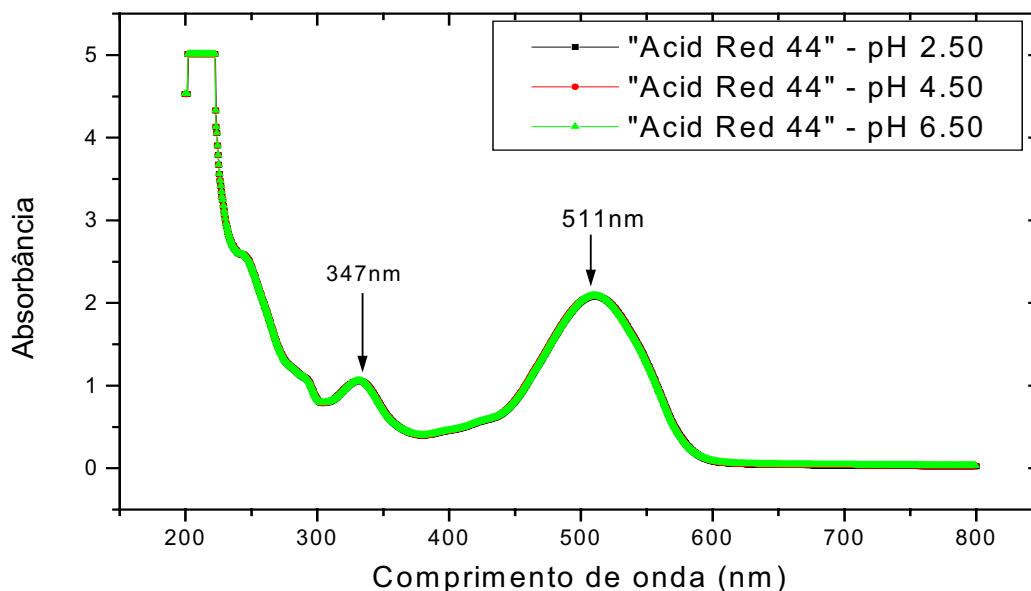


FIGURA 4.5.1. Varredura espectral do corante "Acid Red 44", nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100 μ g/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC

pH 2,50

$$\text{Absorvância}^{511\text{nm}} = 1,57443 \cdot 10^{-4} + (0,22011 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99996

pH 4,50

$$\text{Absorvância}^{511\text{nm}} = 3,12991 \cdot 10^{-4} + (1,0056 \times \text{concentração do corante})$$

R= 0,99999

pH 6,50

$$\text{Absorvância}^{511\text{nm}} = -1,11335 + (0,004 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99998

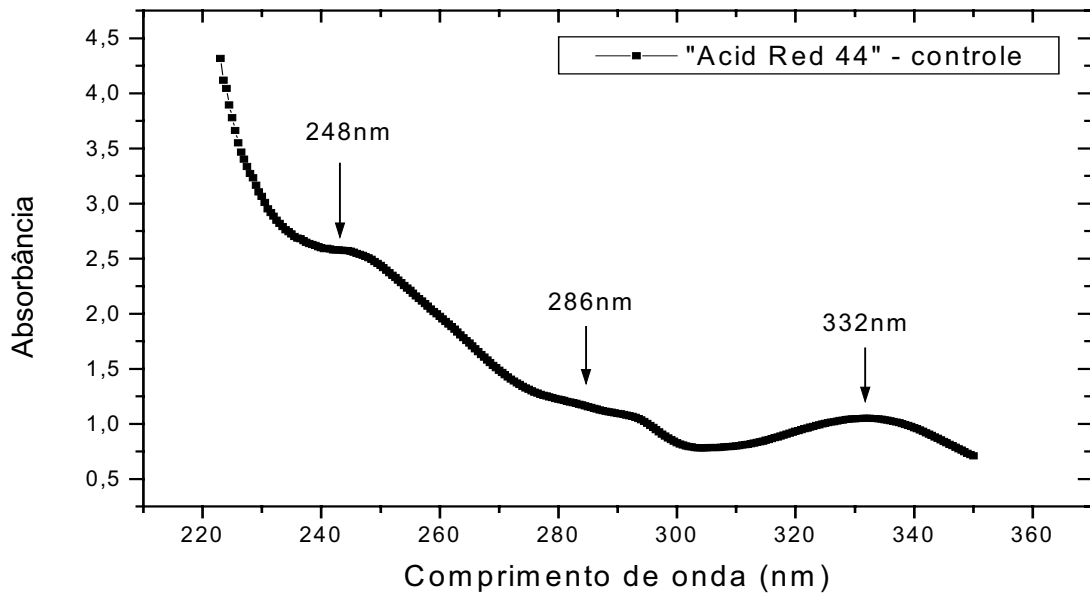
Análise em Espectro UV-Vis

FIGURA 4.5.2. Varredura espectral do corante "Acid Red 44" de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

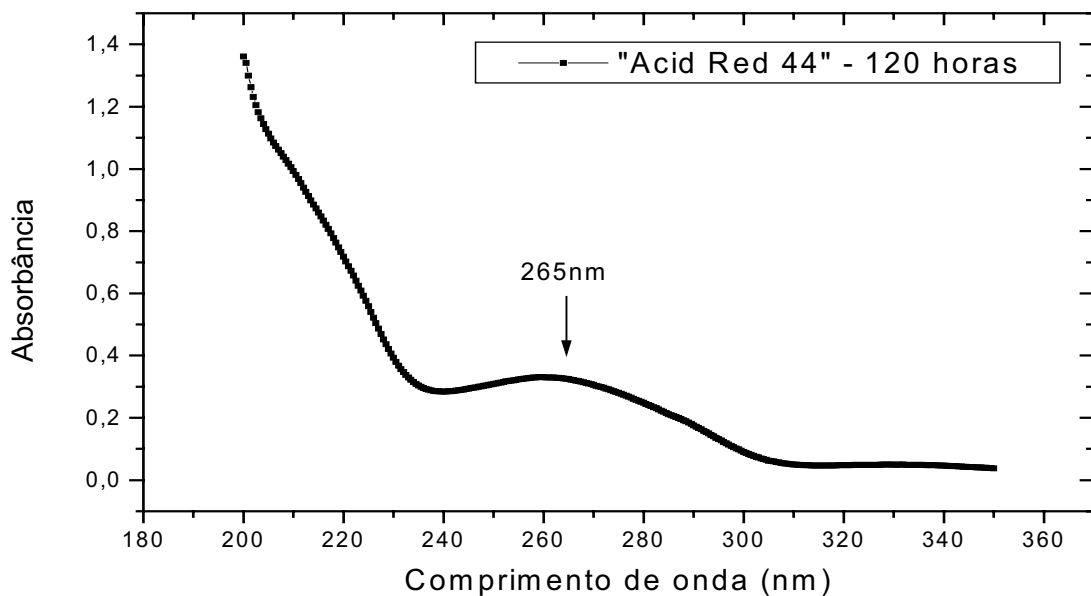


FIGURA 4.5.3. Varredura espectral do corante "Acid Red 44" de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

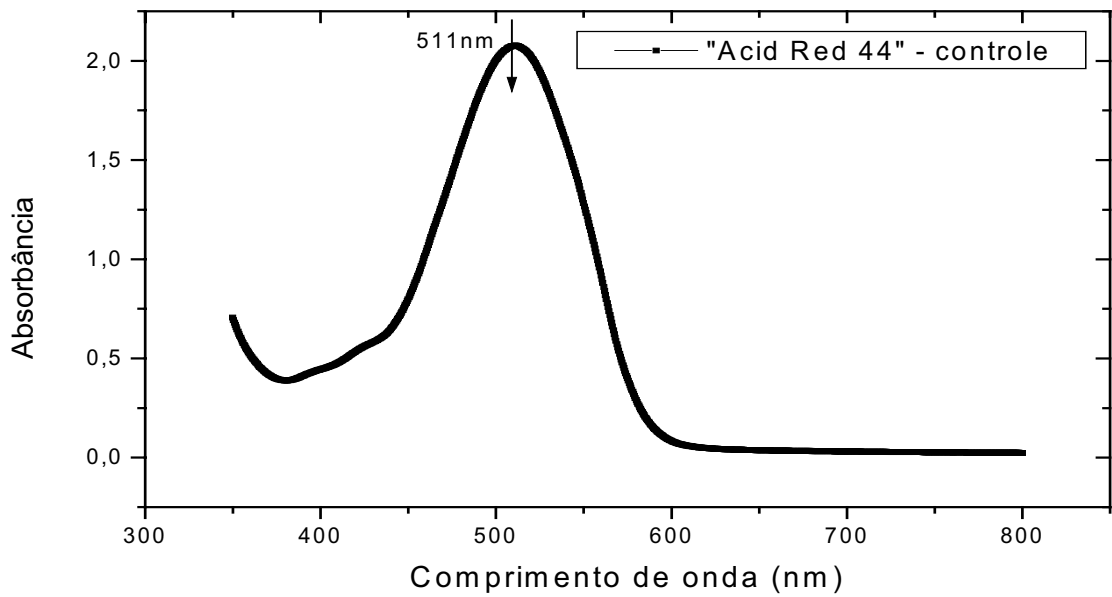


FIGURA 4.5.4. Varredura espectral do corante "Acid Red 44" de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

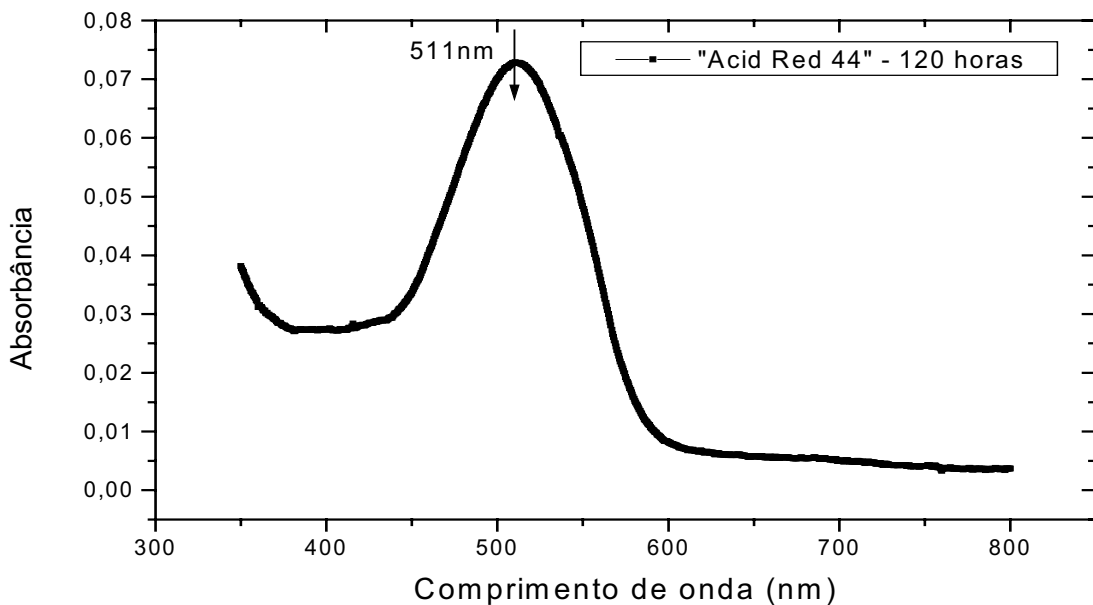


FIGURA 4.5.5. Varredura espectral do corante "Acid Red 44" de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; após 120 horas de contato; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

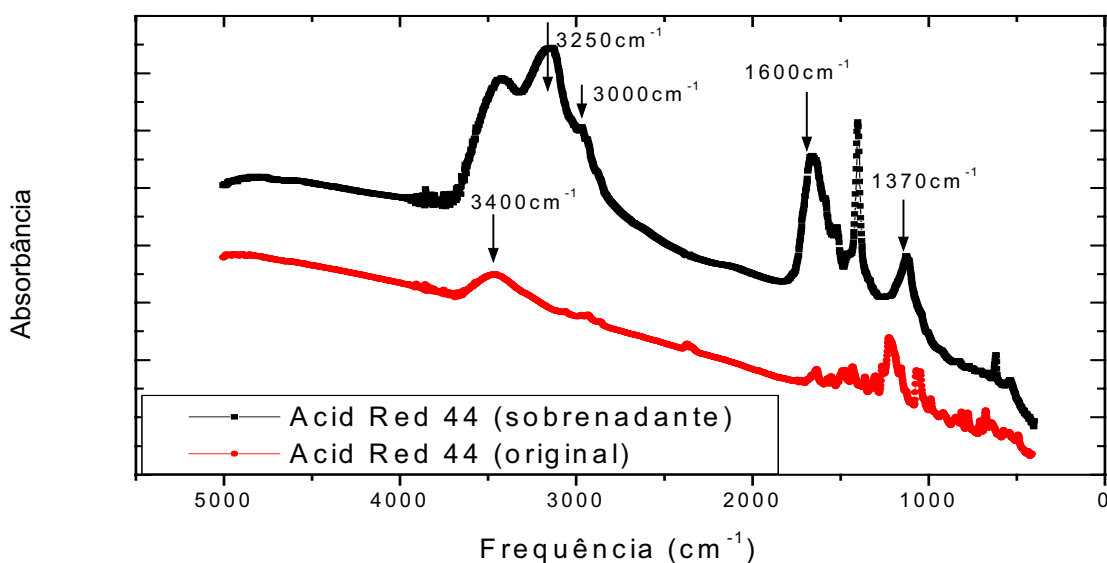


FIGURA 4.5.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} do corante “Acid Red 44” no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

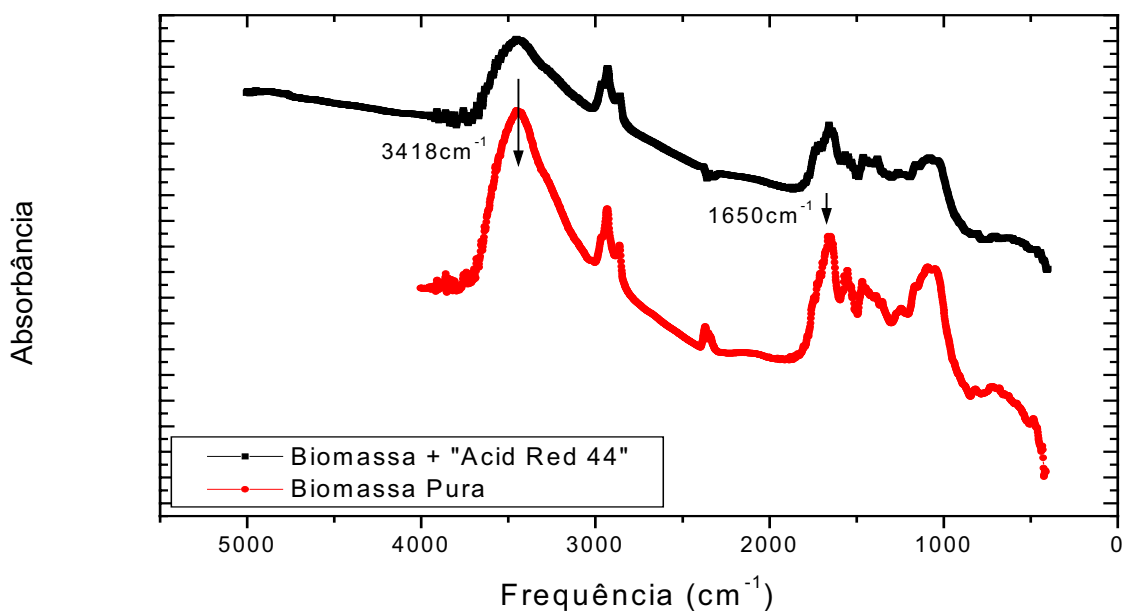


FIGURA 4.5.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante “Acid Red 44” por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

A FIGURA 4.5.1. demonstra que este corante apresenta espectros de absorbância idênticos, quando submetidos à variação de valores de pH.

A FIGURA 4.5.2. mostra ondulações na região de 248, 286 e 332nm, características da região UV do grupo naftol. Após 120 horas (FIGURA 4.5.3.), várias dessas estruturas desapareceram, permanecendo apenas uma banda em 265nm, indicando provavelmente a presença de β -naftol livre. Já a FIGURA 4.5.4. mostra a somatória dos sítios cromóforos com banda máximo em 511nm, tanto no controle (alta absorbância), como após 120 horas (baixa absorbância), (FIGURA 4.5.5.).

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

A FIGURA 4.5.6., como os demais corantes vermelhos, podemos verificar uma banda em torno de 3400cm^{-1} referente ao naftol. Após 120 horas de contato corante-biomassa, surge banda em 3250cm^{-1} e outra na região 3000cm^{-1} , característico da presença das aminas primárias livre, como também encontrada em 1650cm^{-1} e 1550cm^{-1} . Pode-se verificar também que na FIGURA 4.5.7. os espectros são muito semelhantes nas regiões em 3418, 1655 e 1560cm^{-1} , que podem ser atribuídas à quitina. Na região de 3400cm^{-1} , coincide também com a banda referente aos grupos fenol/naftol do corante tratado. Há também o surgimento de bandas na região de 3000cm^{-1} a 2800cm^{-1} , correspondente a presença de aminas primárias. Segundo DYER, (1969), as bandas encontradas entre 1600 e 1550cm^{-1} e em 1300 e 1160cm^{-1} indicam formação de compostos benzenos sulfonados, resultantes de modificações estruturais do corante residual, bem como, do corante aderido à parede celular.

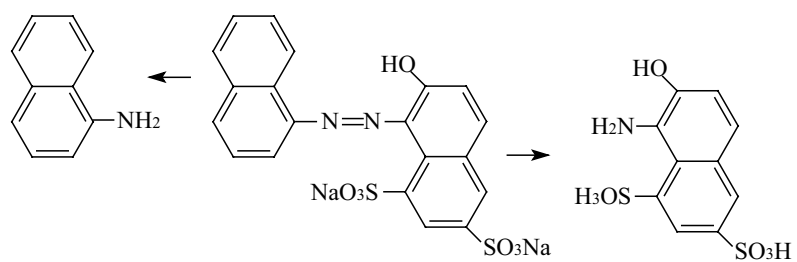


FIGURA 4.5.8. Corante “Acid Red 44”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

4.6. Espectro UV-Vis do corante "Acid Red 114" a diferentes valores de pH

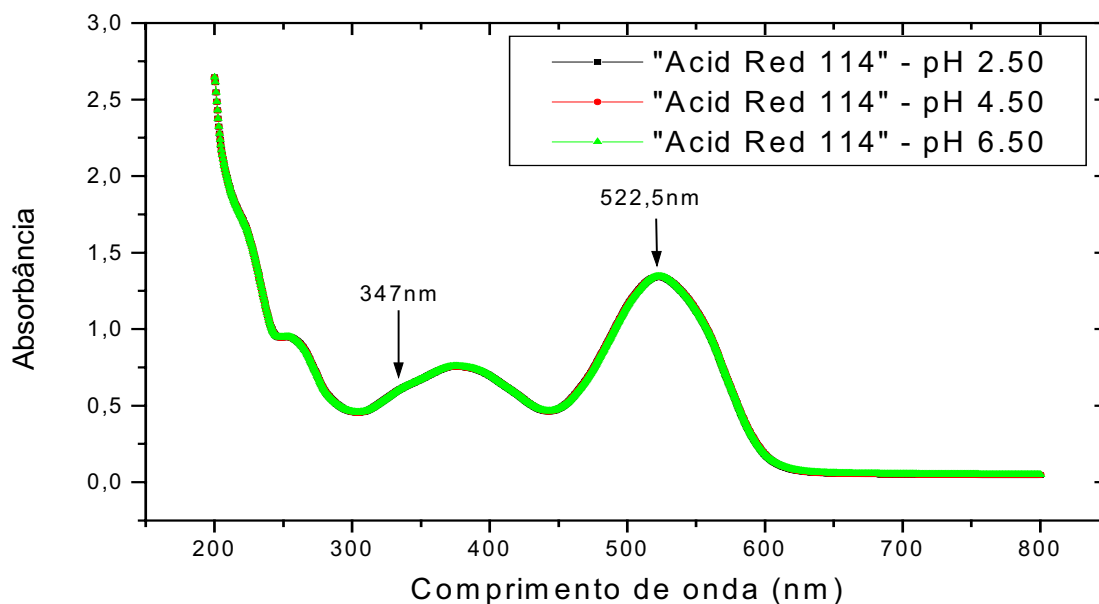


FIGURA 4.6.1. Varredura espectral do corante "Acid Red 114", nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100 μ g/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{522,5\text{nm}} = 0,02476684 + (0,008235 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99999

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{522,5\text{nm}} = 0,10322018 + (0,001109 \times \text{concentração do corante})$$

R= 0,99999

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{522,5\text{nm}} = 0,03520081 + (0,007710 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99998

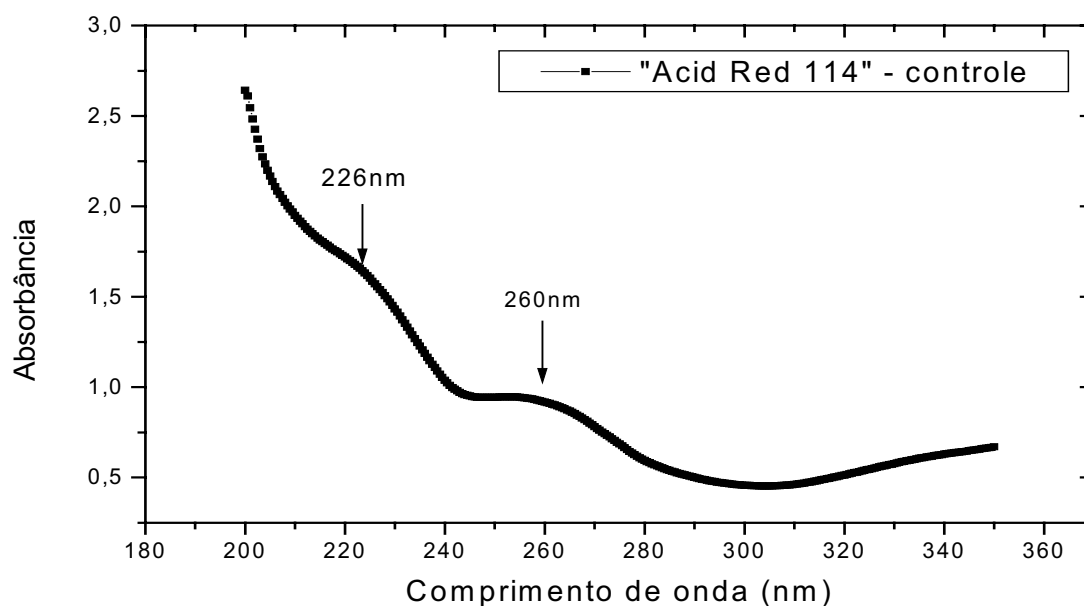
Análise em Espectro UV-Vis

FIGURA 4.6.2. Varredura espectral do corante "Acid Red 114" de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

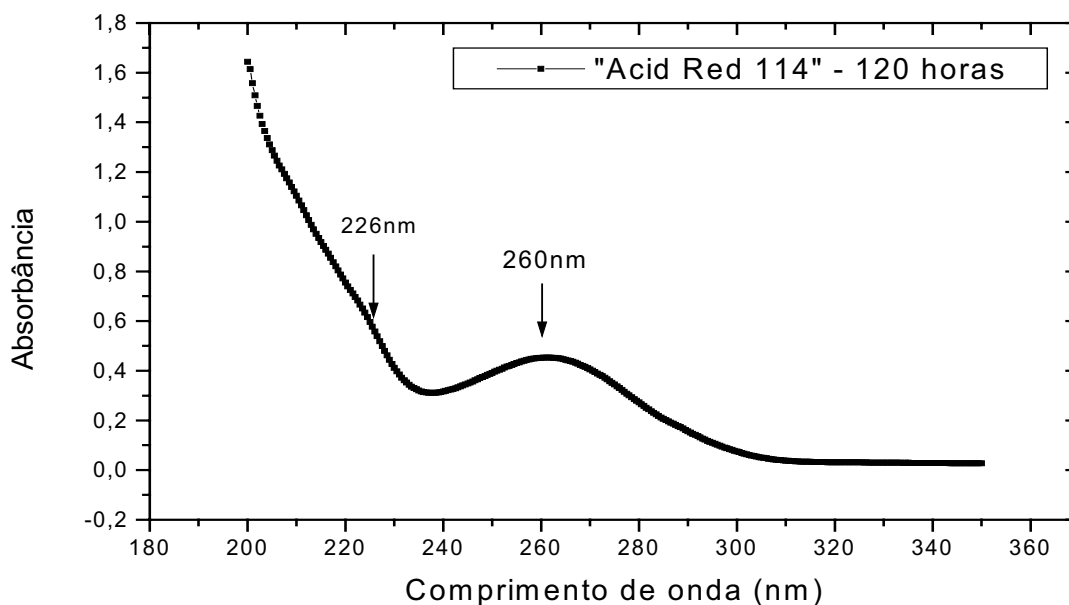


FIGURA 4.6.3. Varredura espectral do corante "Acid Red 114" de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

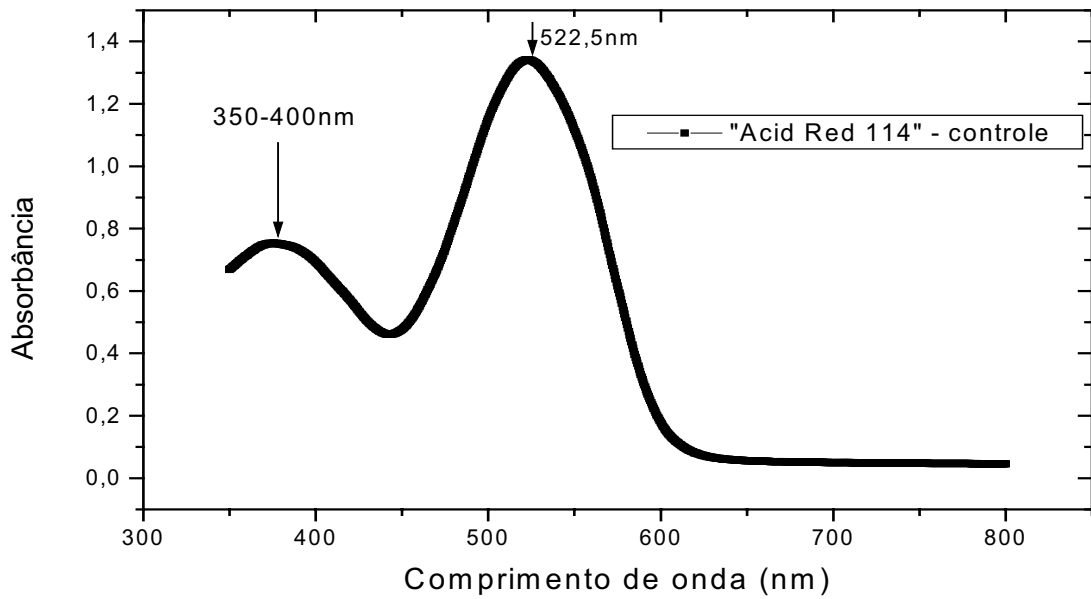


FIGURA 4.6.4. Varredura espectral do corante “Acid Red 114” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100µg/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

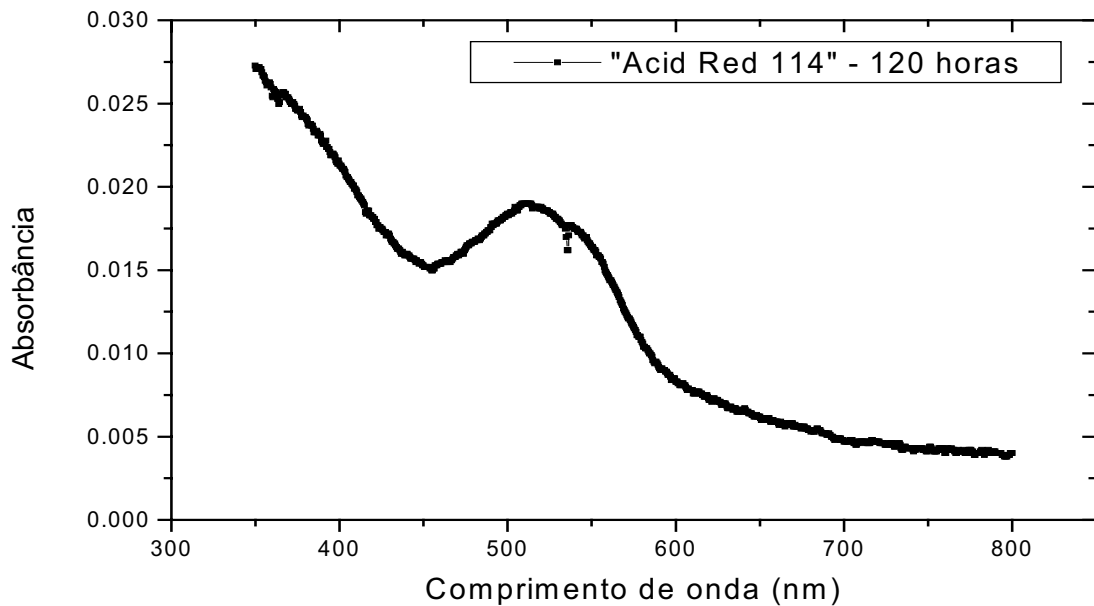


FIGURA 4.6.5. Varredura espectral do corante “Acid Red 114” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100µg/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

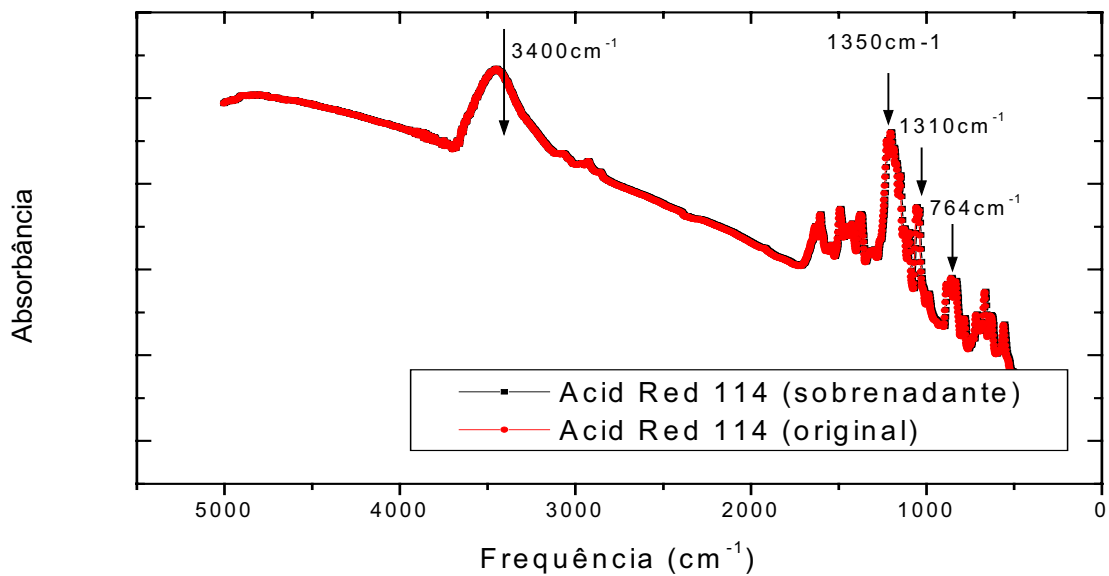


FIGURA 4.6.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} do corante “Acid Red 114” no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

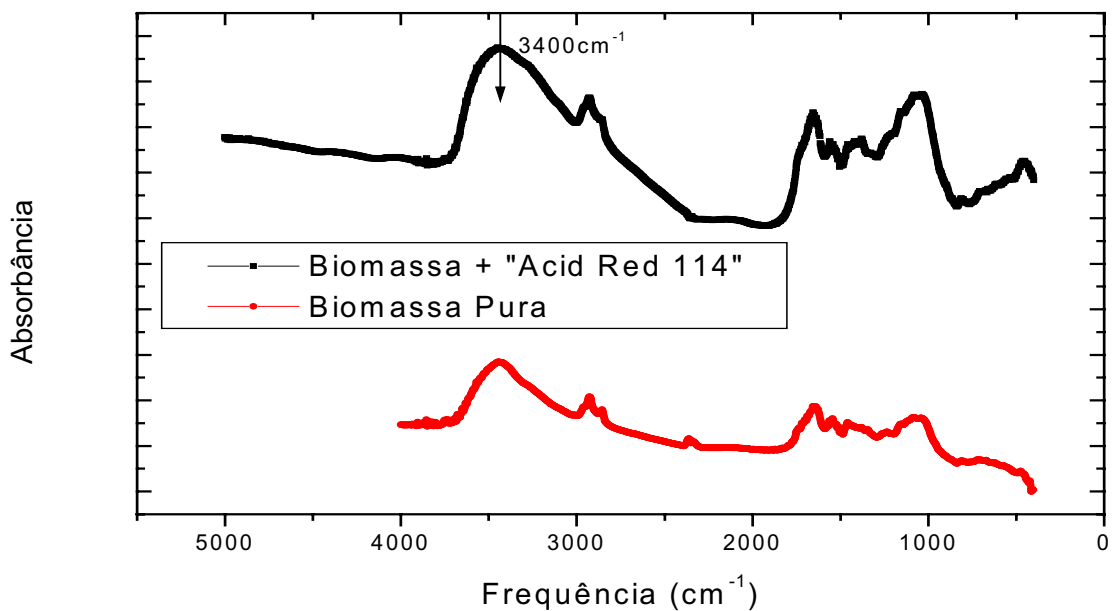


FIGURA 4.6.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante “Acid Red 114” por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

A FIGURA 4.6.1. revela que este corante também apresenta pH estável, segundo os espectros de absorvância.

Provavelmente, este corante seja um dos mais difíceis de biodegradação. A FIGURA 4.6.2. revela duas ondulações, com bandas na região em 226 e 260nm, referentes, provavelmente, ao naftol. A FIGURA 4.6.3. mostra ondulações na região entre 350 e 400nm, que conforme PASTO e JOHNSON, (1977), são das ligações diazo. A banda cromóforo deste corante está em 522,5nm. A região do UV após 120 horas (FIGURA 4.6.4.), permanece praticamente a mesma ondulação do controle, referentes ao naftol, apresentando apenas absorvância menor. O mesmo aconteceu na FIGURA 4.6.5.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

Quanto aos espectros de FTIR (FIGURA 4.6.6.), houve uma sobreposição dos espectros (controle – 120 horas), com banda na região de 3400cm^{-1} , devido provavelmente, ao naftol. Bandas nas regiões 1350 , 1310 e 764cm^{-1} , característicos, segundo PASTO e JOHNSON (1977), da parte do dibenzeno sulfônico deste corante. Na FIGURA 4.6.7. observou-se aumento da absorção sobre a biomassa com 120 horas, indicando presumivelmente uma situação característica de biosorção e não biodegradação. Modificações estruturais, se houveram, foram em pequenas proporções. A remoção ocorreu mais por biosorção.

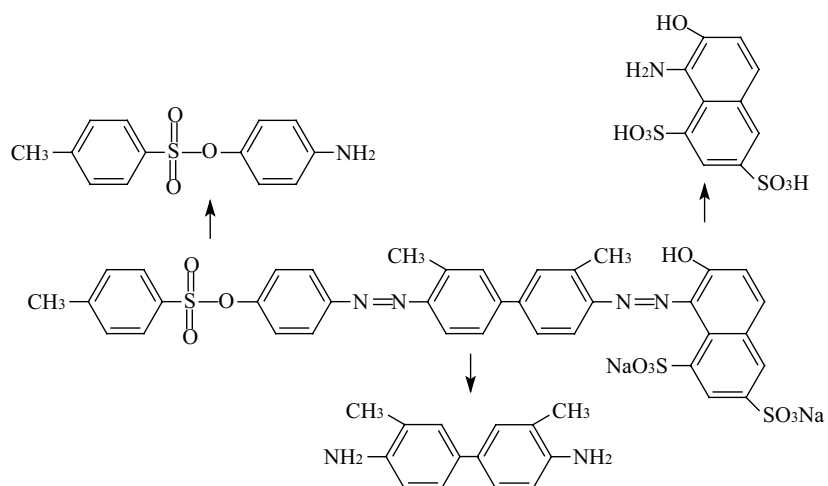


FIGURA 4.6.8. Corante “Acid Red 114”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

4.7. Espectro UV-Vis do corante "Acid Yellow 25" a diferentes valores de pH

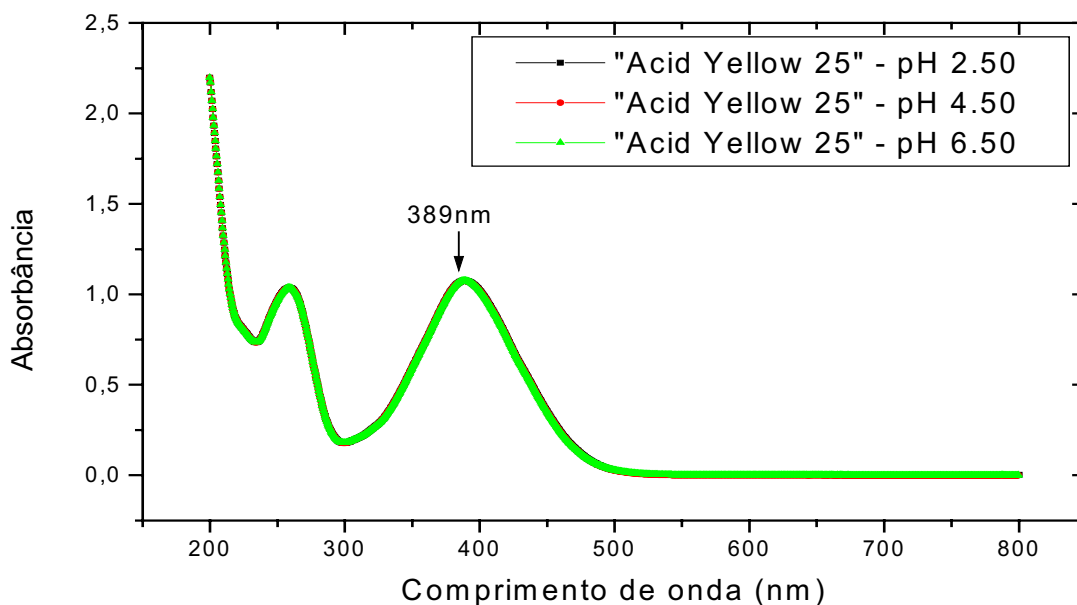


FIGURA 4.7.1. Varredura espectral do corante "Acid Yellow 25", nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100µg/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{389\text{nm}} = 0,07430 + (0,01112 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99999

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{389\text{nm}} = -0,12990 + (0,00873 \times \text{concentração do corante})$$

R= 0,99999

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{389\text{nm}} = -1,242455 + (0,0045 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99998

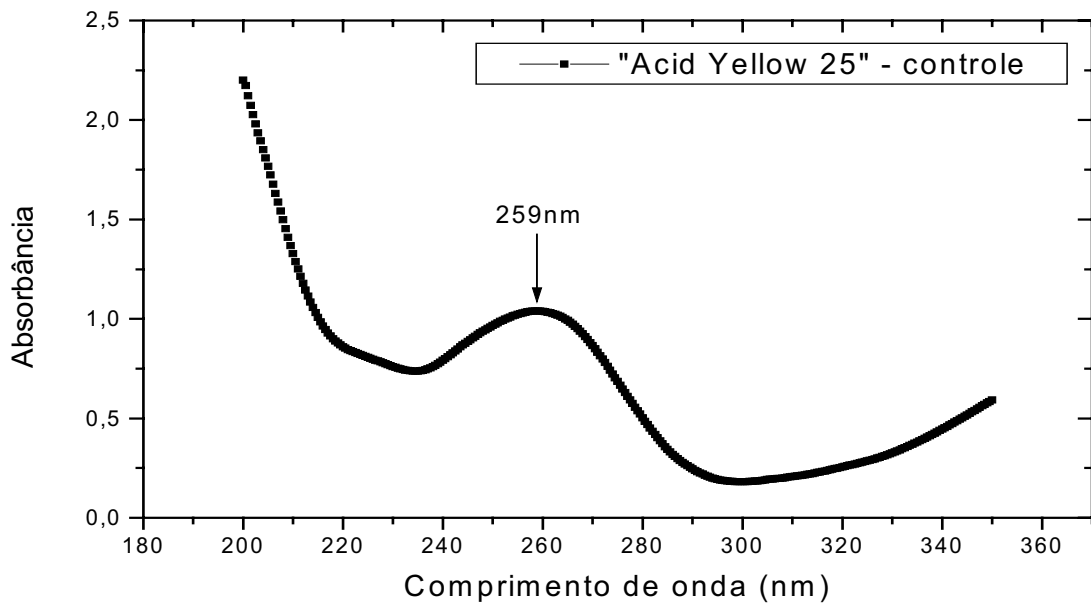
Análise em Espectro UV-Vis

FIGURA 4.7.2. Varredura espectral do corante "Acid Yellow 25" de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartz; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

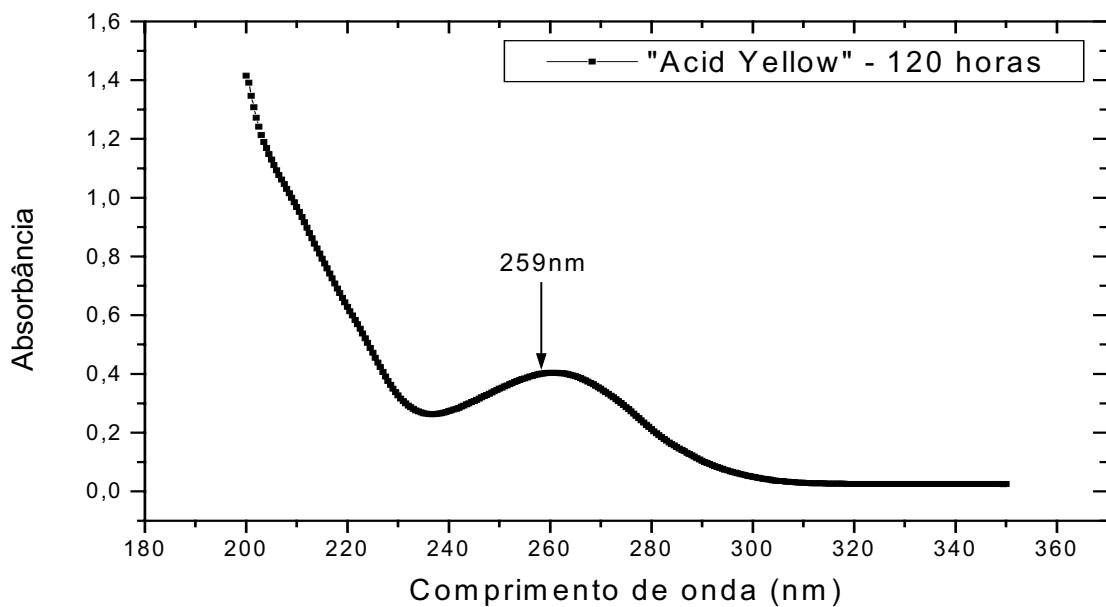


FIGURA 4.7.3. Varredura espectral do corante "Acid Yellow 25" de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartz; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

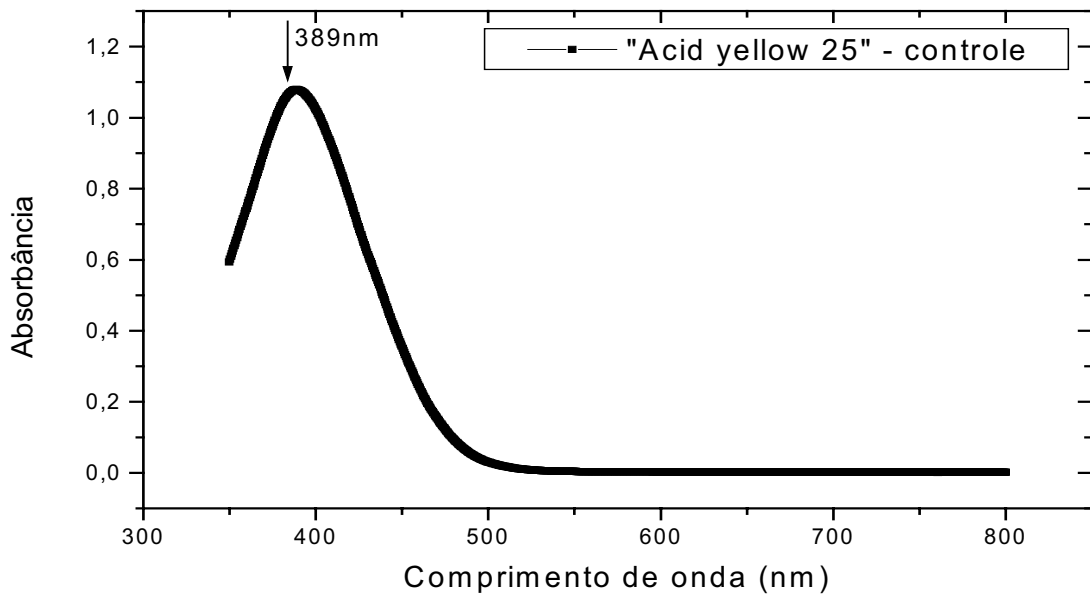


FIGURA 4.7.4. Varredura espectral do corante “Acid Yellow 25” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

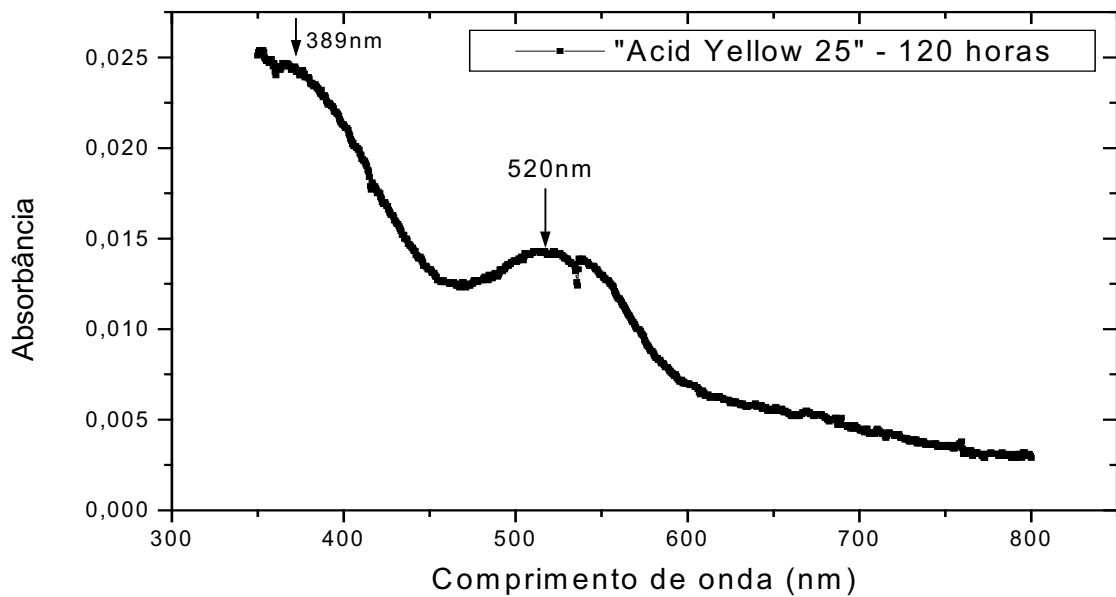


FIGURA 4.7.5. Varredura espectral do corante “Acid Yellow 25” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

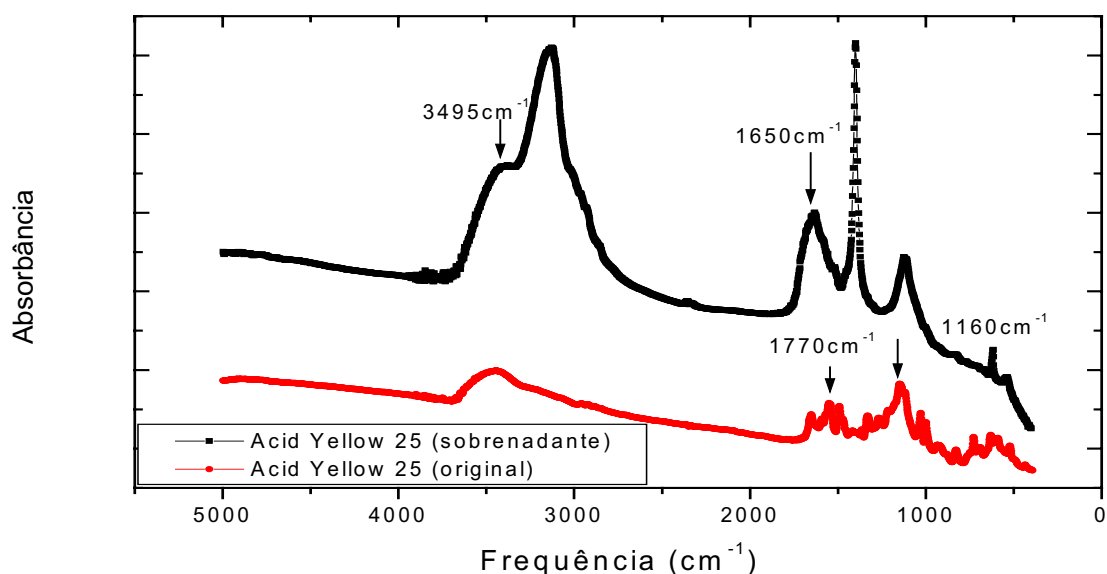


FIGURA 4.7.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} do corante "Acid Yellow 25" no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

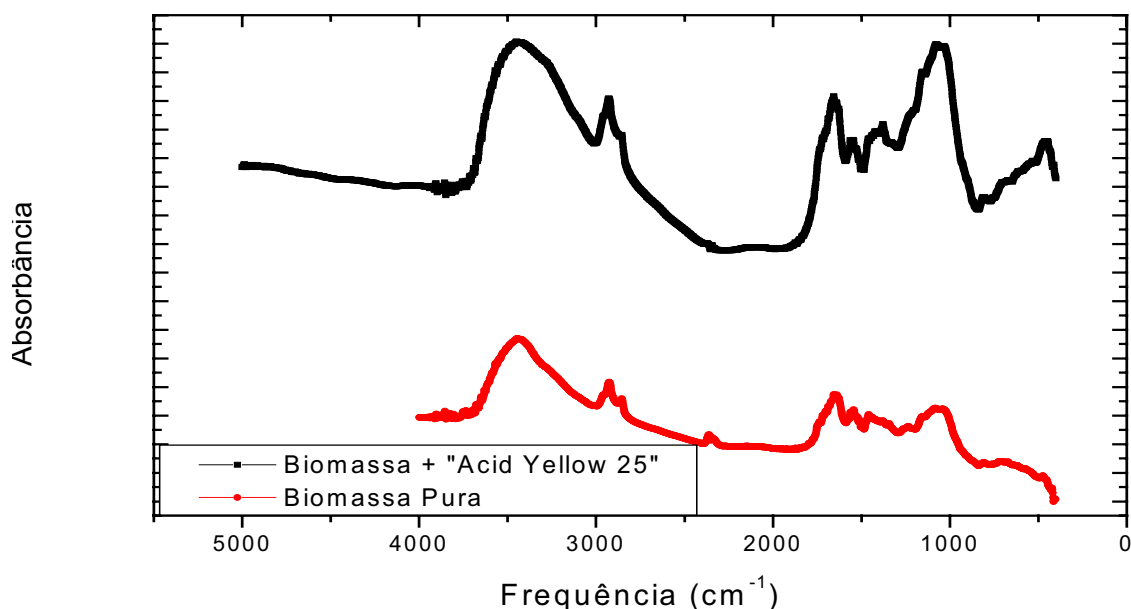


FIGURA 4.7.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante "Acid Yellow 25" por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

Na FIGURA 4.7.1. observamos que este corante apresenta valores de pH estável.

Na FIGURA 4.7.2. encontra-se banda de absorção em torno de 258-259nm, provavelmente, devido à presença do imidazol (SILVERSTEIN et al., 1987). O mesmo ocorreu na FIGURA 4.7.3. após 120 horas. Os sítios cromóforos indicaram banda em 389nm (FIGURA 4.7.4), sendo que após 120 horas de contato (FIGURA 4.7.5), houve grande remoção deste corante no sobrenadante e aparecimento de mais de uma banda em 520nm.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

A FIGURA 4.7.6. pode-se verificar, segundo DYER (1969), uma banda entre 3550cm^{-1} e 3450cm^{-1} , típica das hidroxilas associadas ao imidazol, a qual está no espectro do corante controle e também no corante residual após 120 horas de contato. No controle encontraram-se também bandas na região de 1770cm^{-1} a 1500cm^{-1} , responsável pela presença de anéis de imidas cíclicas. Em 1160cm^{-1} indica banda responsável pela ramificação benzeno sulfônico. No sobrenadante pode-se verificar a presença de banda em 3250cm^{-1} e 1650cm^{-1} característica das aminas primárias. Pode-se verificar também que na FIGURA 4.7.7. os espectros são muito semelhantes nas regiões em 3418 , 1655 e 1560cm^{-1} , que podem ser atribuídas à quitina. Na faixa de 3550 e 3450cm^{-1} , coincide com a faixa referente às hidroxilas associadas ao imidazol do corante tratado. Há também o surgimento de bandas na região de 3000cm^{-1} a 2800cm^{-1} , correspondente a presença de aminas primárias. Segundo SILVERSTEIN et al., (1987), as bandas encontradas entre 1600 e 1550cm^{-1} e em 1300 e 1160cm^{-1} indicam a presença de hidroxilas associadas ao imidazol, resultantes de modificações estruturais do corante residual, bem como, do corante aderido a parede celular (FIGURA 4.7.7.).

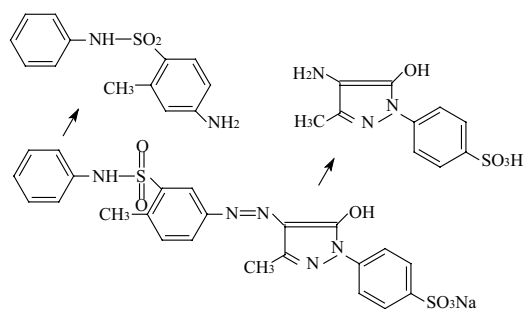


FIGURA 4.7.8. Corante “Acid Yellow 25”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

4.8. Espectro UV-Vis do corante "Direct Violet 51" a diferentes valores de pH

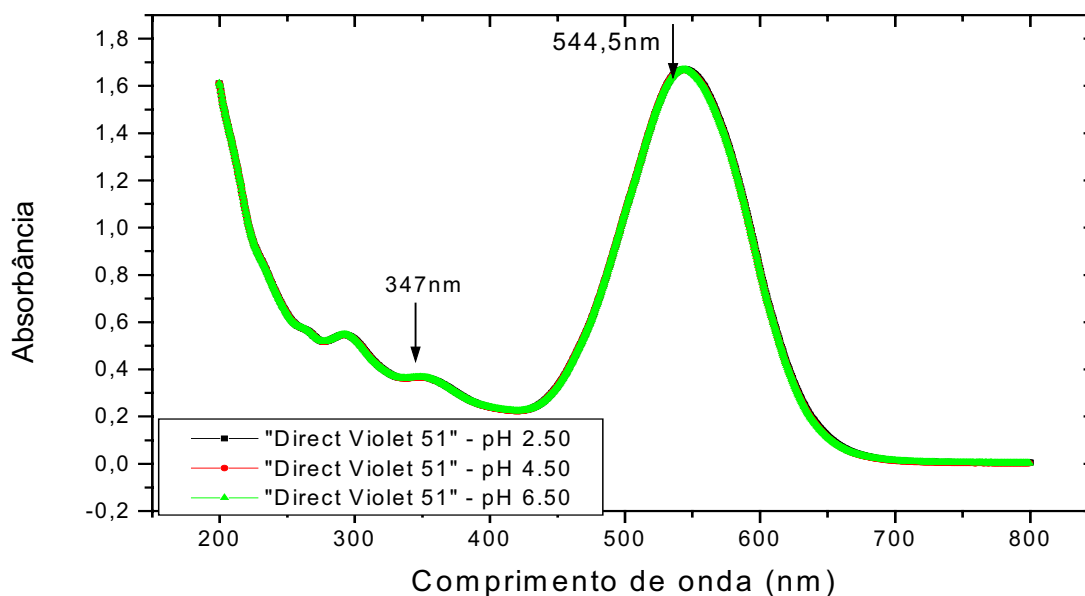


FIGURA 4.8.1. Varredura espectral do corante "Direct Violet 51", nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100µg/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{544,5\text{nm}} = 0,0185 + (0,0179 \times \text{concentração corante})$$

$$R = 0,99998$$

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{616\text{nm}} = 0,00075 + (0,01231 \times \text{concentração corante})$$

$$R = 0,99997$$

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{616\text{nm}} = 0,01963 + (0,0170 \times \text{concentração corante})$$

$$R = 0,99995$$

Análise em Espectro UV-Vis

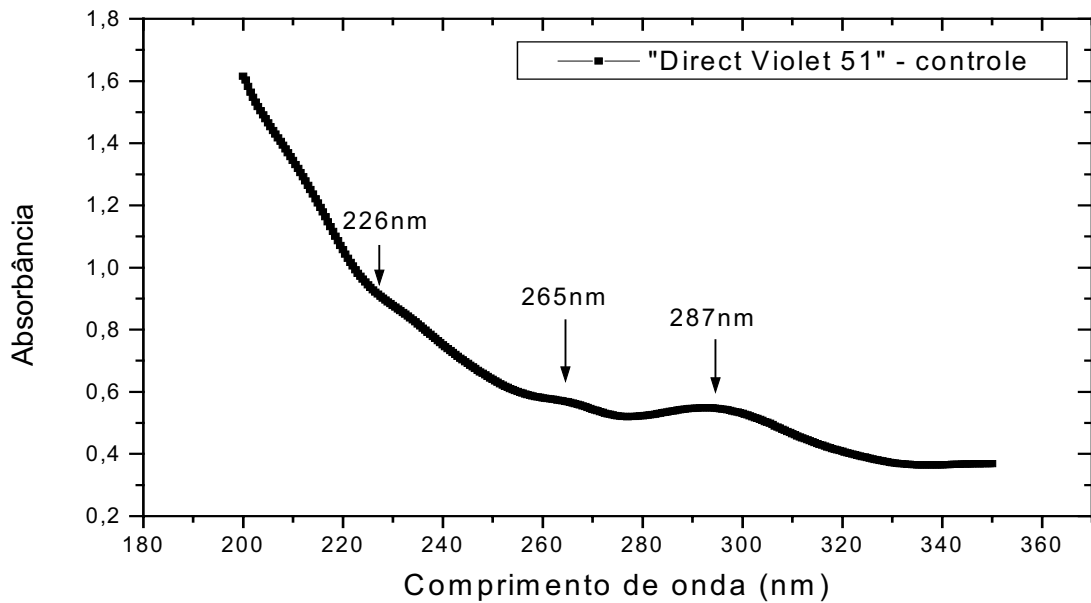


FIGURA 4.8.2. Varredura espectral do corante “Direct Violet 51” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100µg/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

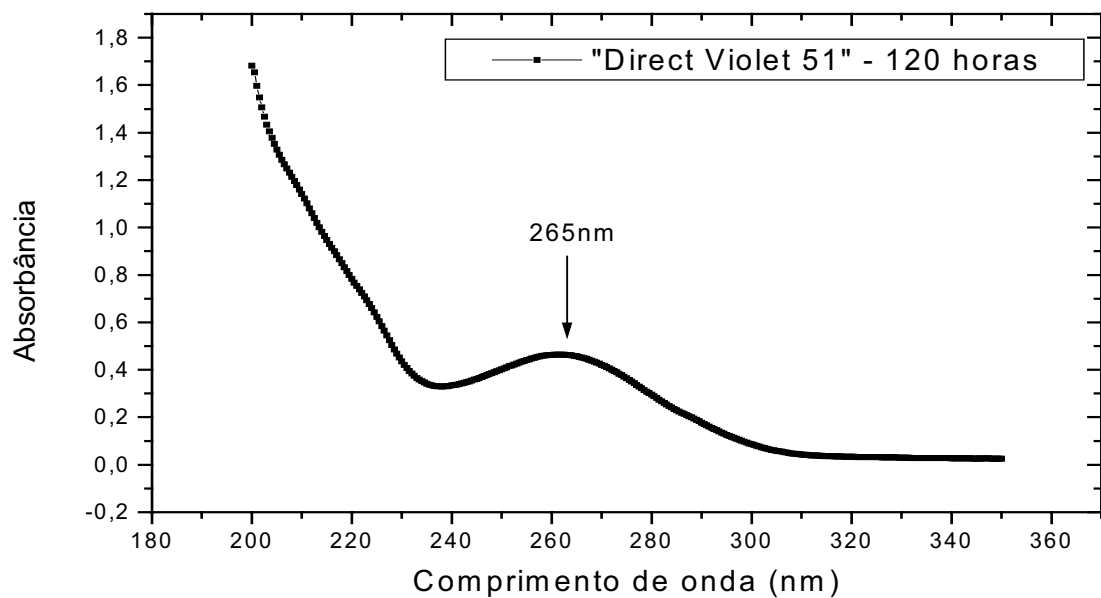


FIGURA 4.8.3. Varredura espectral do corante “Direct Violet 51” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100µg/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

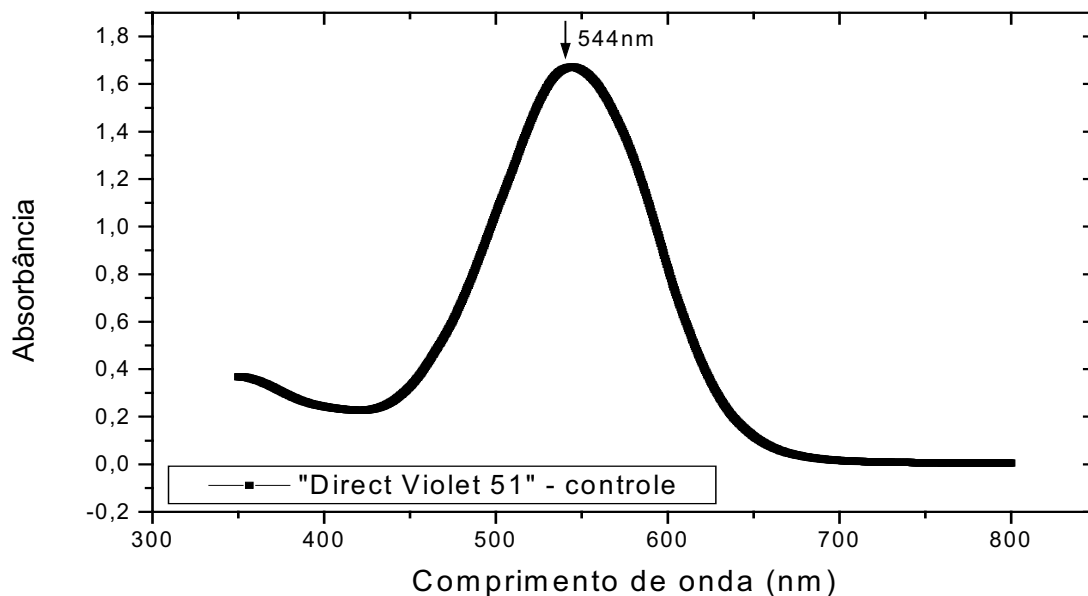


FIGURA 4.8.4. Varredura espectral do corante “Direct Violet 51” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

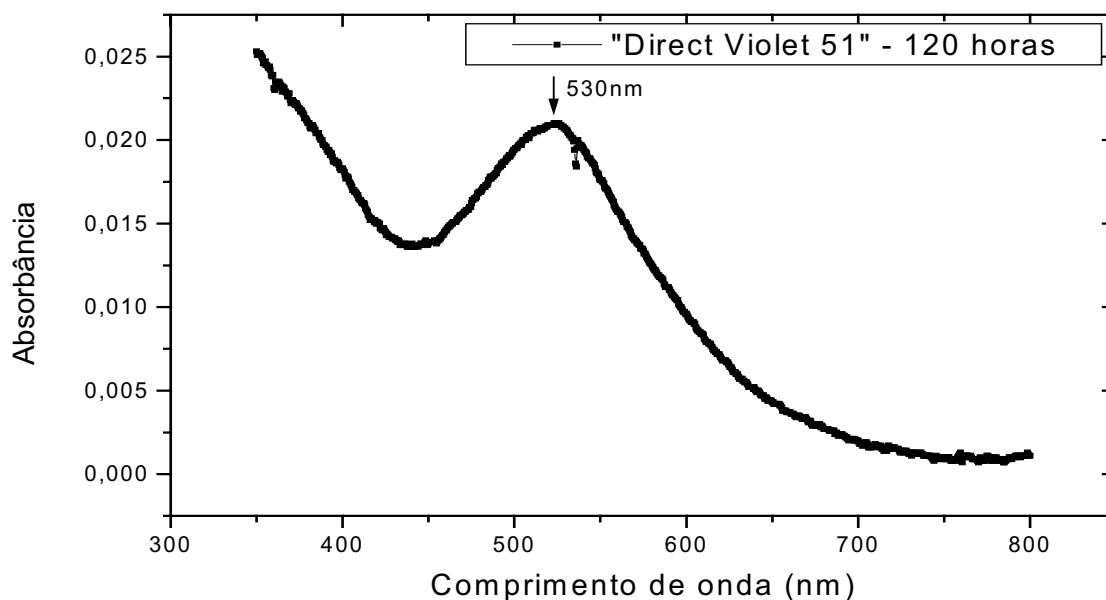


FIGURA 4.8.5. Varredura espectral do corante “Direct Violet 51” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

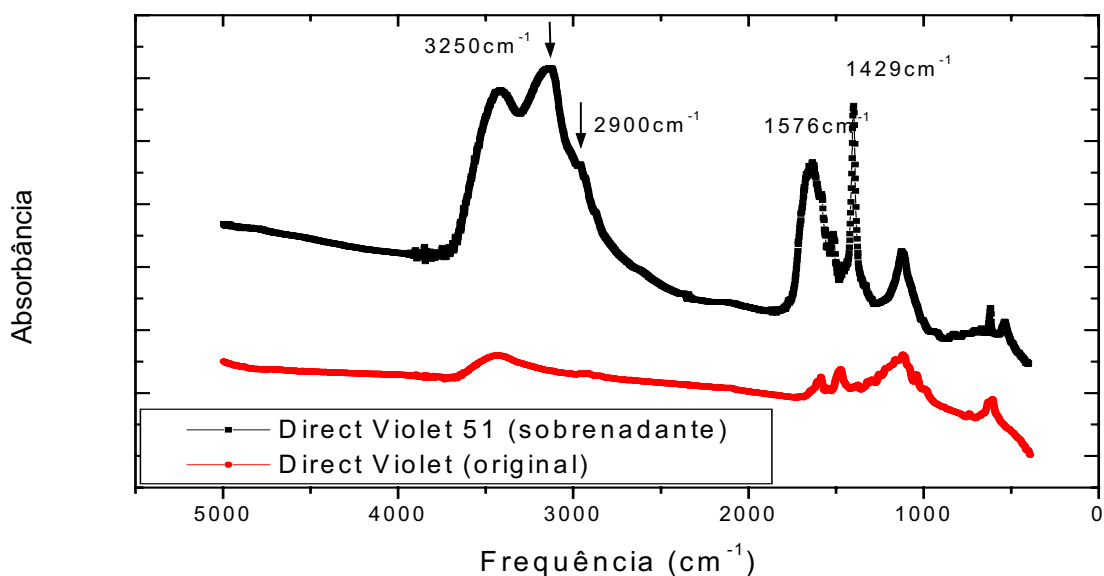


FIGURA 4.8.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} do corante “Direct Violet 51” no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

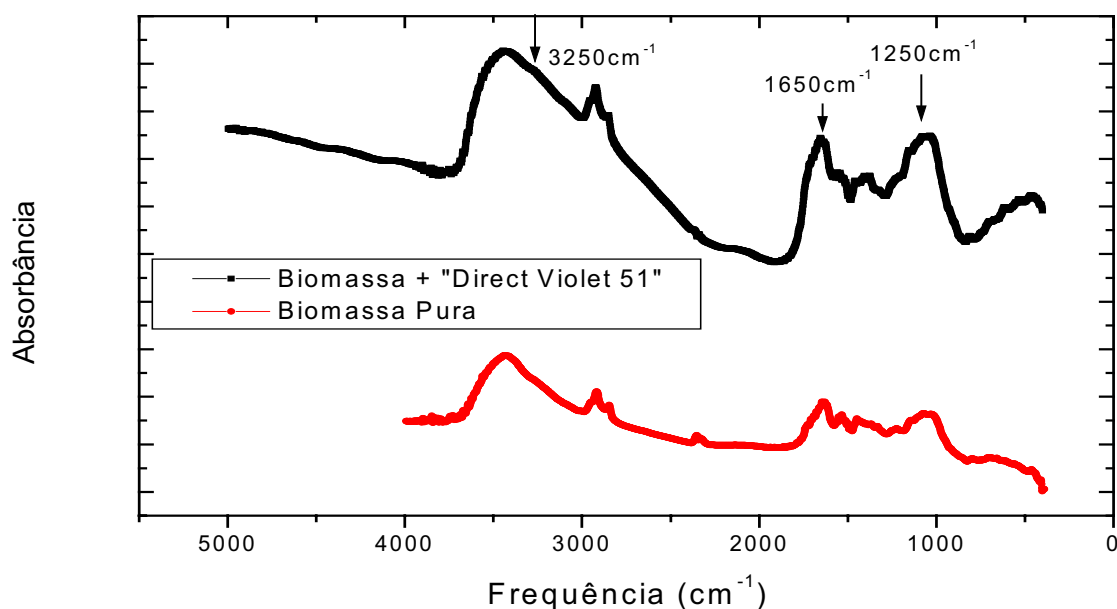


FIGURA 4.8.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante “Direct Violet 51” por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

FIGURA 4.8.1. revela pH estável para este corante, a partir dos espectros de absorvância.

No espectro de UV do corante controle (FIGURA 4.8.2.), podem-se verificar a existência de bandas em 226 e 265nm, característicos do naftol. Entre 226 e 290nm encontrou-se banda referente ao metil oxi benzeno (PASTO e JOHNSON, 1977). A FIGURA 4.8.4. mostra banda cromóforo a 544nm. A partir de 120 horas de contato (FIGURA 4.8.3.), constatou-se uma região de banda em 265nm, neste caso, típico de amino/ naftol livre. Na FIGURA 4.8.5. observou-se que quase todo o corante foi removido, com absorvância próxima a zero, com deslocamento do comprimento de onda máxima para 530nm.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

Nos espectros de FTIR, o corante controle (FIGURA 4.8.6.), indicou uma banda entre 3300, 3400 cm^{-1} , e em 675 cm^{-1} , característicos da presença de fenol/ naftol, existem também bandas em 1576 cm^{-1} e 1429 cm^{-1} , típicas das ligações azobenzeno. Após o contato de 120 horas, verificou-se o aparecimento de uma banda em 3250 cm^{-1} e outra em 2900 cm^{-1} , resultando do surgimento de aminas primárias. Duas outras bandas, uma em 1650 cm^{-1} e outra em 1200 cm^{-1} , também característico da existência de aminas primárias livres. O mesmo pode-se observar na FIGURA 4.8.7., com ampliação da banda de 3250 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} , devido à presença de aminas primárias.

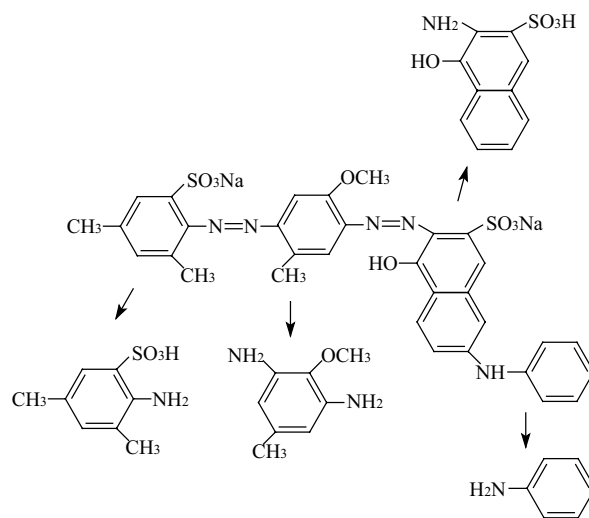


FIGURA 4.8.8. Corante “Direct Violet 51”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

4.9. Espectro UV-Vis do corante "Acid Red 151" a diferentes valores de pH

Os corantes descritos a partir deste, sofreram análises mais detalhadas e específicas, abordando detalhes científicos mais explicativos e completos.

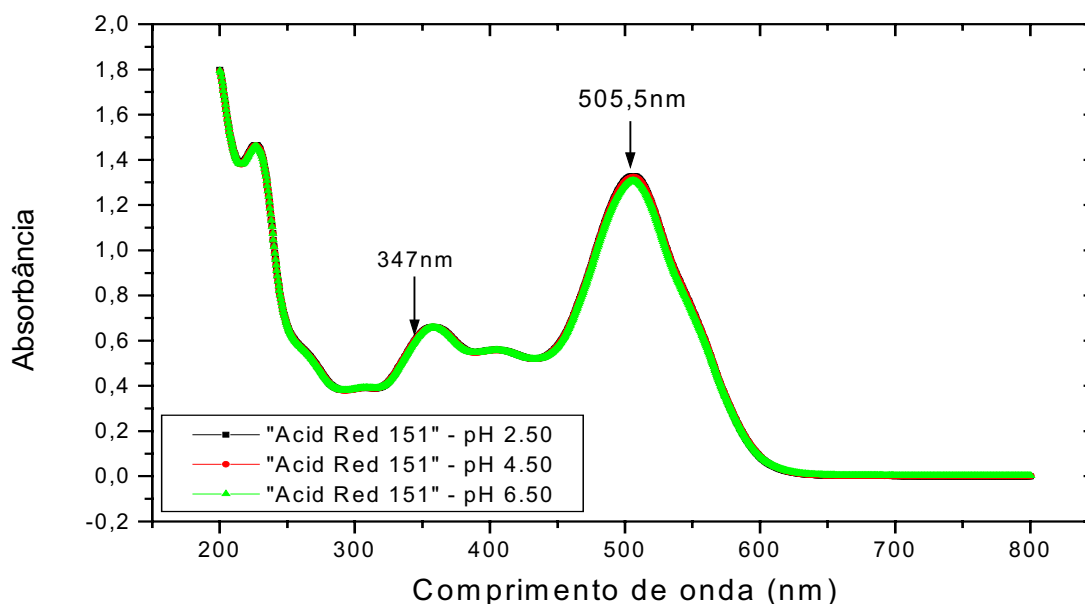


FIGURA 4.9.1. Varredura espectral do corante "Acid Red 151", nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100µg/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{505,5\text{nm}} = -0,00157 + (0,01119 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99999

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{505,5\text{nm}} = 0,0082 + (0,01117 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99991

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{505,5\text{nm}} = 3\text{E-}04 + (0,01157 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99993

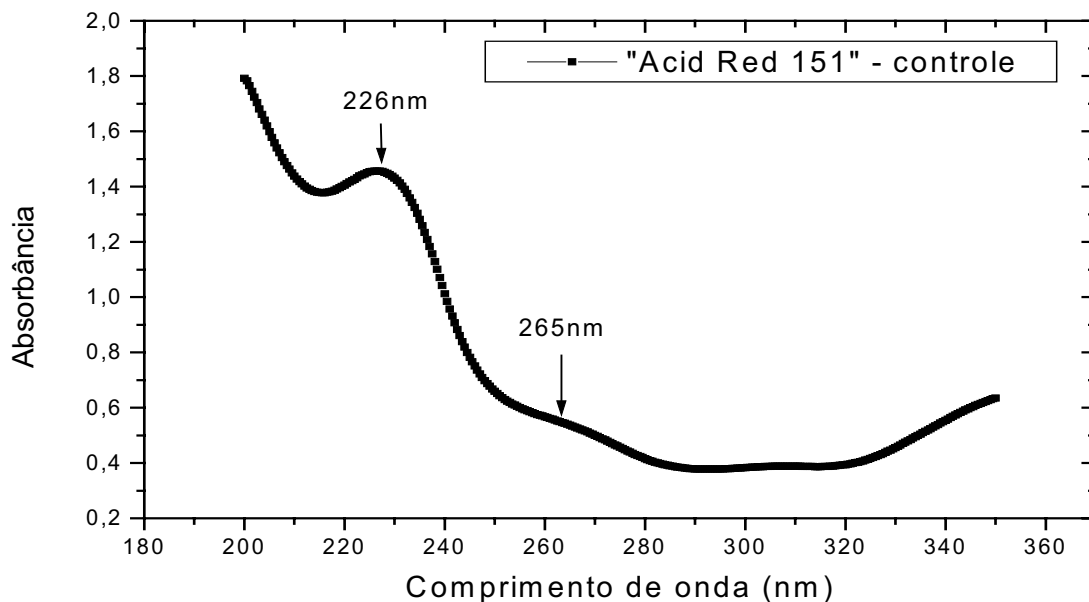
Análise em Espectro UV-Vis

FIGURA 4.9.2. Varredura espectral do corante "Acid Red 151" de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

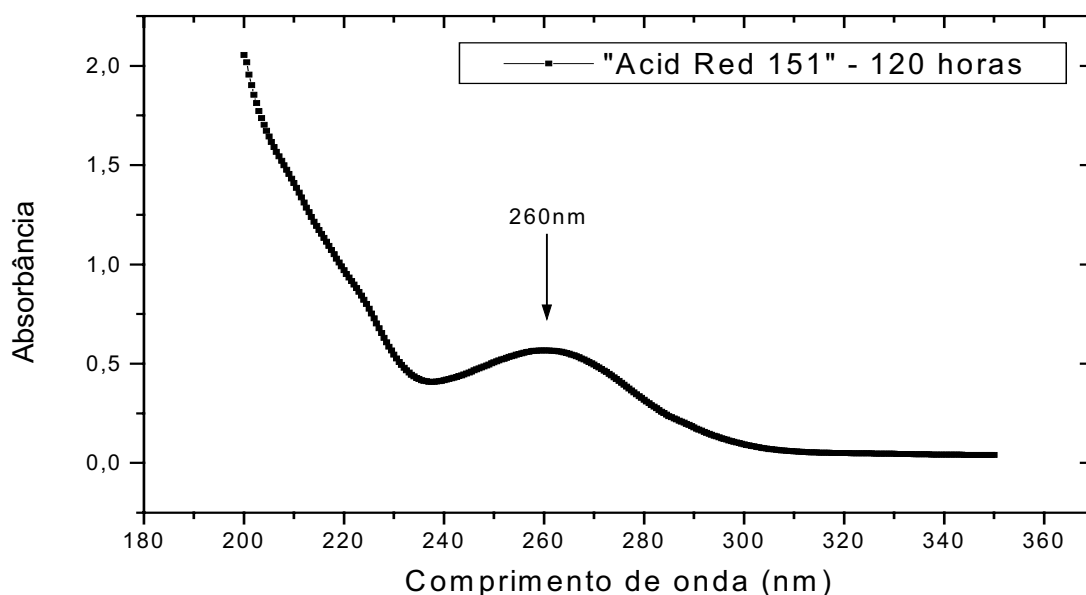


FIGURA 4.9.3. Varredura espectral do corante "Acid Red 151" de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

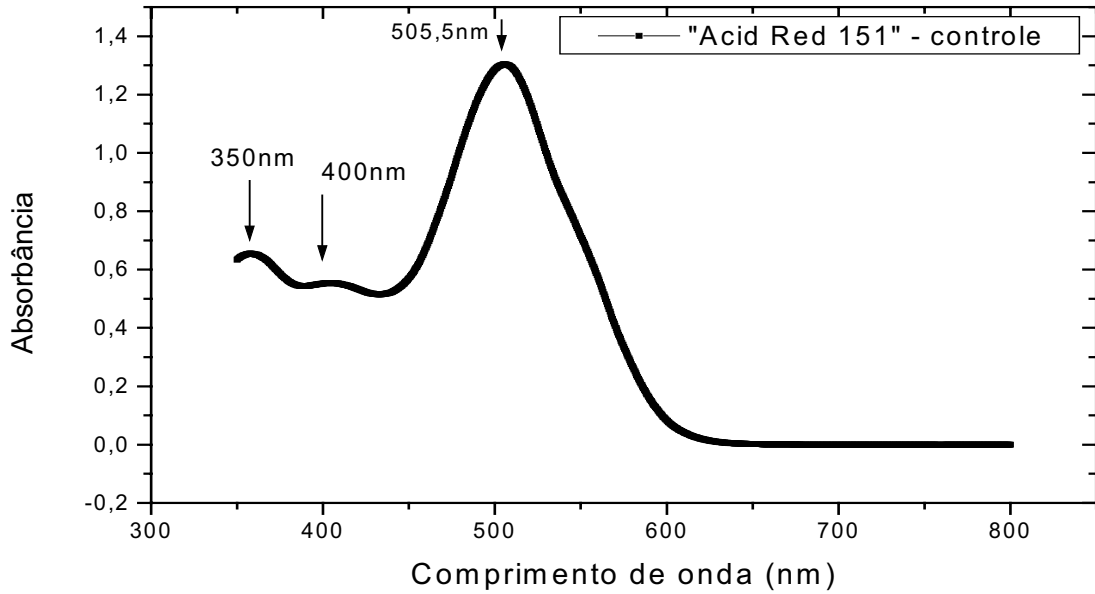


FIGURA 4.9.4. Varredura espectral do corante “Acid Red 151” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100µg/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

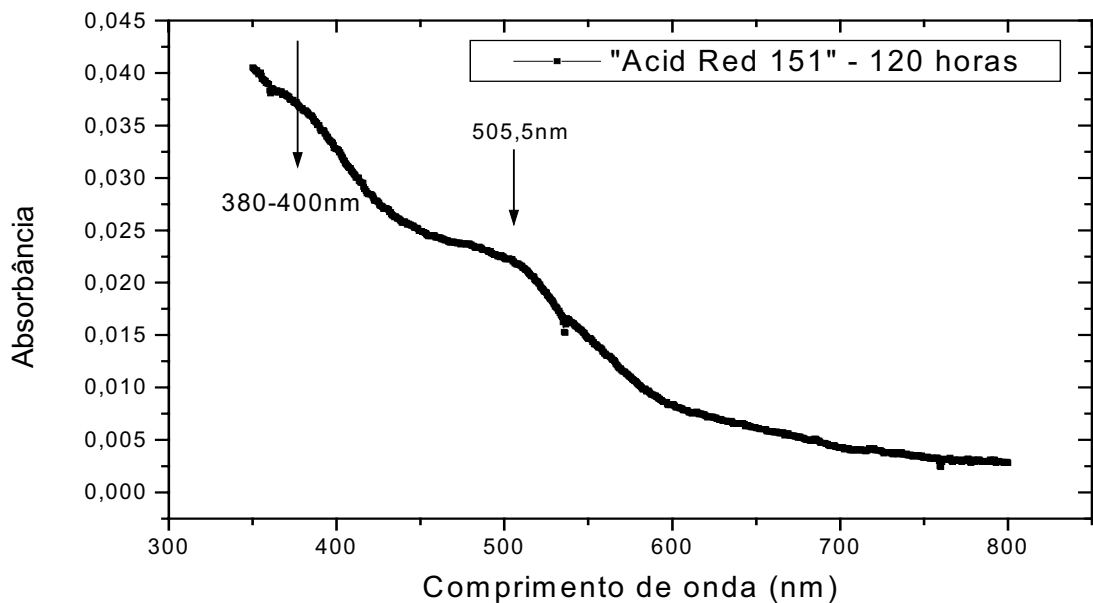


FIGURA 4.9.5. Varredura espectral do corante “Acid Red 151” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100µg/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

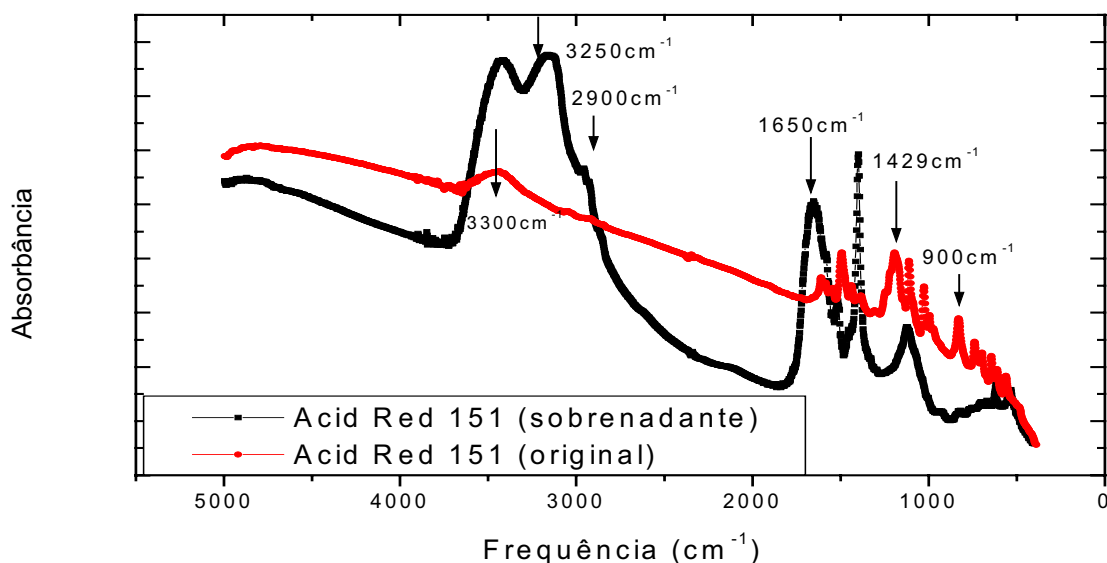


FIGURA 4.9.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} do corante “Acid Red 151” no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

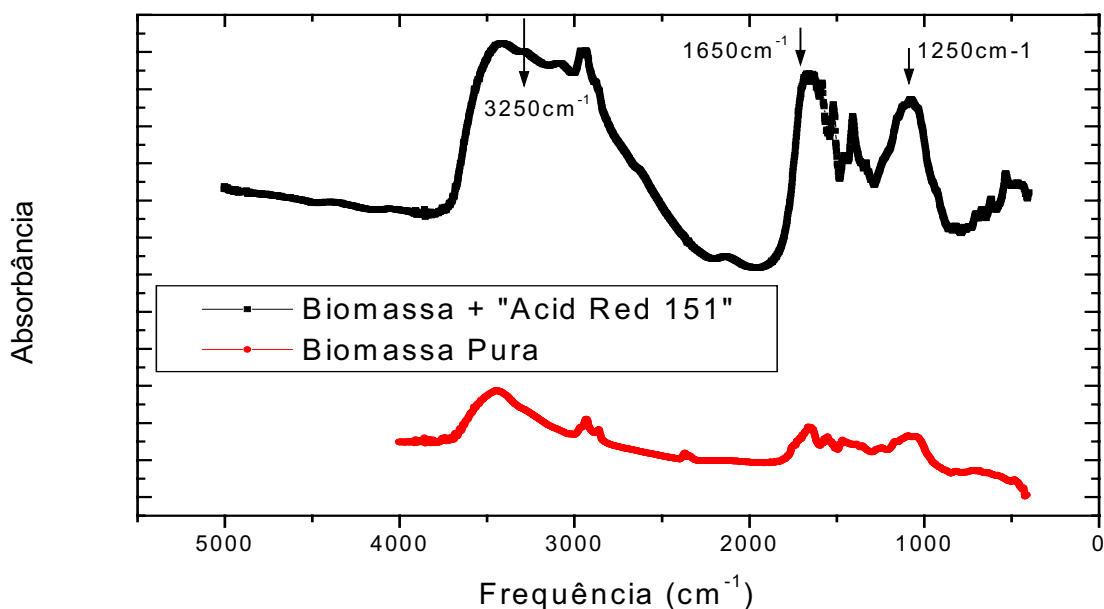


FIGURA 4.9.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante “Acid Red 151” por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

FIGURA 4.9.1. revela que como os demais corantes, este apresenta pH estável, segundo os espectros de absorvância.

A FIGURA 4.9.2. mostra a região do UV, do corante controle, onde se observou a existência de bandas de absorvância em 226 e 265nm, característico do naftol, INDEX MERCK (1976) Já a FIGURA 4.9.4. revela ondulações em 350 e 400nm, que de acordo com PASTO e JOHNSON, (1977), trata-se da presença de ligações diazo, do referido corante, que possui banda cromóforo em 505,5nm (FIGURA 4.9.4.). A partir da interação de 120 horas (FIGURA 4.9.3.), encontrou-se uma banda em 260nm, característico da presença de amino/ naftol livre. Na FIGURA 4.9.5. comprovou-se que quase todo o corante foi removido, com absorvância próxima a zero.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

Os espectros de FTIR do corante controle (FIGURA 4.9.6.) indicaram banda entre 3300 e 3400 cm^{-1} , característico do fenol/ naftol, em 1576 cm^{-1} e 1429 cm^{-1} visualizam-se bandas típicas (SILVERSTEIN et al., 1987), das ligações azobenzeno. Também ocorre banda em 900 cm^{-1} pela presença do naftol. Após as 120 horas de contato, constatou-se o aparecimento de bandas em 3250 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} característico do surgimento de aminas primárias. Outras duas bandas pode-se encontrar em 1650 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} , também típicas da existência de aminas primárias livres. O mesmo podem ser encontradas na FIGURA 4.9.7., com ampliação da banda de 3250 e 3000 cm^{-1} , em 1650 e 1250 cm^{-1} , devido à presença das aminas primárias.

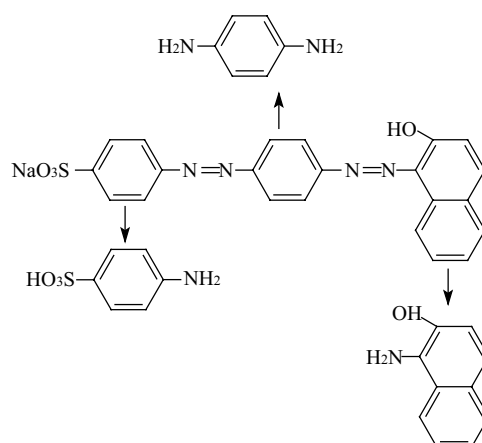


FIGURA 4.9.8. Corante “Acid Red 151”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

TESTE DE BIOSORTIVIDADE DO CORANTE “ACID RED 151” EM DIFERENTES VALORES DE pH

Este estudo avalia a capacidade biosortiva do fungo *Neurospora crassa* 74A, frente à interação com cada corante avaliado. A partir dos resultados apresentados, pode-se confirmar qual o pH de melhor biosorção, sugerindo então, as melhores condições de aplicação dos demais testes realizados.

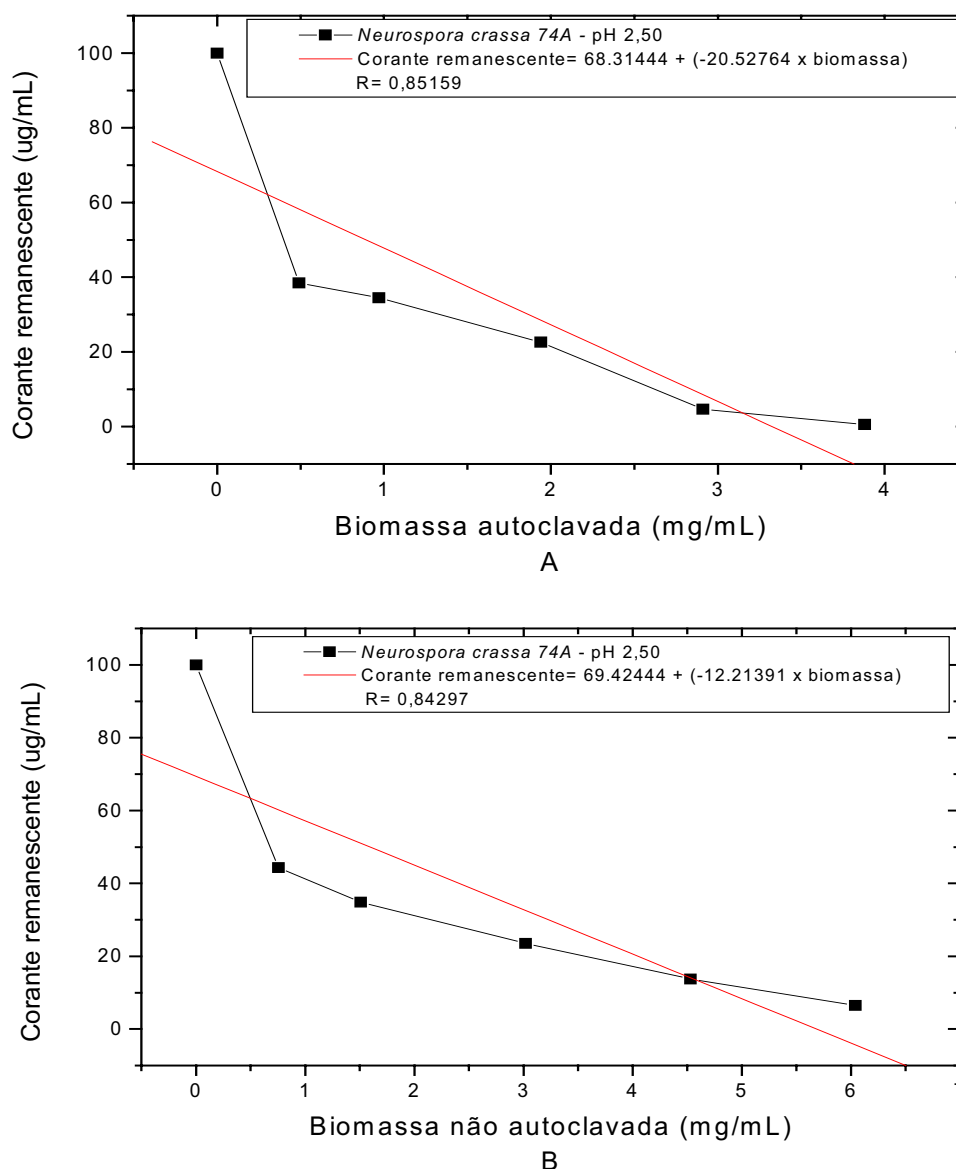


FIGURA 4.9.9. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante “Acid Red 151” (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 2,50; 30°C; 120 minutos de contato. Estimativa da quantidade de biomassa necessária para se conseguir a remoção total do corante= (A) autoclavada: 3,327mg/mL; (B) não autoclavada: 5,684mg/mL.

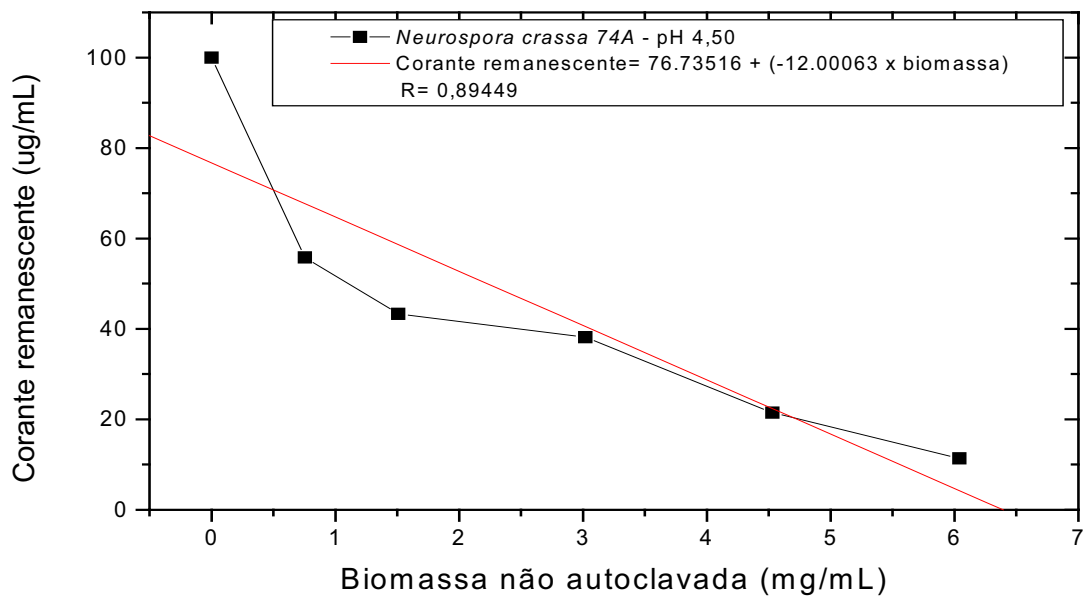
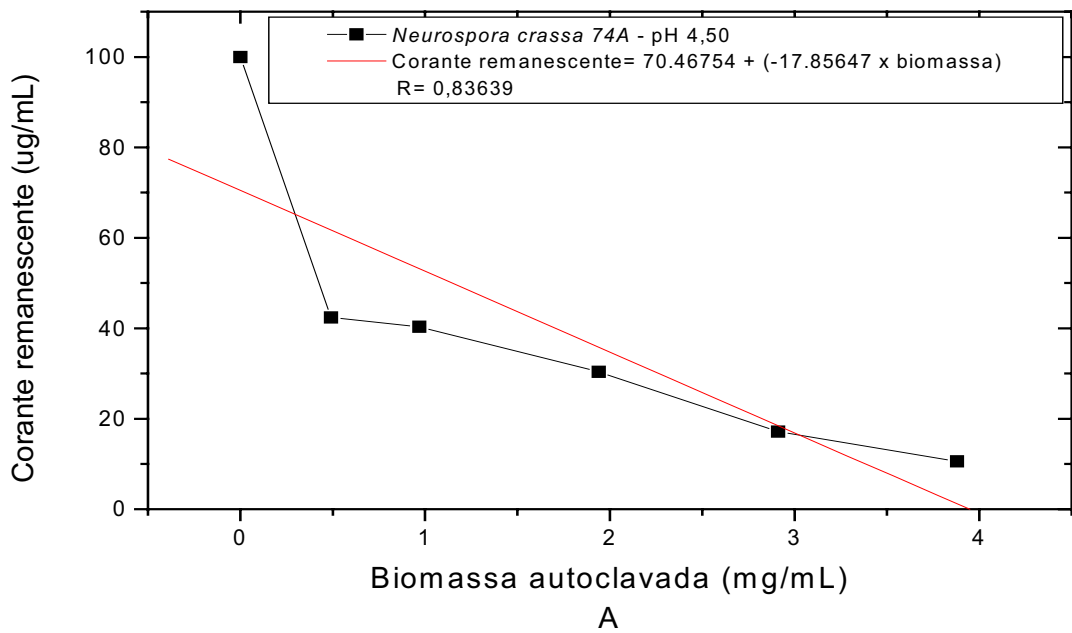


FIGURA 4.9.10. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante “Acid Red 151” (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 4,50; 30°C; 120 minutos de contato. Estimativa da quantidade de biomassa necessária para se conseguir a remoção total do corante= (A) autoclavada: 3,946mg/mL; (B) não autoclavada: 6,394mg/mL.

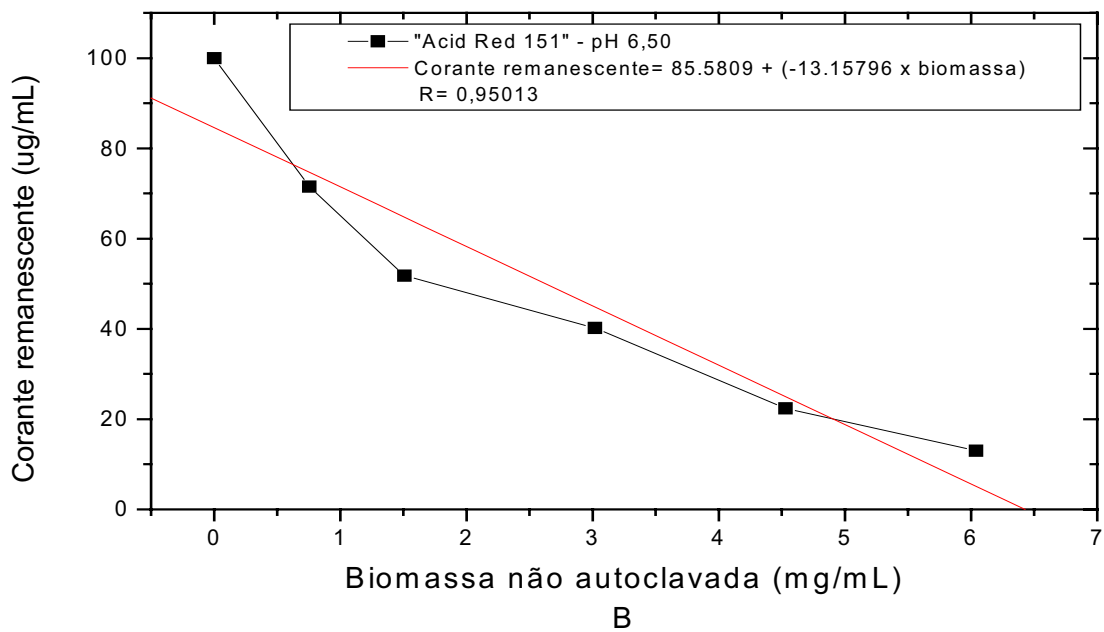
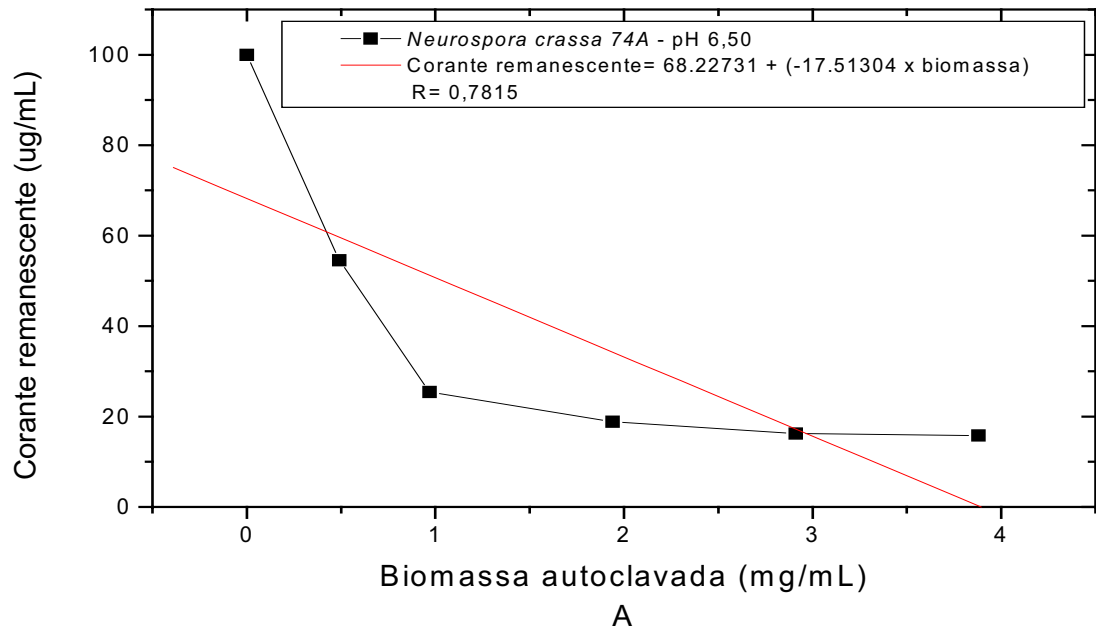


FIGURA 4.9.11. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante "Acid Red 151" (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 6,50; 30°C; 120 minutos de contato. Estimativa da quantidade de biomassa necessária para se conseguir a remoção total do corante= (A) autoclavada: 3,943mg/mL; (B) não autoclavada: 6,504mg/mL.

Os testes de biosorção em diferentes valores de pH do corante “Acid Red 151” na concentração inicial de 100µg/mL e o fungo *Neurospora crassa* 74A, autoclavada e não autoclavada, indicaram que o meio mais ácido é mais eficaz na remoção do corante em solução aquosa, e que a biomassa autoclavada funciona como melhor substrato, do que a biomassa viva, no tempo de contato de 120 minutos. Conforme as estimativas das quantidades de biomassas necessárias para promover a remoção total dos corantes avaliados, nos valores de pH 2,50; 4,50 e 6,50. Estes resultados estão indicados nas (FIGURAS 4.9.9., 4.9.10., 4.9.11.),

CORSO, (1998), relata que os fungos autoclavados apresentam melhor mecanismo de remoção do corante em solução aquosa. Já as células fúngicas vivas agem como se o corante fosse um corpo estranho e que necessita ser removido, através de sistemas enzimáticos, os quais dificultariam os sítios adsortivos a receberem as moléculas do corante. Por outro lado, no momento em que ocorre autoclavagem, estes sistemas enzimáticos cessam, e as células se tornam um substrato mais propício à aproximação de moléculas estranhas.

TESTE DE BIOSORTIVIDADE DO CORANTE “ACID RED 151” SEGUNDO AS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE FREUNDLICH LANGMUIR

A aplicação destas isotermas de adsorção permite confirmar o tipo de interação que ocorreu entre a biomassa e o corante estudado. Cálculos matemáticos puderam ser atribuídos para determinar se ocorreu interação entre monocamadas ou multicamadas, favorecendo assim, a compreensão do grau e tipo de concordância entre o adsorbato e o adsorvente.

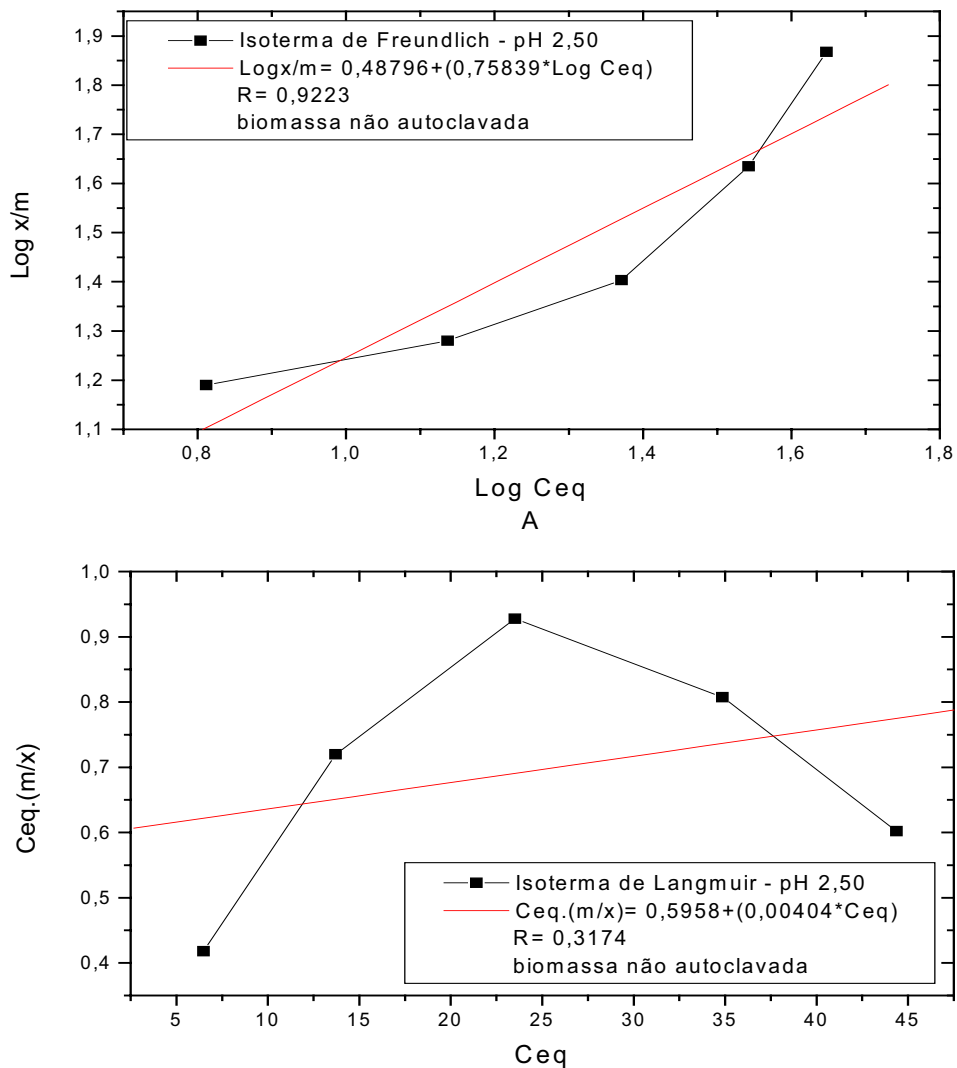


FIGURA 4.9.12. Estudo da biosorção do corante “Acid Red 151”, por biomassa de *Neurospora crassa* 74A, não autoclavada, realizado através das Isotermas de Freundlich (A) e Langmuir (B), no pH 2,50; 30°C; concentração inicial do corante de 100µg/mL; concentração de biomassa variando de 0,755 à 6,04µg/mL e tempo de contato de 120 minutos.

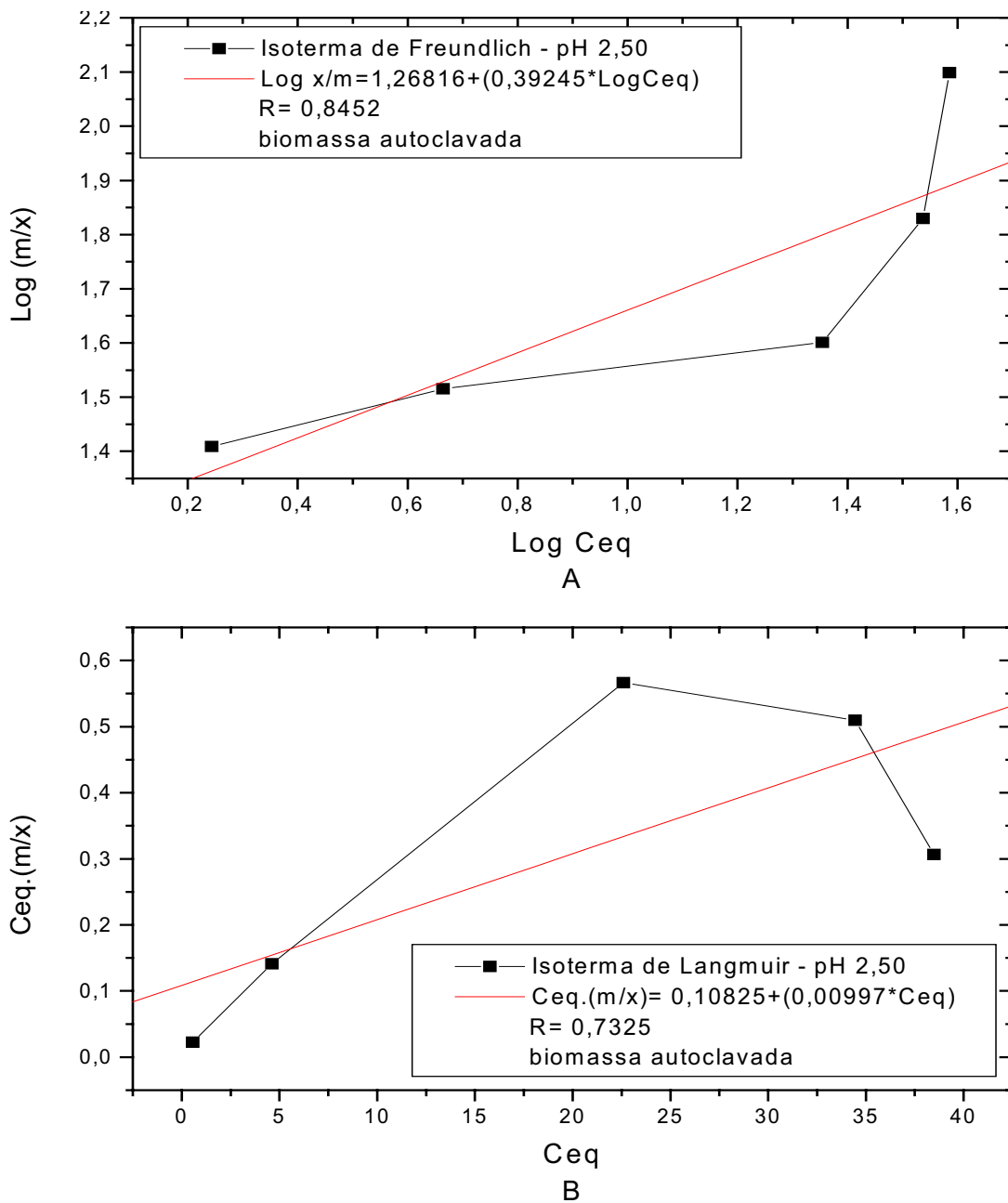


FIGURA 4.9.13. Estudo da biosorção do corante “Acid Red 151”, por biomassa de *Neurospora crassa* 74A, autoclavada, realizado através das Isotermas de Freundlich (A) e Langmuir (B), no pH 2,50; 30°C; concentração inicial do corante de 100µg/mL; concentração de biomassa variando de 0,755 a 6,04µg/mL e tempo de contato de 120 minutos.

As Isotermas de Freundlich e Langmuir é a que relaciona a quantidade de moléculas sobre uma superfície à pressão e à temperatura constante (MOORE, 1968), foi aplicada na interação entre o fungo *Neurospora crassa* 74A e o corante "Acid Red 151"; revelam em linhas gerais que a Equação de Freundlich foi a mais favorável, apresentando melhores coeficientes de regressão em todas as situações estudadas, tanto em biomassas não autoclavadas (FIGURA 4.9.12.) e autoclavadas (FIGURA 4.9.13.).

Para se realizar estes testes foram utilizados parâmetros semelhantes aos demais ensaios realizados, ou seja, manteve-se a concentração de corante constante e variou-se a concentração de biomassa para uma quantidade crescente.

As moléculas e átomos podem atacar a superfície de duas maneiras, fisicamente ou quimicamente. Na adsorção física, ou fisiosorção, ocorre uma interação de van der Waals entre o adsorbato e o substrato. Tais interações podem ser extensas, porém fracas, e a energia que é liberada quando a partícula é fisiosorvida é tão pequena que pode ser adsorvida como vibração de baixa intensidade, na verdade, as moléculas ficam aderidas à superfície após um processo de acomodação entre as forças atuantes no equilíbrio.

Por sua vez, na quimiosorção, ou adsorção química, as partículas interagem com a superfície, formando uma ligação química, usualmente ligações covalentes, e tendem a encontrar um número máximo de sítios com o substrato. A entalpia da quimiosorção é muito maior do que o da fisiosorção, uma molécula quimiosorvida pode ser removida separadamente se a valência da ligação não estiver correspondendo com a da superfície, (ATKINS, 1991).

A Isoterma de Langmuir baseia-se no recobrimento gradual de uma superfície pelas moléculas adsorvidas, dando-se a saturação quando a camada adsorvida tem a espessura uniforme de uma molécula. A Isoterma é especialmente aplicável aos casos de quimiosorção, onde as moléculas adsorvidas são mantidas na superfície por ligações comparáveis às dos

compostos químicos, ficam em equilíbrio e formam mono camada, (CASTELLAN, 1964).

No entanto, como pode surgir também uma espécie de adsorção onde a camada quimiosorvida pode desempenhar o papel de um composto intermediário no processo de catálise da reação, em que ocorra ligações molécula-molécula do adsorbato, formando multicamadas e intercalando os processos de fisiosorção e quimiosorção. Surgiram outras Isotermas de Adsorção para tentarem melhor explicar cada fenômeno adsortivo, como a Equação de Freundlich que utiliza as proporções logarítmicas para analisar as possibilidades de reações, as quais permitem avaliar se um determinado fenômeno é resultado de adsorção em monocamadas ou em multicamadas. Associando-se as variáveis a um sistema de regressão, permitindo verificar qual apresenta melhor correlação entre cada equação estudada, (ATKINS, 1991).

TESTE DE TOLERÂNCIA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO CORANTE "ACID RED 151"

Este teste favorece o estudo frente as condições favoráveis e desfavoráveis para o crescimento de *Neurospora crassa* 74A. Pode-se confirmar as influências atribuídas sobre a biomassa, possibilitando diagnosticar o que realmente prejudicou o desenvolvimento fúngico.

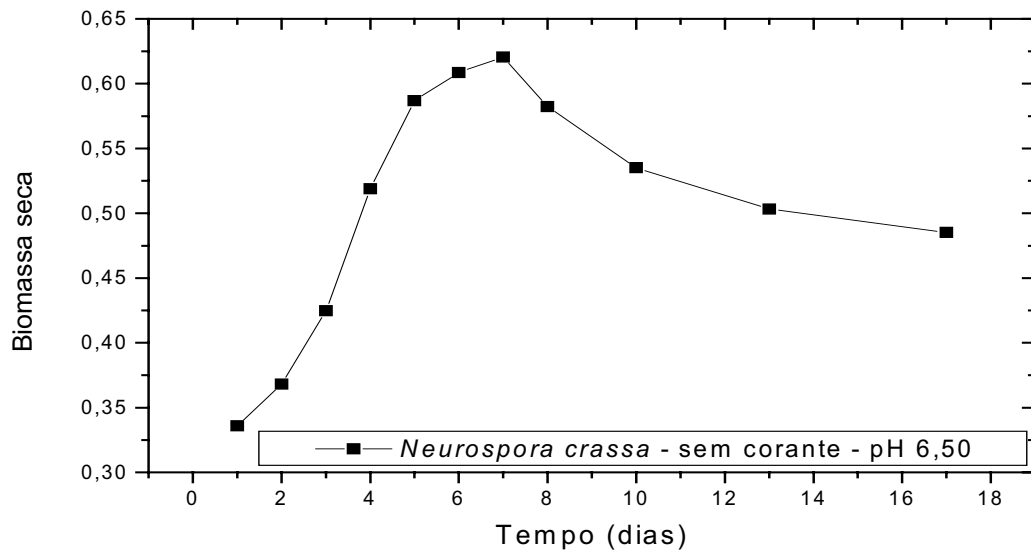


FIGURA 4.9.14. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, sem a adição do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias (controle).

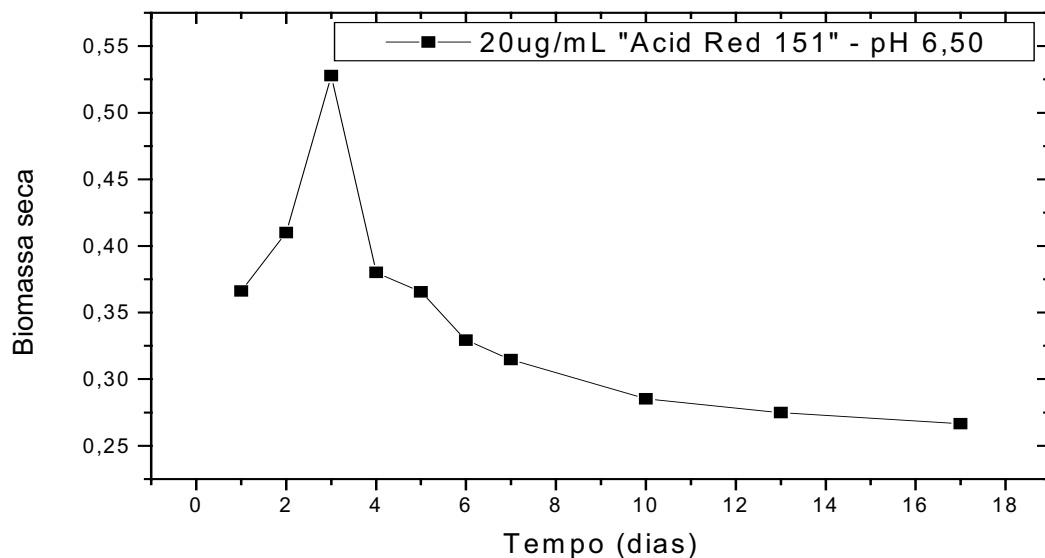


FIGURA 4.9.15. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 20ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

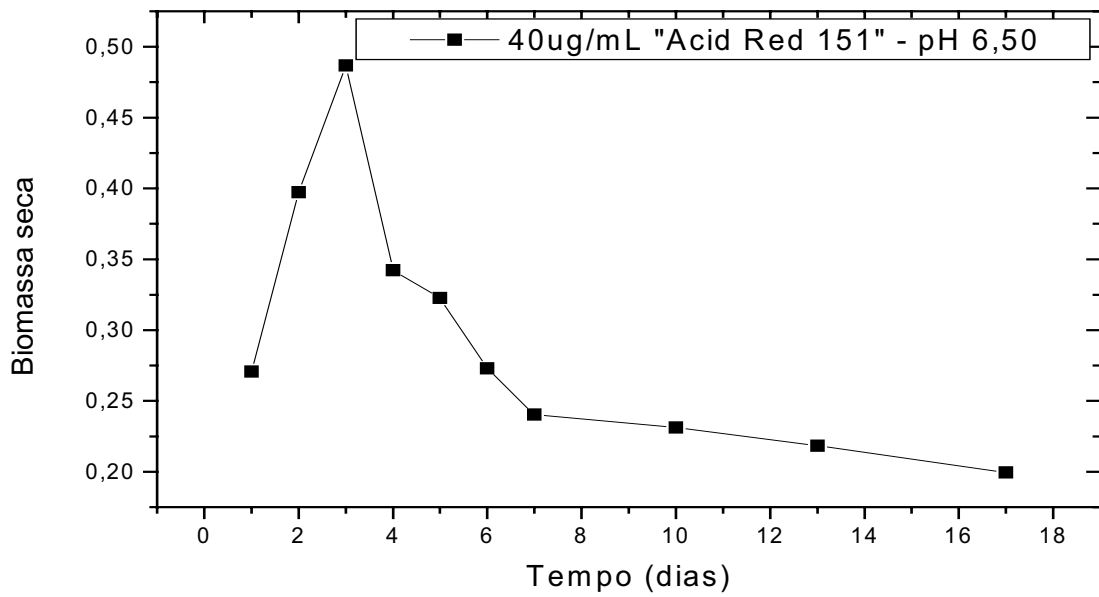


FIGURA 4.9.16. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 40ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

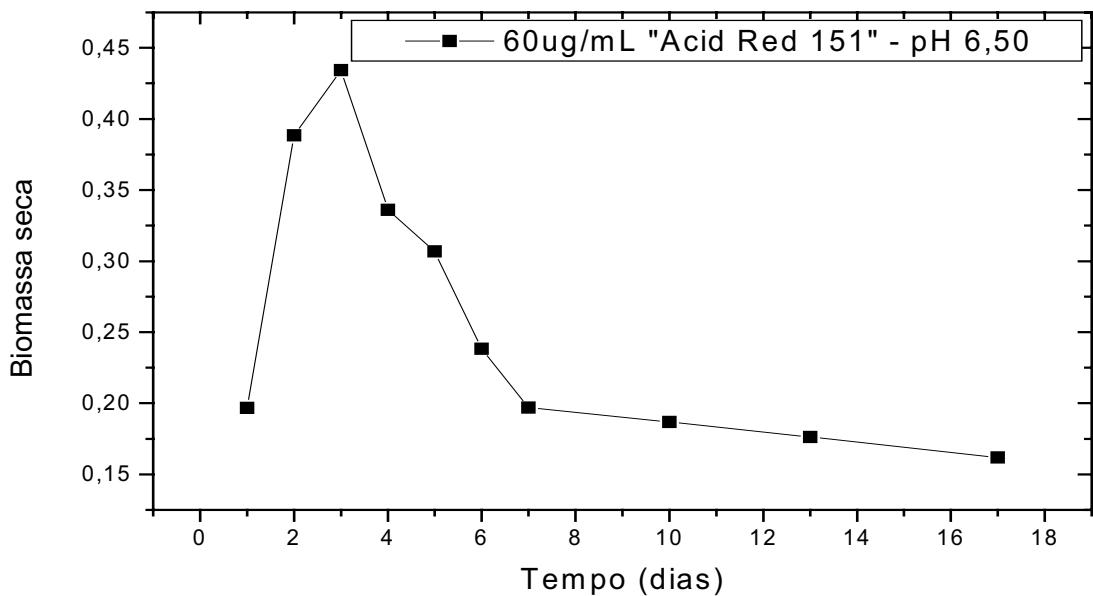


FIGURA 4.9.17. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 60ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

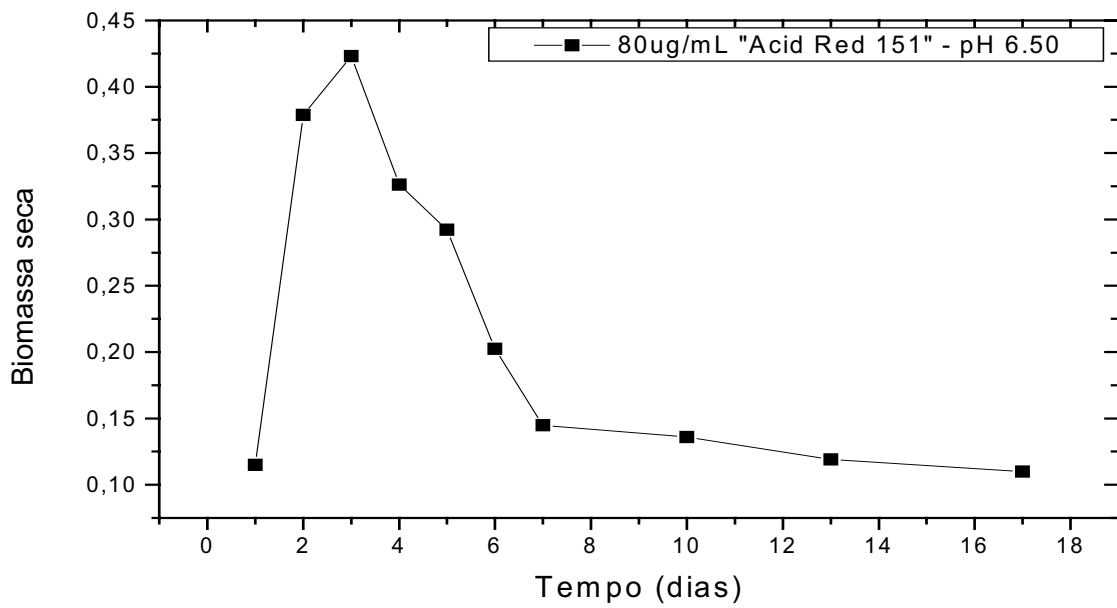


FIGURA 4.9.18. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 80ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

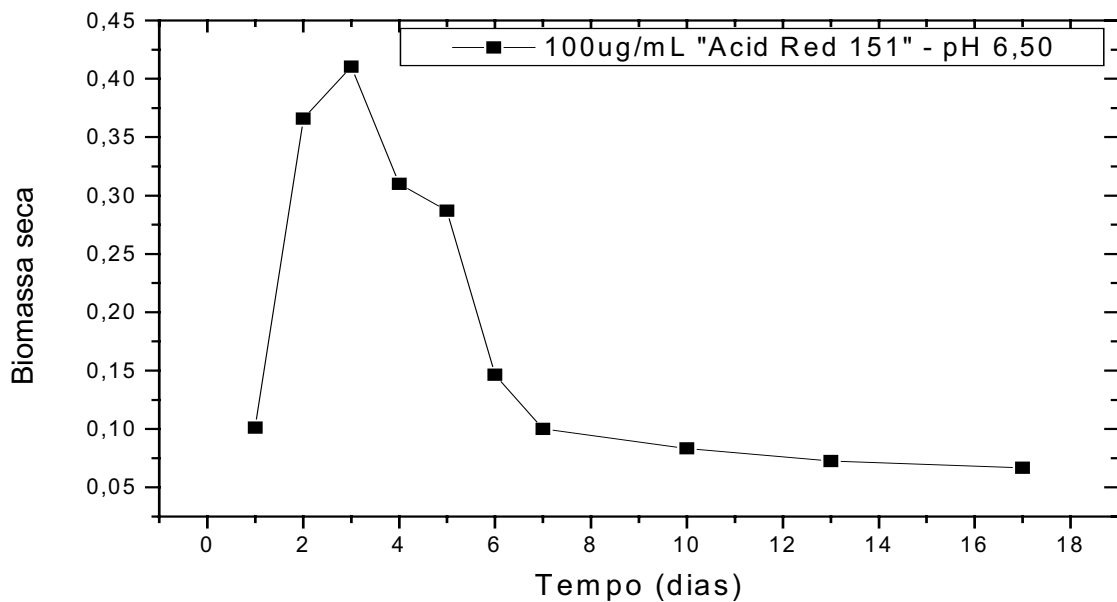


FIGURA 4.9.19. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 100ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

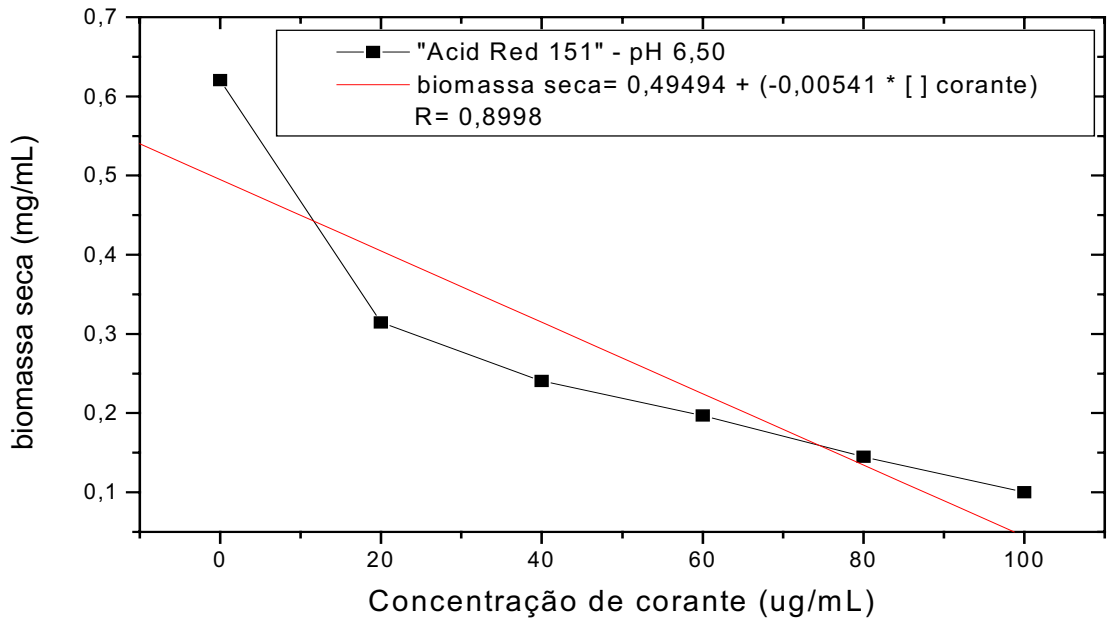


FIGURA 4.9.20. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 6,50, após 7 dias de cultivo.

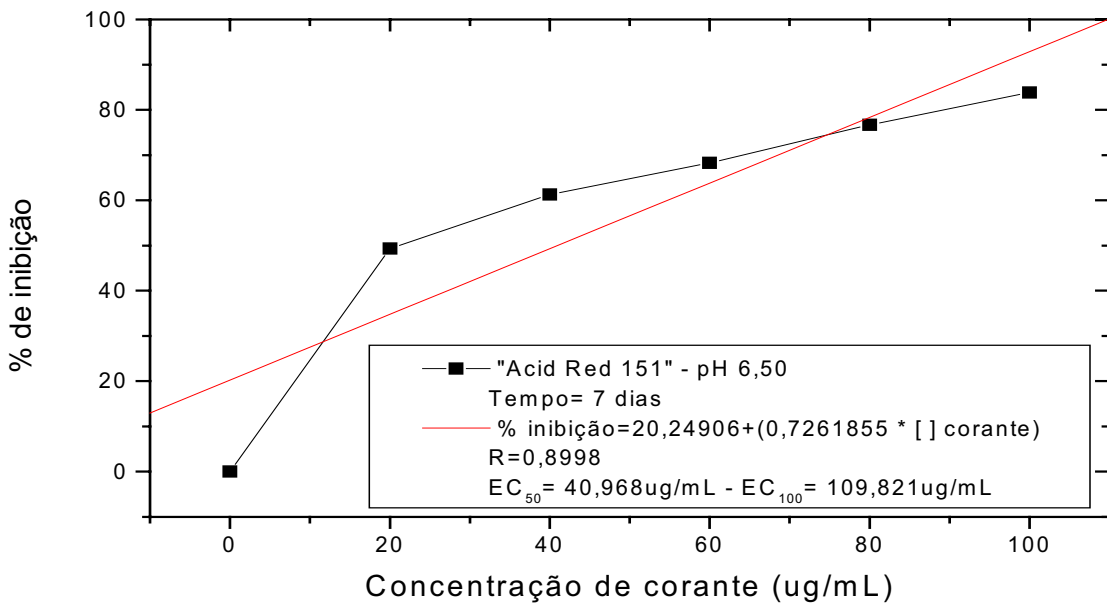


FIGURA 4.9.21. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 6,50, após 7 dias de cultivo.

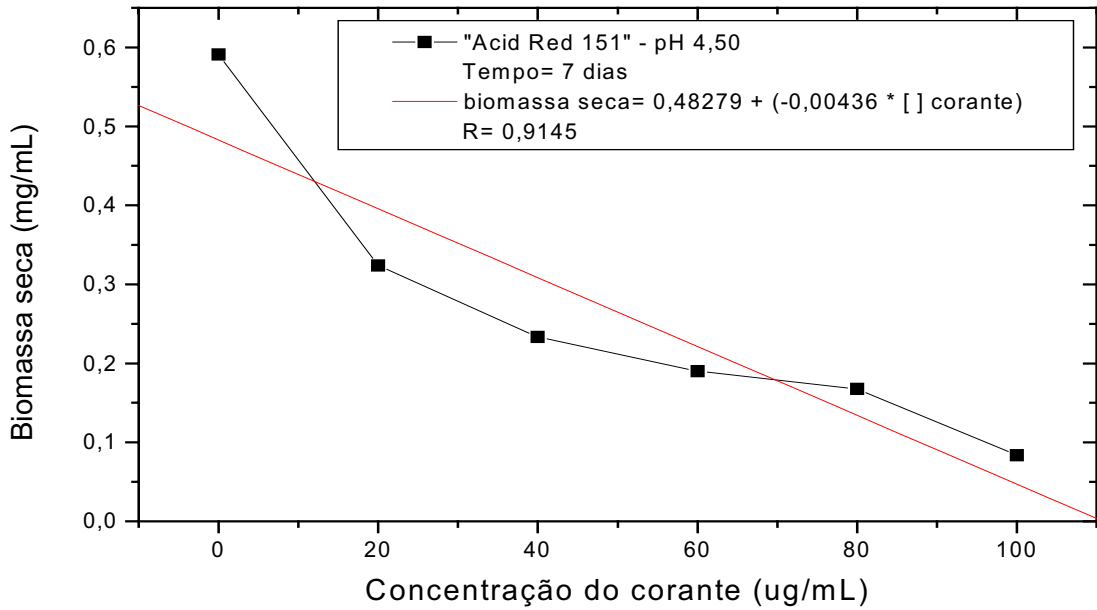


FIGURA 4.9.22. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 4,50, após 7 dias de cultivo.

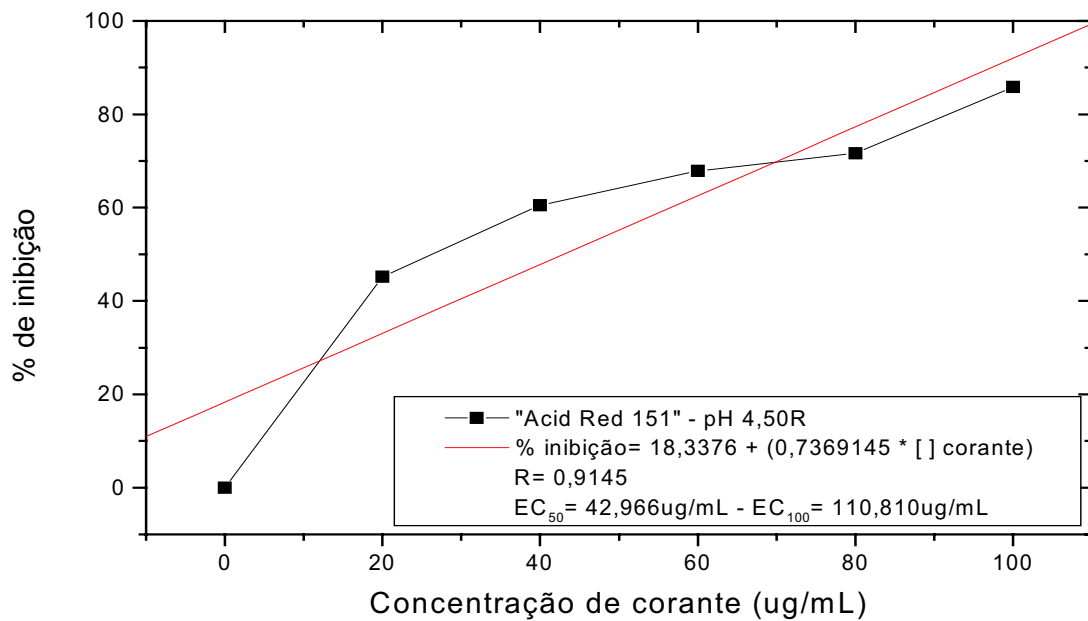


FIGURA 4.9.23. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 4,50, após 7 dias de cultivo.

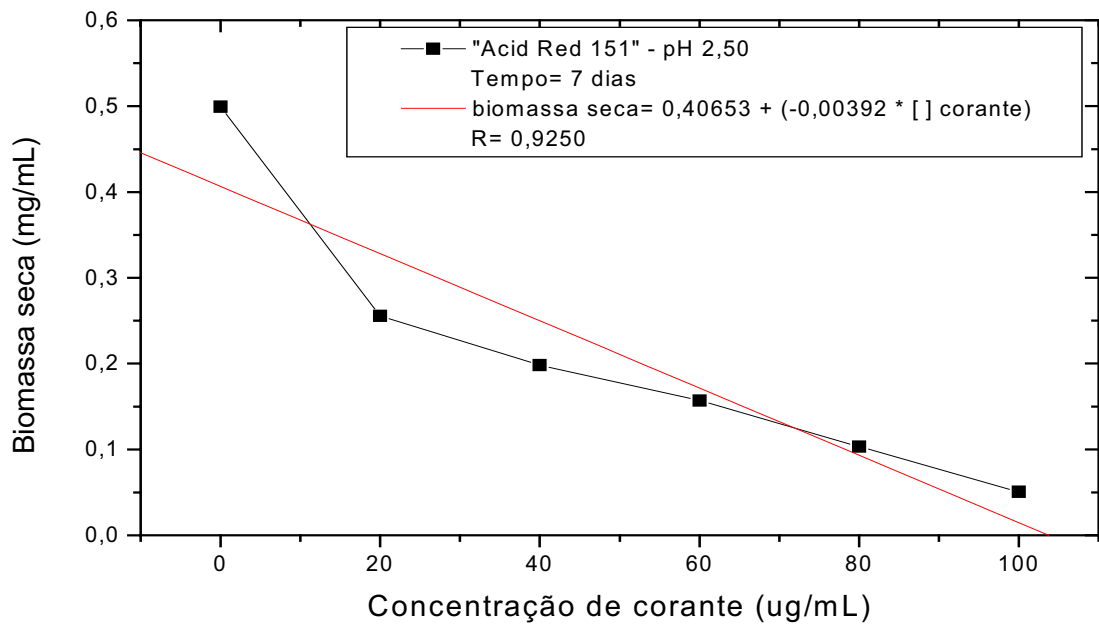


FIGURA 4.9.24. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 2,50, após 7 dias de cultivo.

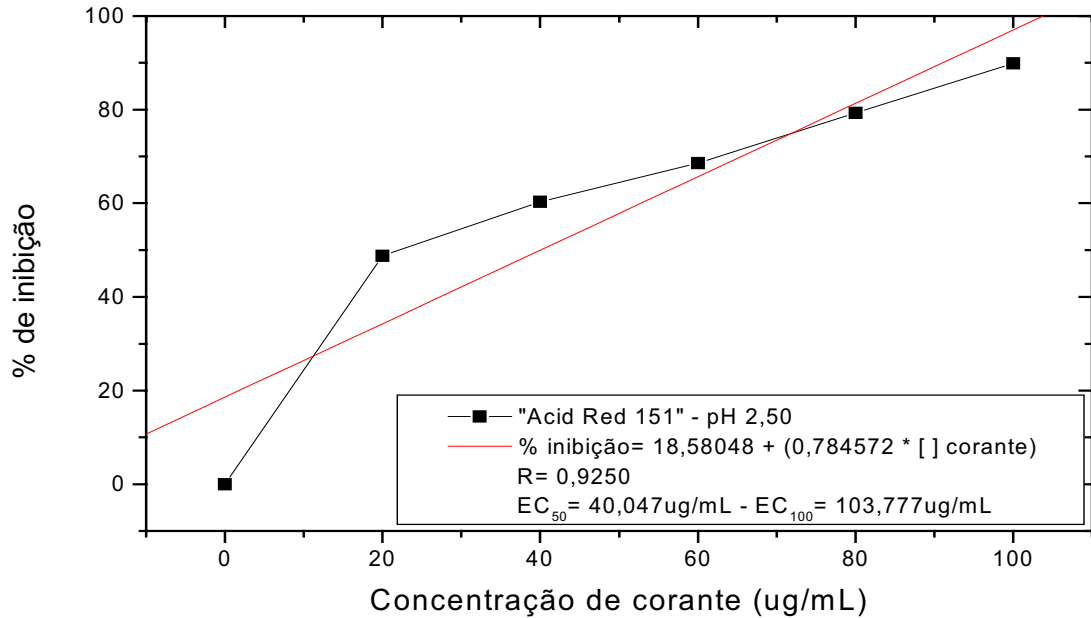


FIGURA 4.9.25. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 2,50, após 7 dias de cultivo.

Este estudo demonstrou o comportamento do fungo *Neurospora crassa* 74A à toxicidade dos corantes, esta ocorrência depende do corante avaliado, sendo influenciado também pelo pH em que ocorre a interação de desenvolvimento do fungo e diferentes concentrações de corantes.

Como ficou demonstrado, *Neurospora crassa* 74A atingiu sua fase exponencial de crescimento no 7^o dia, (FIGURAS 4.9.14.), tempo este que foi estabelecido para a determinação do EC₅₀ e EC₁₀₀.

A sensibilidade da biomassa fungica frente ao corante “Acid Red 151” indicou que este corante apresentou grau de toxicidade, assim como, de tolerância, no desenvolvimento do fungo.

Pelas FIGURAS 4.9.15. a 4.9.19., observa-se que a medida que aumenta a concentração de corante, a fase exponencial de crescimento em determinada concentração vai diminuindo, dando uma demonstração clara que, a resposta no crescimento do fungo a estes agentes se faz sentir, (FIGURAS 4.9.20. à 4.9.22. e 4.9.24.). Pode-se verificar que a produção de biomassa diminui com o aumento da concentração de corante.

A determinação do EC₅₀ e EC₁₀₀ para o “Acid Red 151”, mostra certa homogeneidade nos 3 valores de pH analisados, (FIGURAS 4.9.21.; 4.9.23. e 4.9.25.), tanto para o EC₅₀ como para EC₁₀₀.

4.10. Espectro UV-Vis do corante "Direct Red 23" a diferentes valores de pH

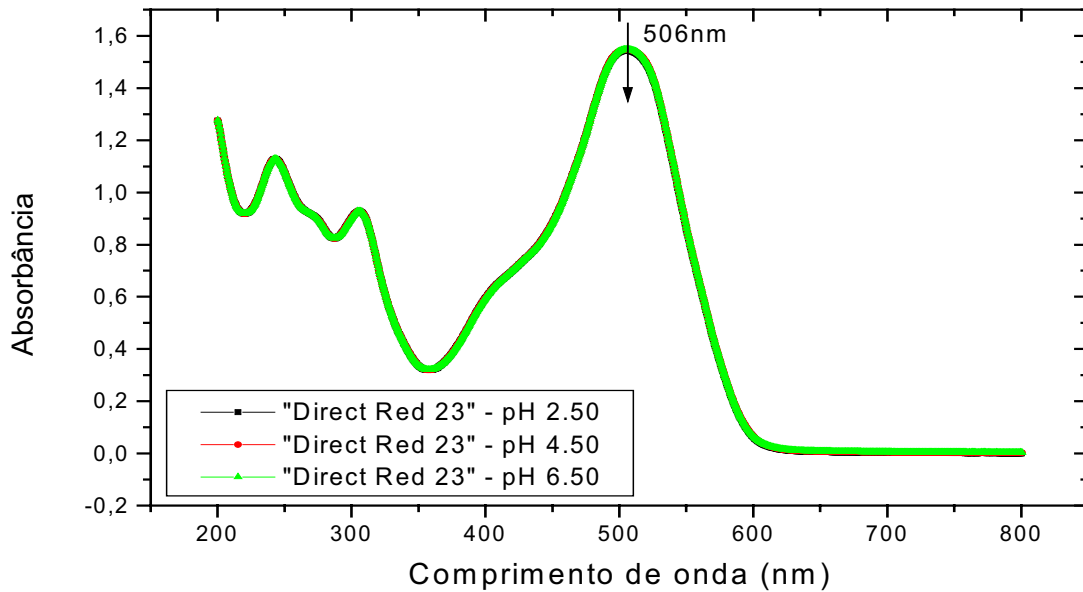


FIGURA 4.10.1. Varredura espectral do corante "Direct Red 23", nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100µg/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{506\text{nm}} = 0,00333 + (0,0119 \times \text{concentração corante})$$

$$R = 0,99996$$

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{506\text{nm}} = 0,00107 + (0,01198 \times \text{concentração corante})$$

$$R = 0,99991$$

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{506\text{nm}} = 0,002 + (0,01198 \times \text{concentração corante})$$

$$R = 0,99995$$

Análise em Espectro UV-Vis

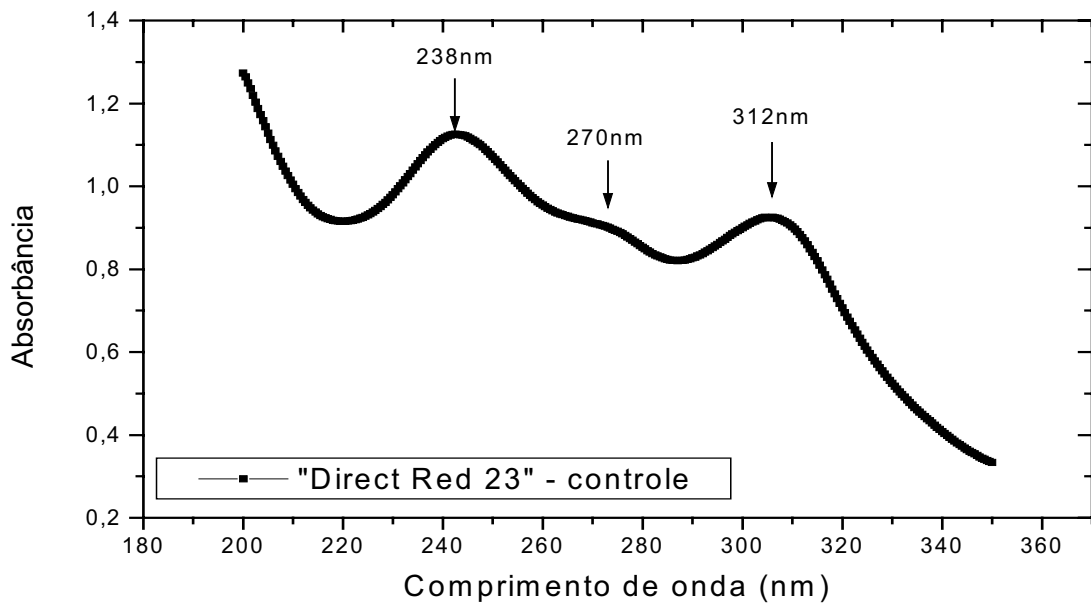


FIGURA 4.10.2. Varredura espectral do corante “Direct Red 23” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

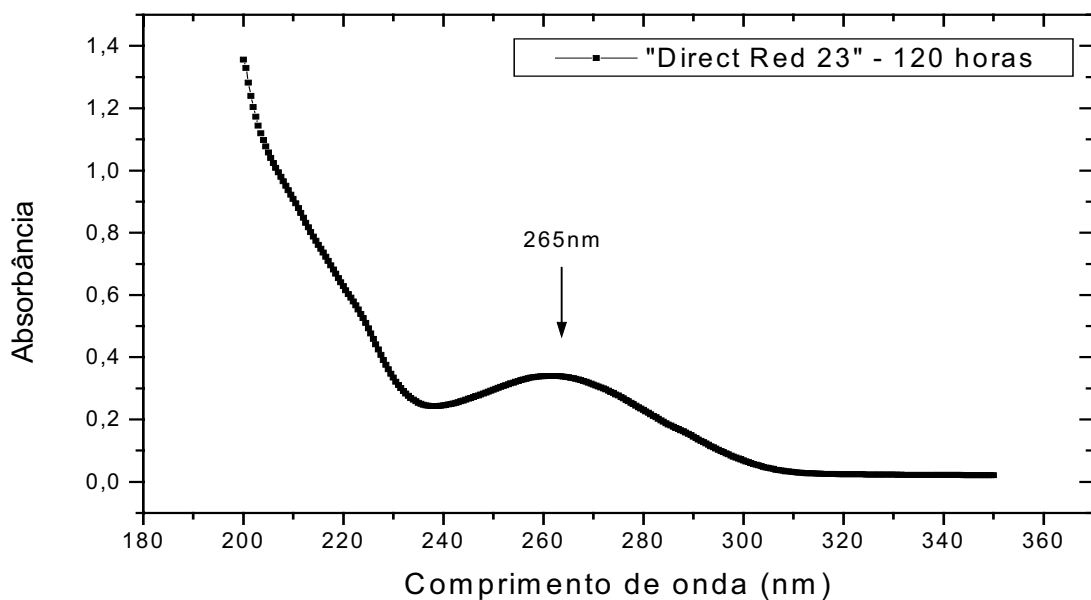


FIGURA 4.10.3. Varredura espectral do corante “Direct Red 23” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

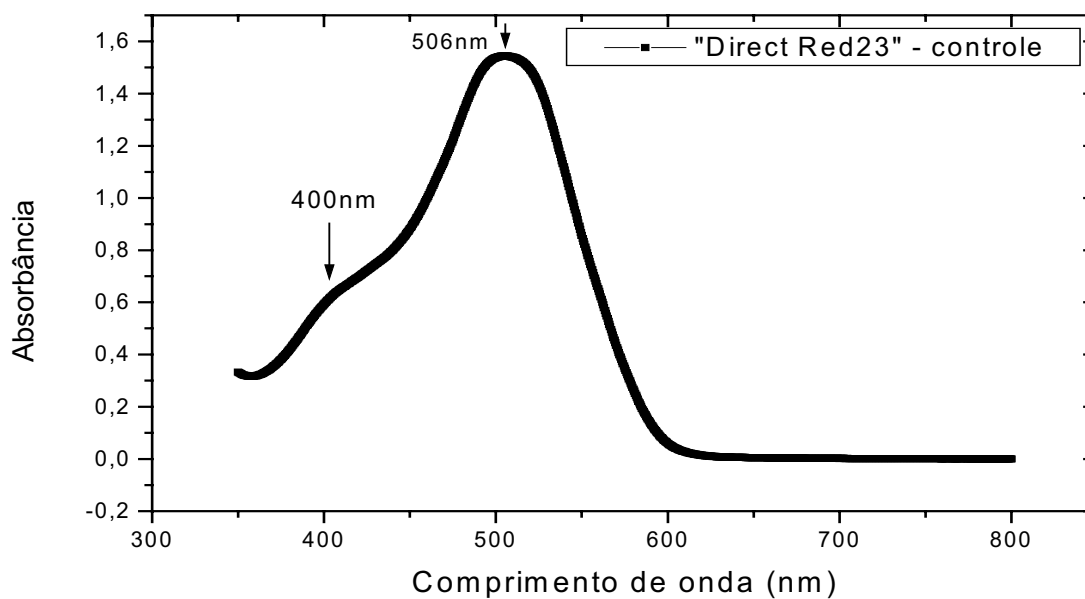


FIGURA 4.10.4. Varredura espectral do corante “Direct Red 23” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

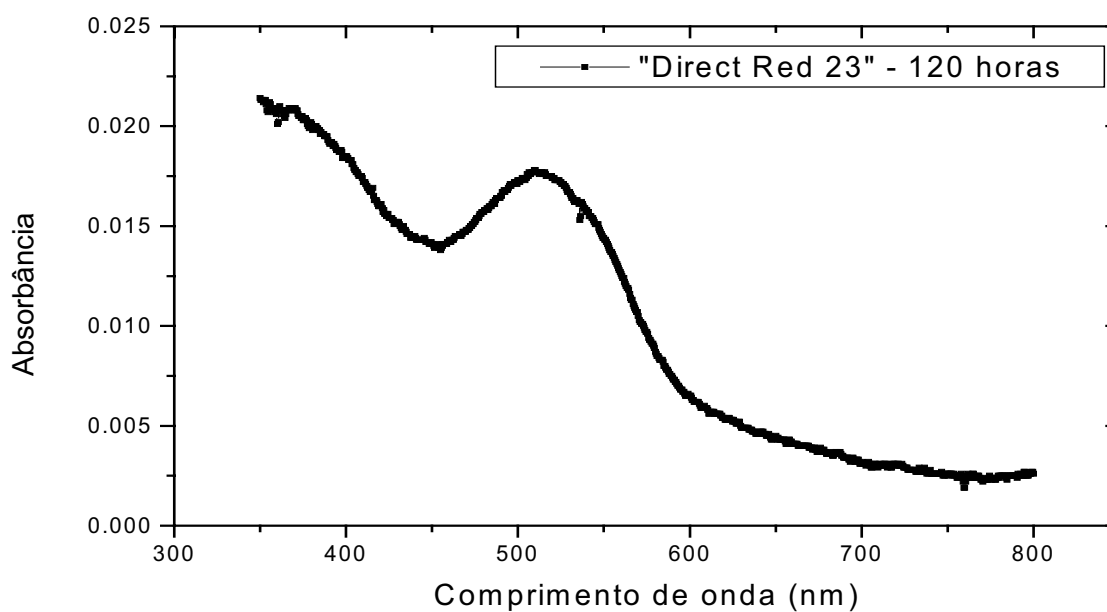


FIGURA 4.10.5. Varredura espectral do corante “Direct Red 23” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

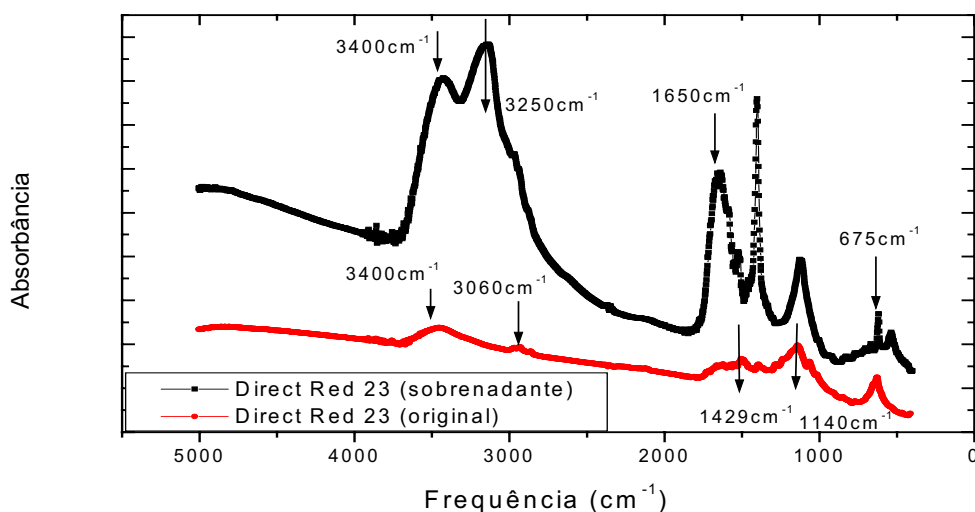


FIGURA 4.10.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} do corante “Direct Red 23” no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

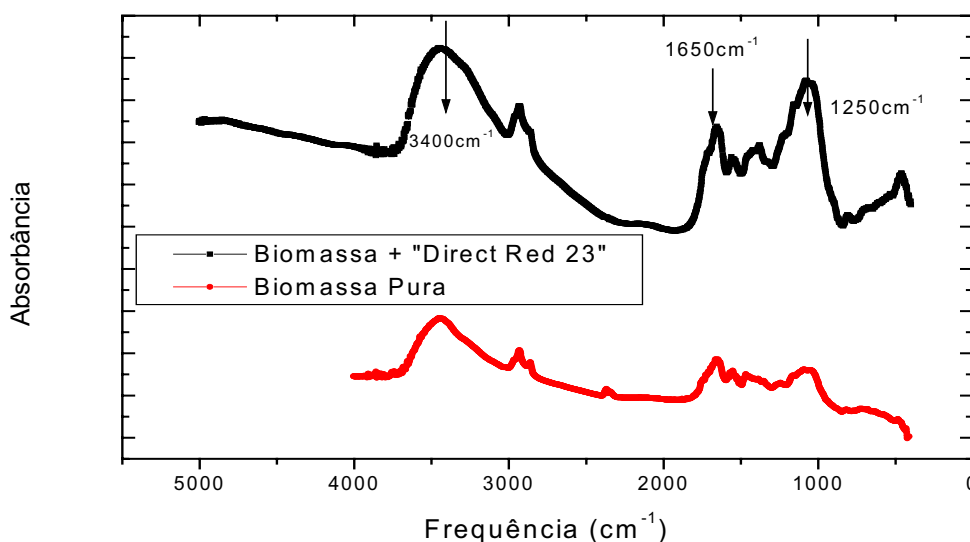


FIGURA 4.10.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante “Acid Red 151” por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

A FIGURA 4.10.1. revela que o corante analisado não apresenta alterações em sua absorbância, quando submetido à variação de valores de pH.

Na FIGURA 4.10.2, o espectro de UV controle, pode-se observar banda na região de 238nm, indicando a presença de amida secundária. (DYER, 1969). Bandas fenólicas em 270nm e em 312nm ramificações referente ao naftol, (SILVERSTEIN et al., 1987). A FIGURA 4.10.4 revela banda em 400nm, indicando ocorrência de ligações diazo, (PASTO e JOHNSON, 1977). Este corante apresenta banda cromófora em 506 nm. Após 120 horas (FIGURA 4.10.3.) verificou-se que desapareceu grande parte das estruturas presentes no espectro de UV controle, restando apenas banda em 265nm, presumivelmente pela presença de naftol livre.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

Na FIGURA 4.10.5 constatou-se o desaparecimento das bandas referentes às ligações azo. O espectro de FTIR do corante controle (FIGURA 4.10.6.) apresenta banda em 3400 e 3060 cm^{-1} , segundo SILVERSTEIN, (1987), que representam as amidas secundárias. Banda em 1140 cm^{-1} , segundo DYER, (1969), representa a ramificação benzeno sulfonado, também em 675 cm^{-1} , devido ao naftol (SILVERSTEIN et al., 1987). Após 120 horas de contato verificou-se a formação de duas bandas, em 3400 cm^{-1} provavelmente devido às amins secundárias, e em 3250 cm^{-1} presumivelmente ao aparecimento das amins primárias, a qual também pode ser responsável pelo aparecimento da banda em 1650 cm^{-1} . Na interação com a biomassa (FIGURA 4.10.7.) em que também ocorre uma ampliação das bandas entre 3400 e 3250 cm^{-1} , e em 1650 e 1250 cm^{-1} , devido à presença das amins primárias.

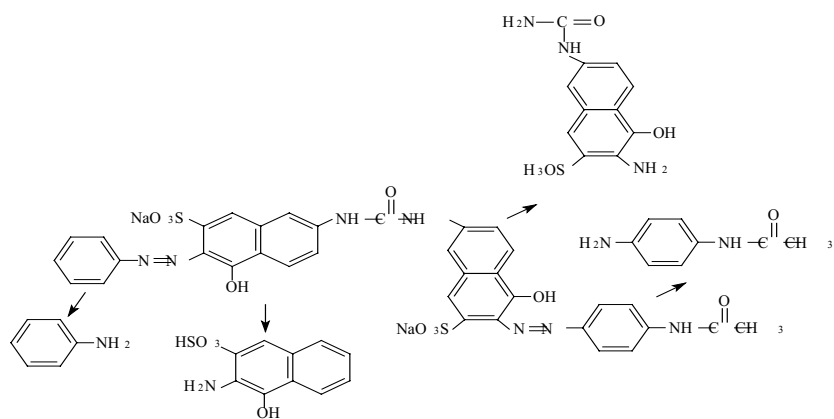
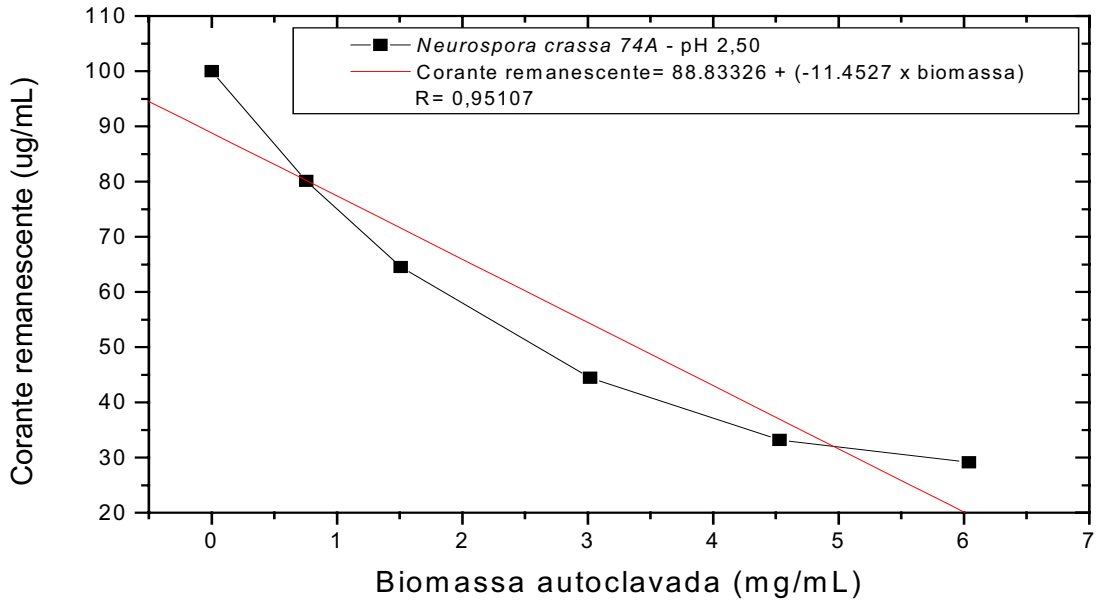
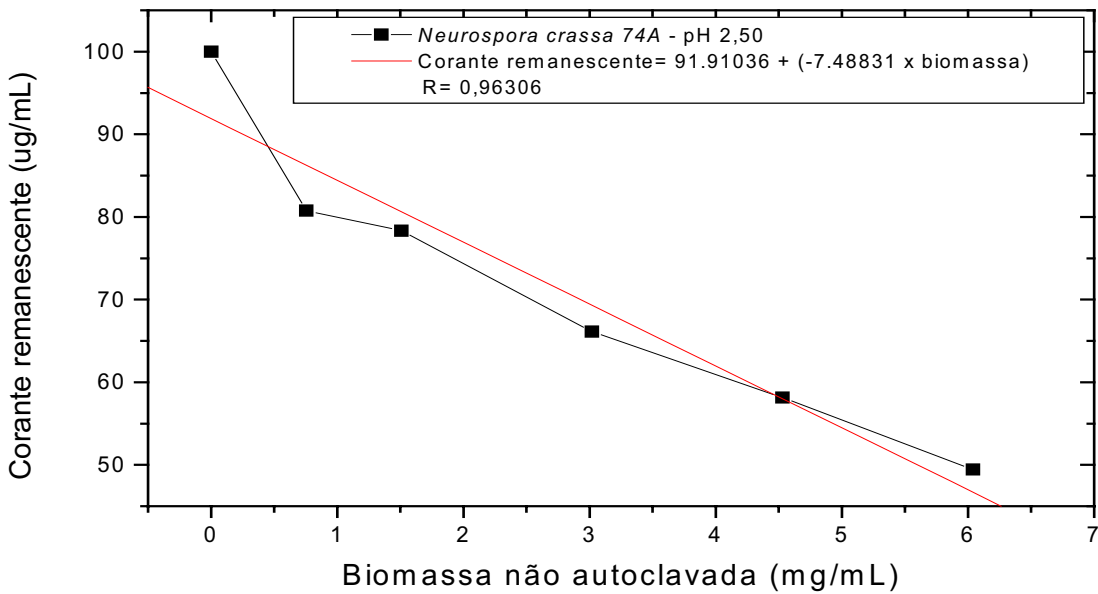


FIGURA 4.10.8. Corante “Direct Red 23”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

TESTE DE BIOSORTIVIDADE DO CORANTE “DIRECT RED 23” EM DIFERENTES VALORES DE pH



A



B

FIGURA 4.10.9. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante “Direct Red 23” (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 2,50; 30°C; 120 minutos de contato. Estimativa da quantidade de biomassa necessária para se conseguir a remoção total do corante= (A) autoclavada: 7,756mg/mL; (B) não autoclavada: 12,273mg/mL.

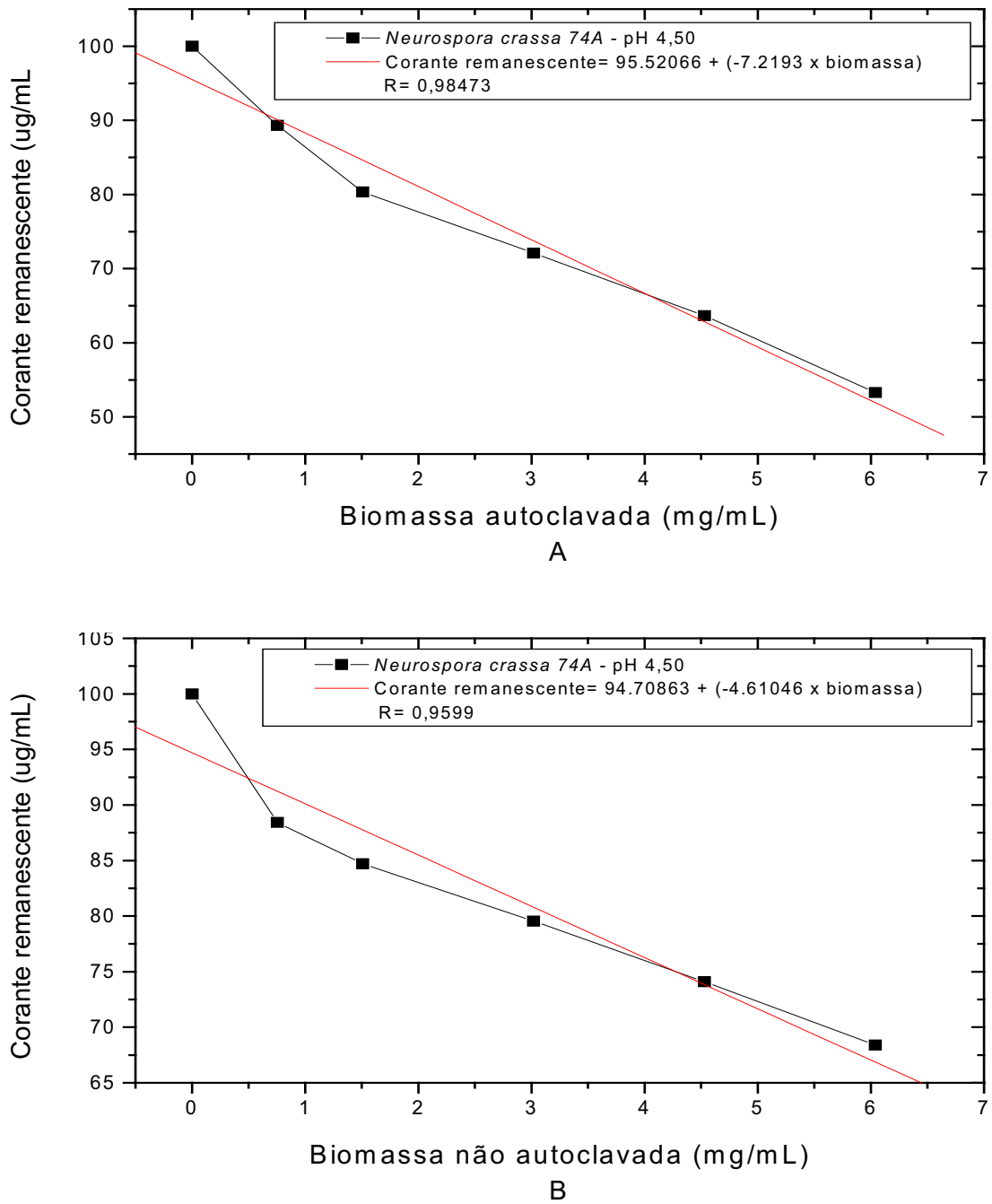


FIGURA 4.10.10. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante “Direct Red 23” (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 4,50; 30°C; 120 minutos de contato. Estimativa da quantidade de biomassa necessária para se conseguir a remoção total do corante= (A) autoclavada: 13,231mg/mL; (B) não autoclavada: 20,542mg/mL.

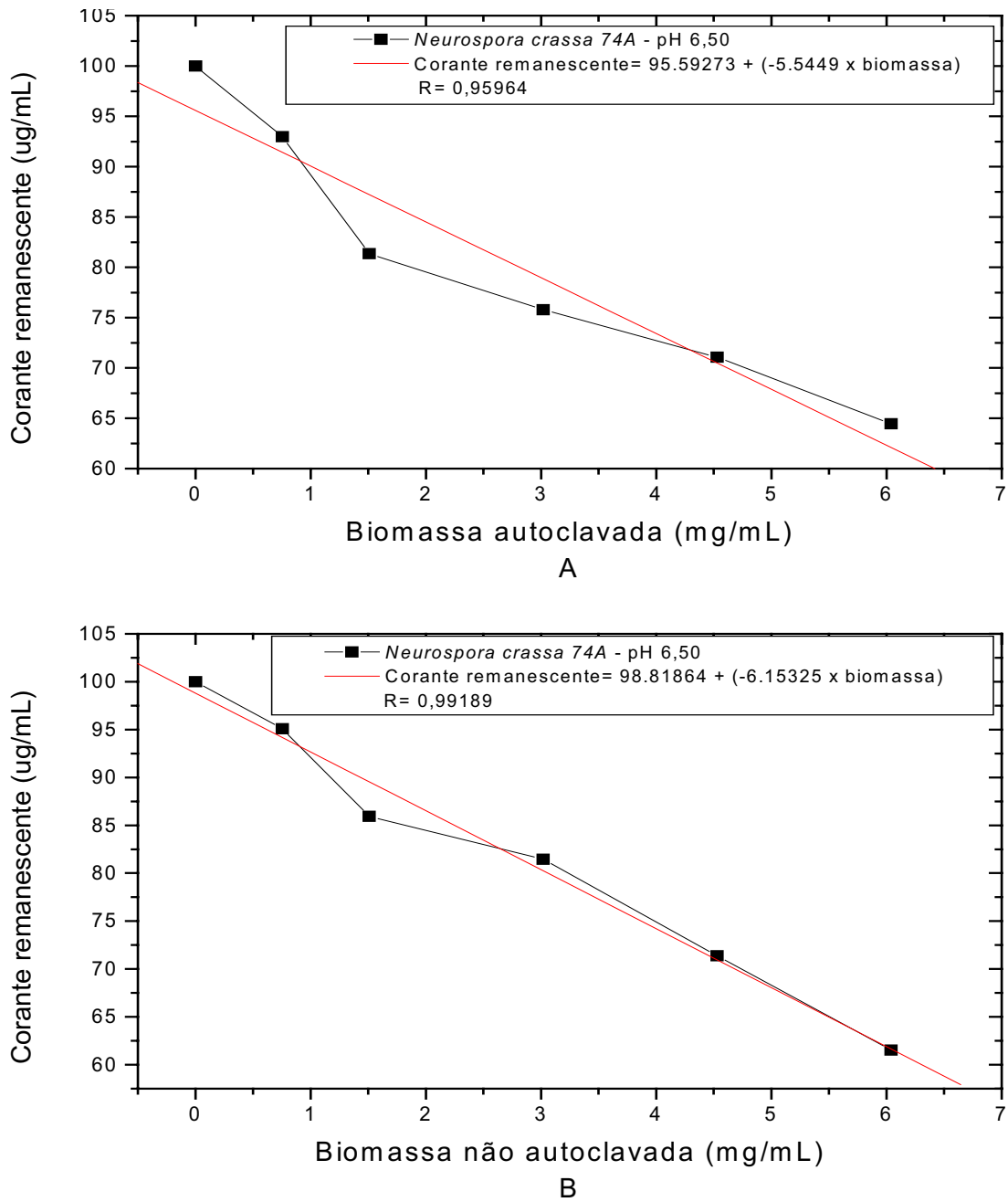


FIGURA 4.10.11. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante "Direct Red 23" (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 6,50; 30°C; 120 minutos de contato. Estimativa da quantidade de biomassa necessária para se conseguir a remoção total do corante= (A) autoclavada: 16,059mg/mL; (B) não autoclavada: 17,239mg/mL.

Os testes de biosorção em diferentes valores de pH do corante “Direct Red 23”; na concentração inicial de 100µg/mL e o fungo *Neurospora crassa* 74A, autoclavada e não autoclavada, indicaram que o meio mais ácido é mais eficaz na remoção do corante em solução aquosa, e que a biomassa autoclavada funciona como melhor substrato, do que a biomassa viva, no tempo de contato de 120 minutos. Conforme as estimativas das quantidades de biomassas necessárias para promover a remoção total dos corantes avaliados, nos valores de pH 2,50; 4,50 e 6,50. Estes resultados estão indicados nas (FIGURAS 4.10.9., 4.10.10., 4.10.11.) para o corante “Direct Red 23”.

CORSO, (1998), relata que os fungos autoclavados apresentam melhor mecanismo de remoção do corante em solução aquosa. Já as células fúngicas vivas agem como se o corante fosse um corpo estranho e que necessita ser removido, através de sistemas enzimáticos, os quais dificultariam os sítios adsortivos a receberem as moléculas do corante. Por outro lado, no momento em que ocorre autoclavagem, estes sistemas enzimáticos cessam, e as células se tornam um substrato mais propício à aproximação de moléculas estranhas.

TESTE DE BIOSORTIVIDADE DO CORANTE “DIRECT RED 23” SEGUNDO AS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE FREUNDLICH LANGMUIR

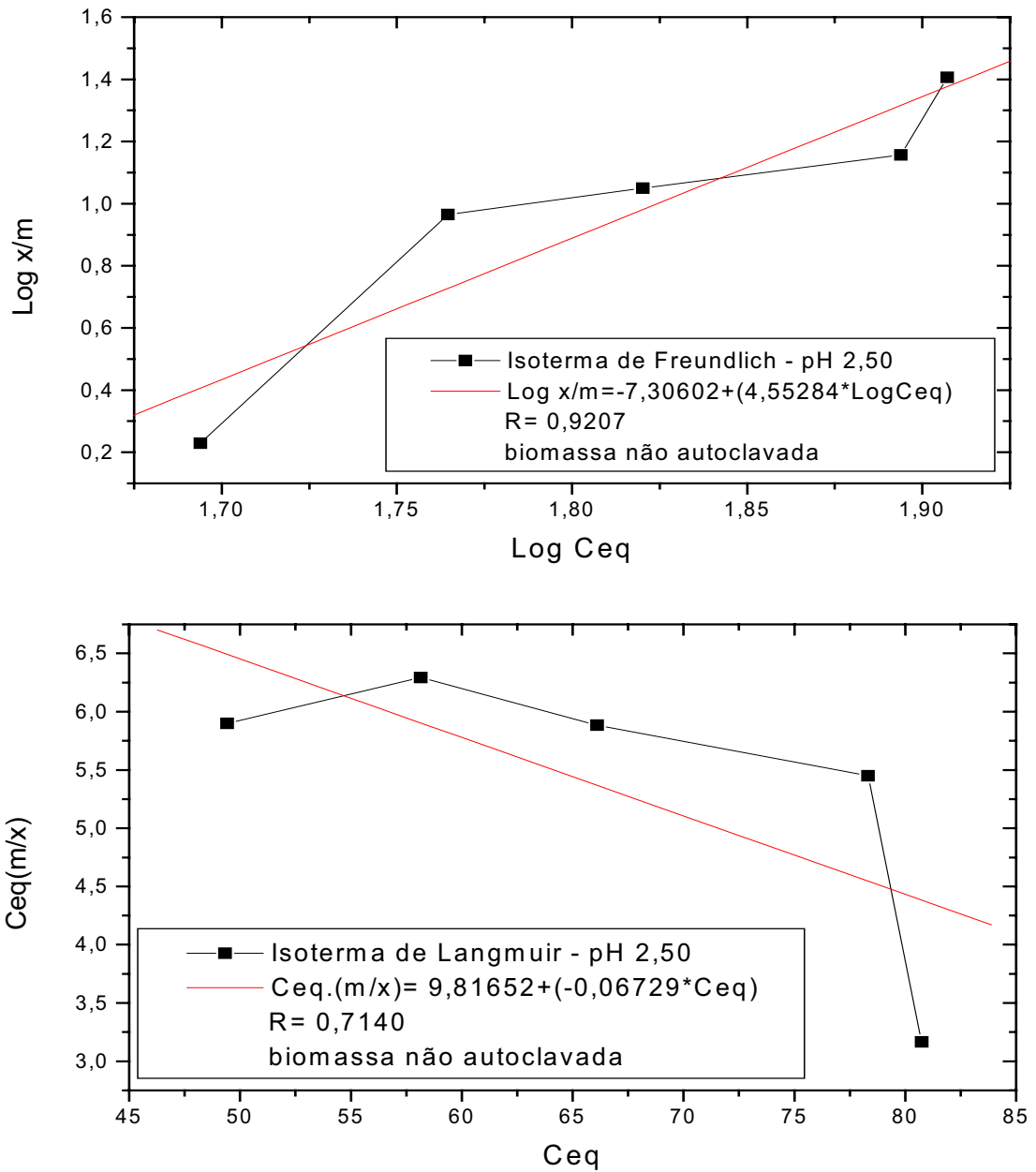


FIGURA 4.10.12. Estudo da biosorção do corante “Direct Red 23”, por biomassa de *Neurospora crassa* 74A, não autoclavada, realizado através das Isotermas de Freundlich (A) e Langmuir (B), no pH 2,50; 30°C; concentração inicial do corante de 100µg/mL; concentração de biomassa variando de 0,755 a 6,04µg/mL e tempo de contato de 120 minutos.

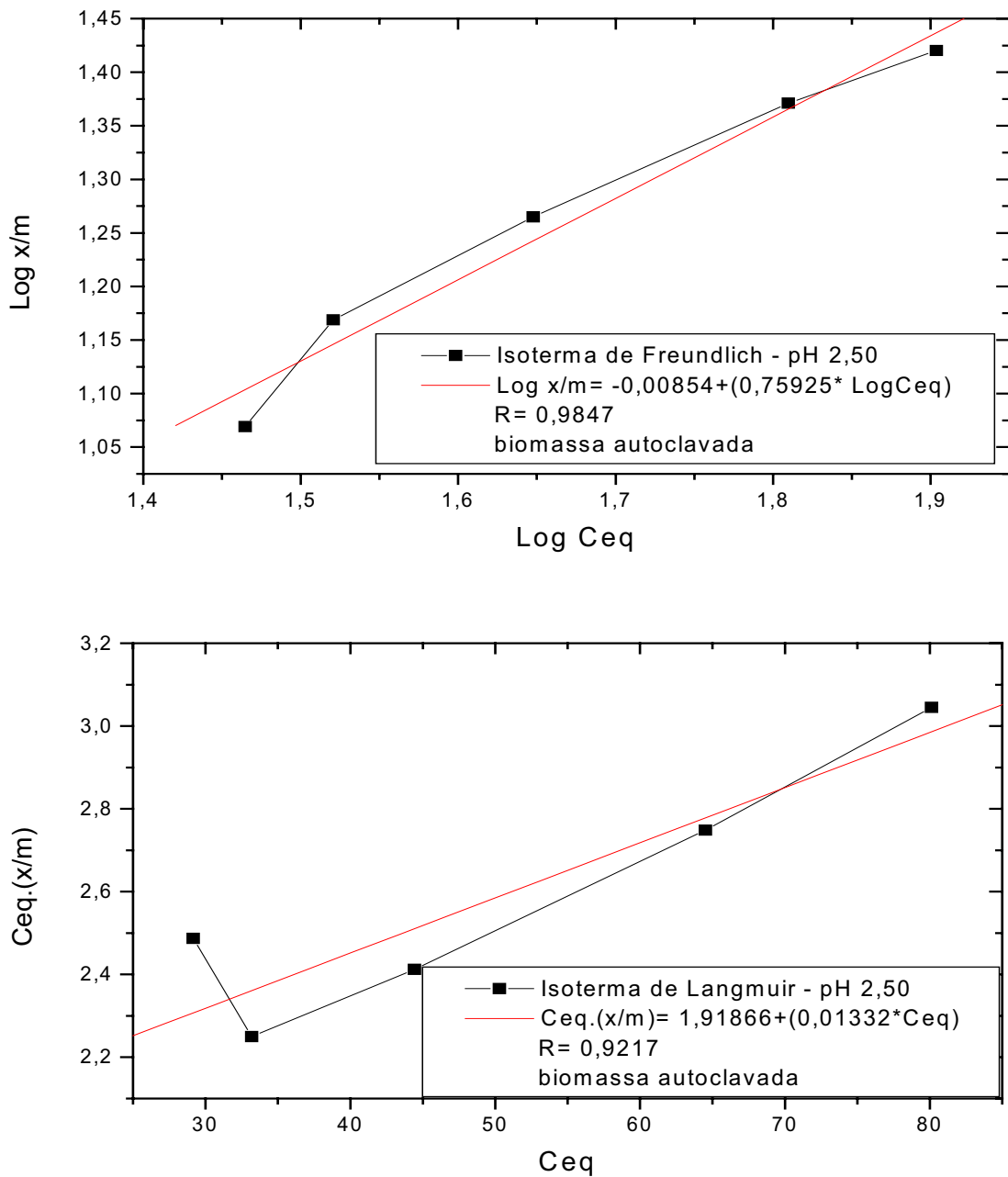


FIGURA 4.10.13. Estudo da biosorção do corante “Direct Red 23”, por biomassa de *Neurospora crassa* 74A, autoclavada, realizado através das Isothermas de Freundlich (A) e Langmuir (B), no pH 2,50; 30°C; concentração inicial do corante de 100µg/mL; concentração de biomassa variando de 0,755 a 6,04µg/mL e tempo de contato de 120 minutos.

A equação que relaciona a quantidade de moléculas sobre uma superfície à pressão e à temperatura constante, é denominada Isoterma de Adsorção, (MOORE, 1968).

As moléculas e átomos podem atacar a superfície de duas maneiras, fisicamente ou quimicamente. Na adsorção física, ou fisiosorção, ocorre uma interação de van der Waals entre o adsorbato e o substrato. Tais interações podem ser extensas, porém fracas, e a energia que é liberada quando a partícula é fisiosorvida é tão pequena que pode ser adsorvida como vibração de baixa intensidade, na verdade, as moléculas ficam aderidas à superfície após um processo de acomodação entre as forças atuantes no equilíbrio.

Por sua vez, na quimiosorção, ou adsorção química, as partículas interagem com a superfície, formando uma ligação química, usualmente ligações covalentes, e tendem a encontrar um número máximo de sítios com o substrato. A entalpia da quimiosorção é muito maior do que o da fisiosorção, uma molécula quimiosorvida pode ser removida separadamente se a valência da ligação não estiver correspondendo com a da superfície, (ATKINS, 1991).

A Isoterma de Langmuir baseia-se no recobrimento gradual de uma superfície pelas moléculas adsorvidas, dando-se a saturação quando a camada adsorvida tem a espessura uniforme de uma molécula. A Isoterma é especialmente aplicável aos casos de quimiosorção, onde as moléculas adsorvidas são mantidas na superfície por ligações comparáveis às dos compostos químicos, ficam em equilíbrio e formam uma mono camada, (CASTELLAN, 1964).

No entanto, como pode surgir também uma espécie de adsorção onde a camada quimiosorvida pode desempenhar o papel de um composto intermediário no processo de catálise da reação, em que ocorra ligações molécula-molécula do adsorbato, formando multicamadas e intercalando os processos de fisiosorção e quimiosorção. Surgiram outras Isotermas de Adsorção para tentarem melhor explicar cada fenômeno adsorativo, como a Equação de Freundlich que utiliza as proporções logarítmicas para analisar as possibilidades de reações, as quais permitem avaliar se um determinado

fenômeno é resultado de adsorção em monocamadas ou em multicamadas. Associando-se as variáveis a um sistema de regressão, permitindo verificar qual apresenta melhor correlação entre cada equação estudada, (ATKINS, 1991).

A aplicação das equações de Freundlich e Langmuir para a interação entre o fungo *Neurospora crassa* 74A e o corante “Direct Red 23”; “Erythrosine B” em pH 2,50, revelam que a Equação de Freundlich foi a mais favorável, apresentando melhor coeficiente de regressão em todas as situações estudadas, tanto em biomassas não autoclavadas (FIGURA 4.10.12.) e autoclavadas (FIGURA 4.10.13.). Portanto, a adsorção ocorre por multicamadas de moléculas de corantes.

Para se realizar estes testes foram utilizados parâmetros semelhantes aos demais ensaios realizados, ou seja, manteve-se a concentração de corante constante e variou-se a concentração de biomassa para uma quantidade crescente.

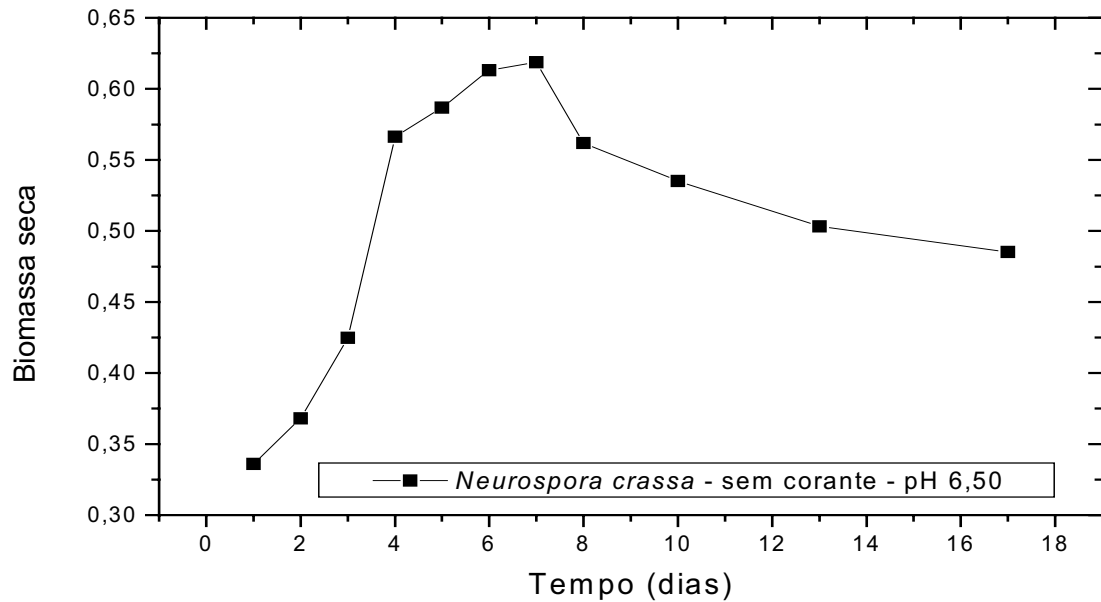
**TESTE DE TOLERÂNCIA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO
CORANTE "DIRECT RED 23"**

FIGURA 4.10.14. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, sem a adição do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias (controle).

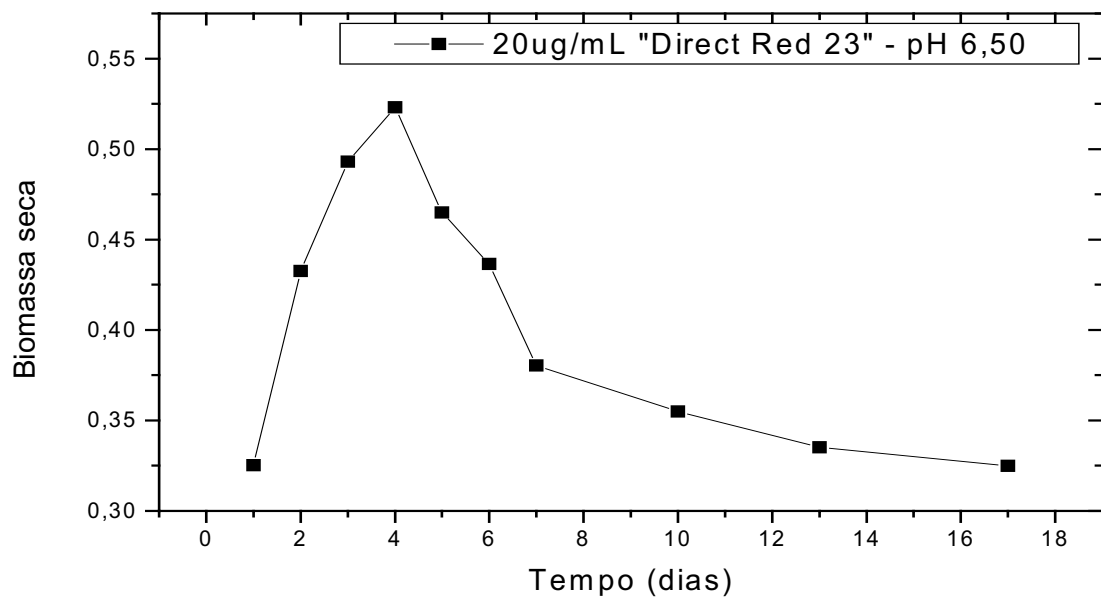


FIGURA 4.10.15. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 20ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

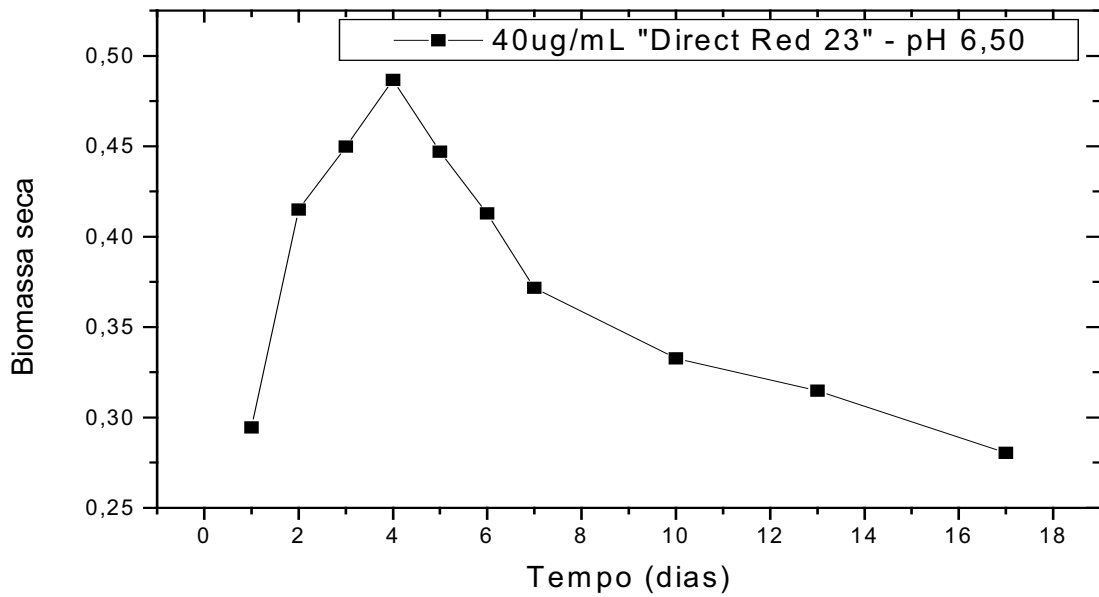


FIGURA 4.10.16. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 40ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

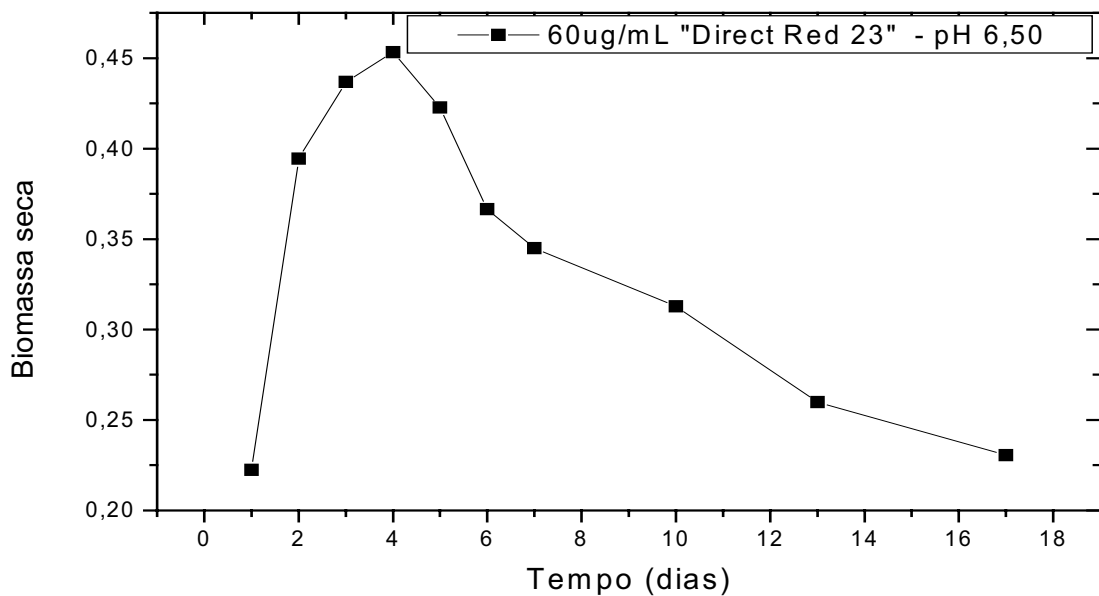


FIGURA 4.10.17. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 60ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

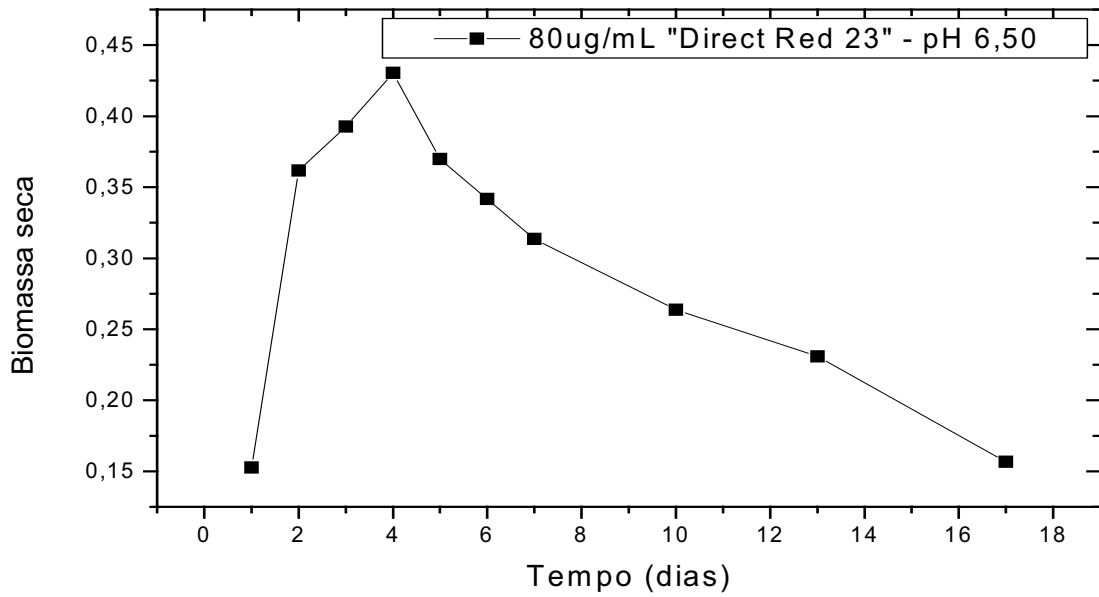


FIGURA 4.10.18. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 80ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

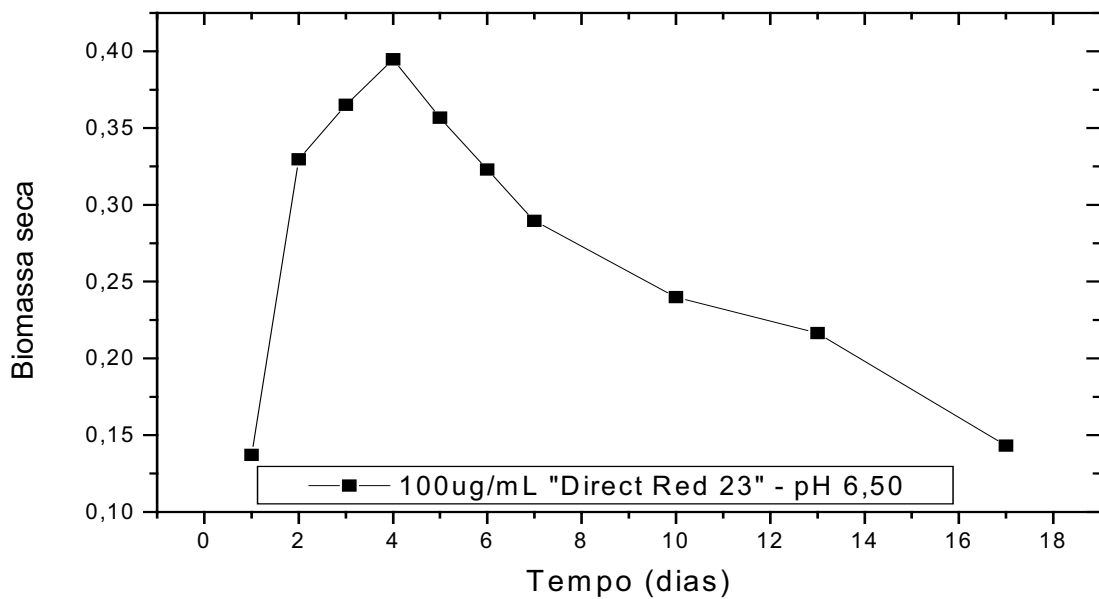


FIGURA 4.10.19. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 100ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

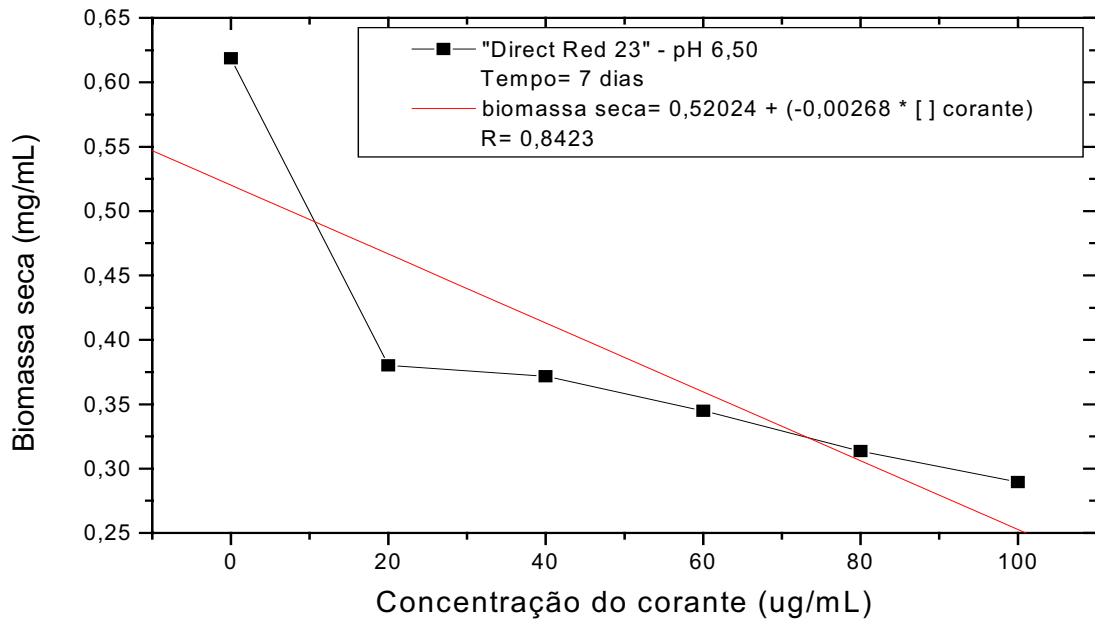


FIGURA 4.10.20. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 6,50, após 7 dias de cultivo.

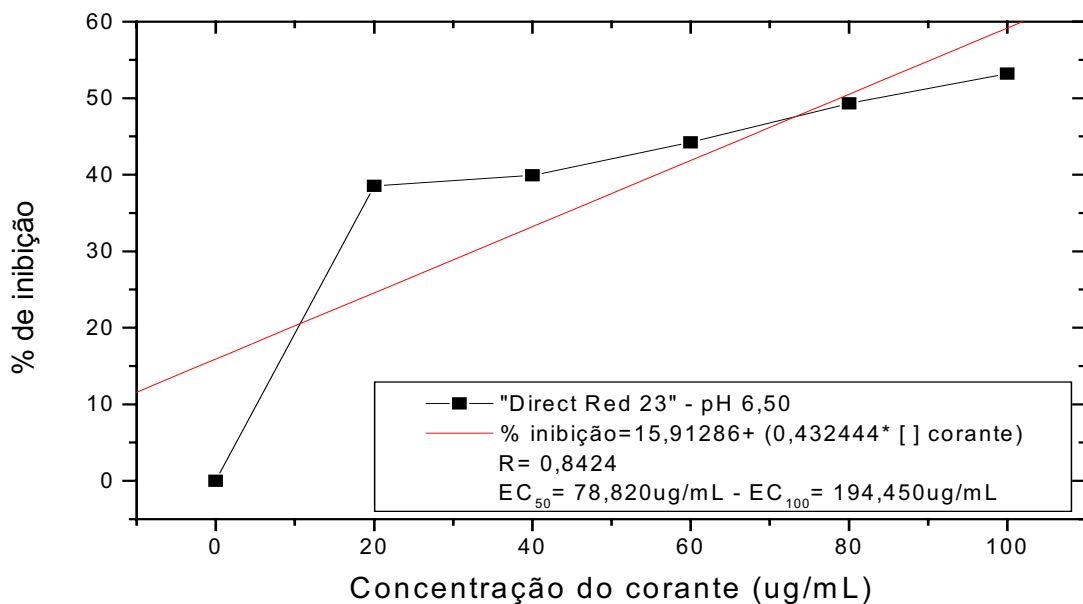


FIGURA 4.10.21. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 6,50, após 7 dias de cultivo.

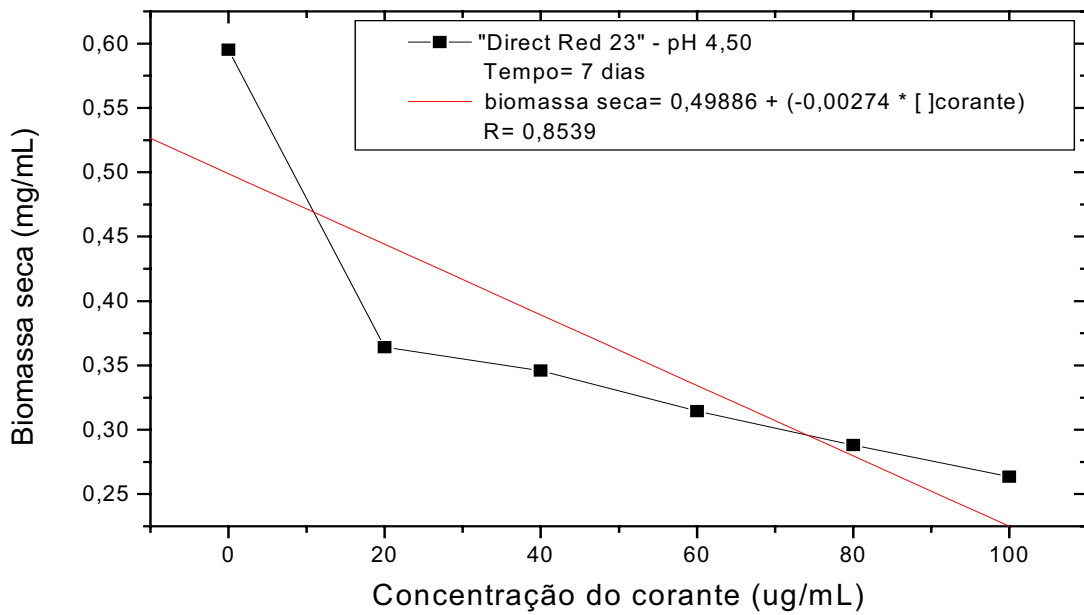


FIGURA 4.10.22. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 4,50, após 7 dias de cultivo.

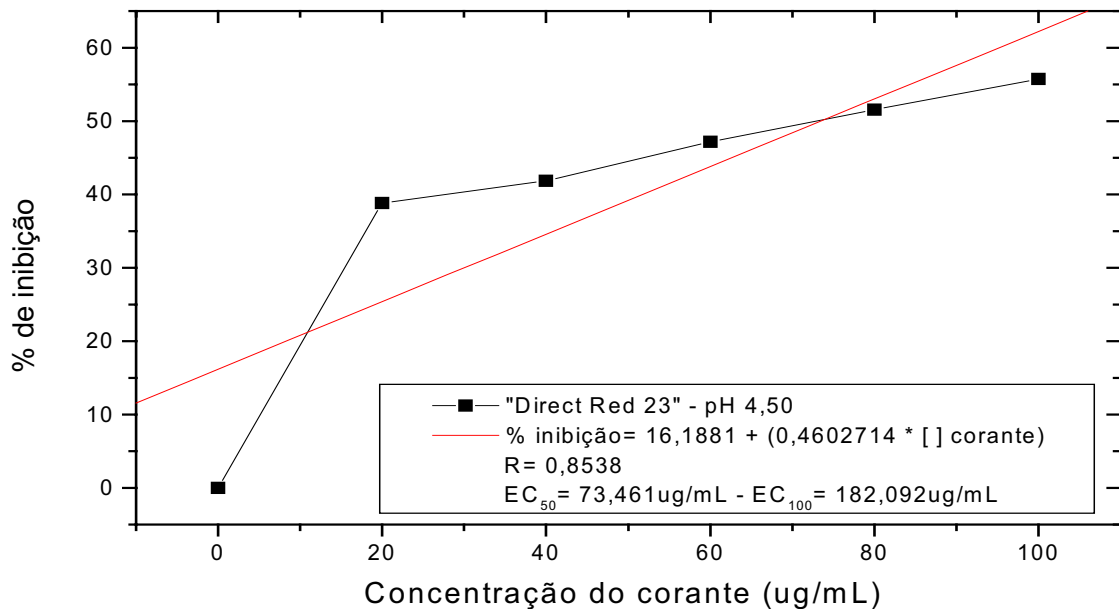


FIGURA 4.10.23. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 4,50, após 7 dias de cultivo.

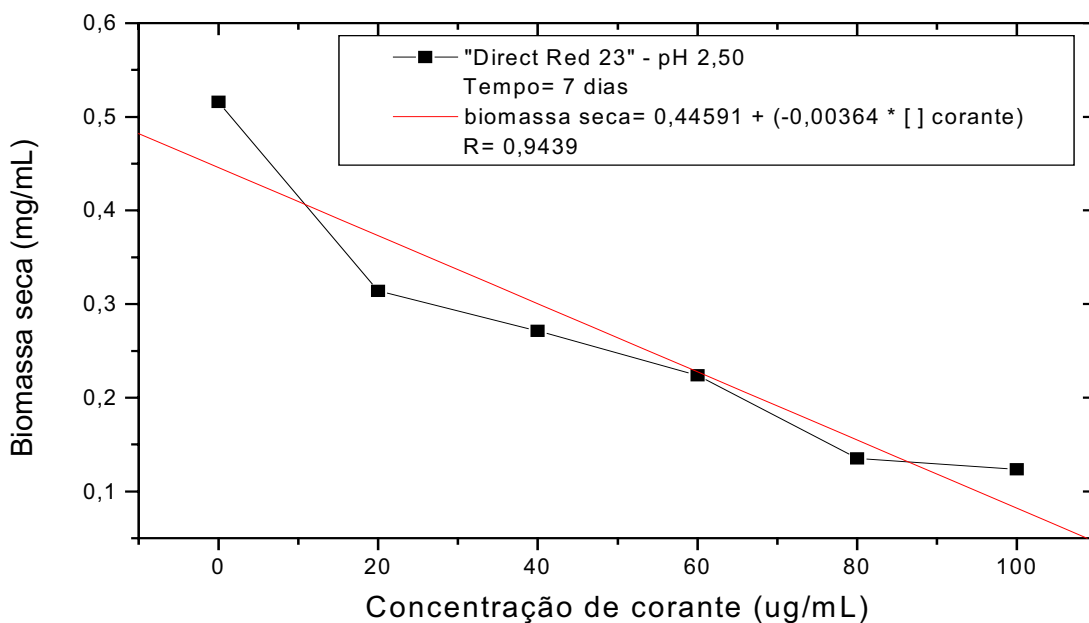


FIGURA 4.10.24. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 2,50, após 7 dias de cultivo.

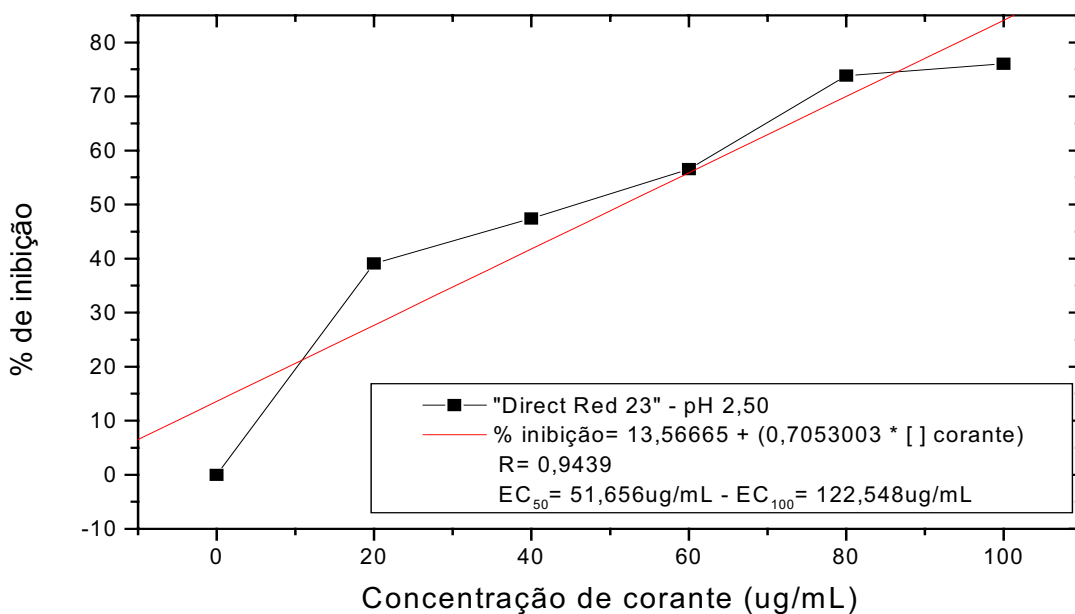


FIGURA 4.10.25. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 2,50, após 7 dias de cultivo.

Este estudo demonstrou o comportamento do fungo *Neurospora crassa* 74A à toxicidade dos corantes, esta ocorrência varia de corante para corante, sendo influenciado também pelo pH em que ocorre a interação de desenvolvimento do fungo e diferentes concentrações de corantes.

Como ficou demonstrado, *Neurospora crassa* 74A atingiu sua fase exponencial de crescimento no 7^o dia, (FIGURA 4.10.14.), tempo este que foi estabelecido para a determinação do EC₅₀ e EC₁₀₀.

A sensibilidade do fungo para os 4 corantes analisados indicou que estes corantes apresentam certo grau de toxicidade, assim como, de tolerância, no desenvolvimento do fungo.

Pelas (FIGURAS 4.10.15. a 4.10.19.), observa-se que à medida que aumenta a concentração de corante, a fase exponencial de crescimento em determinada concentração vai diminuindo, dando uma demonstração clara que, a resposta no crescimento do fungo a estes agentes se faz sentir, (FIGURAS 4.10.20. à 4.10.22 e 4.10.24.). Pode-se verificar que a produção de biomassa diminui com o aumento da concentração de corante.

Para o “Direct Red 23”, a medida que abaixa o pH pode-se perceber o aumento da toxicidade, uma vez que, o EC₅₀ diminui de 78,820ug/mL, em pH 6,50, para 51,650ug/mL, em pH 2,50, (FIGURAS 4.10.21.; 4.10.23 e 4.10.25.).

4.11. Espectro UV-Vis do corante "Erythrosine B" a diferentes valores de pH

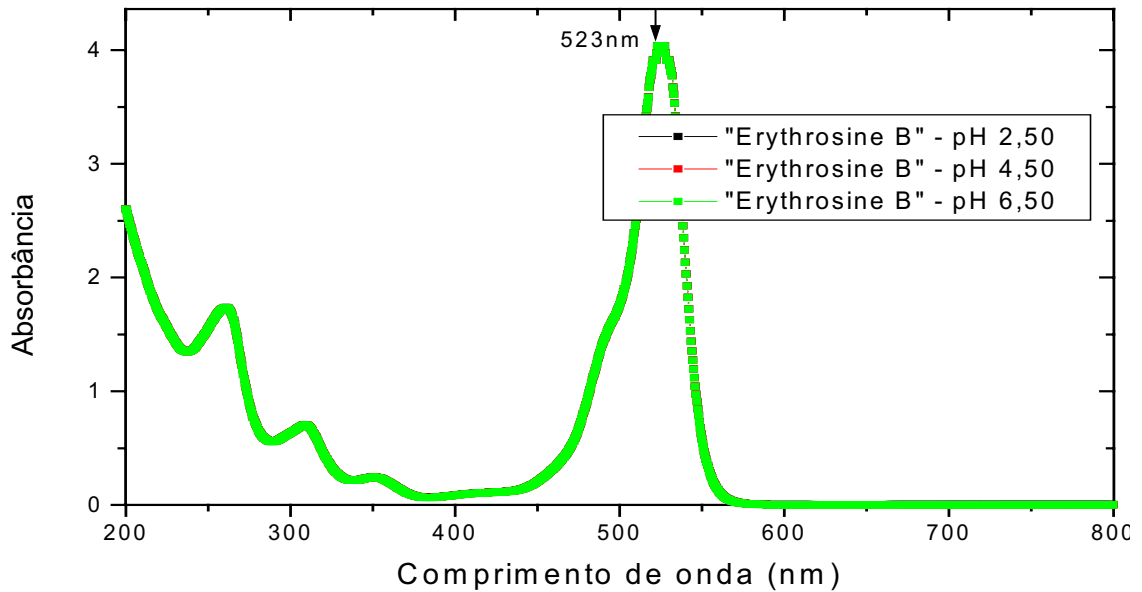


FIGURA 4.11.1. Varredura espectral do corante "Erythrosine B", nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100µg/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{523\text{nm}} = 0,00123 + (0,01 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99998

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{523\text{nm}} = -3,33333\text{E-}04 + (0,011041 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99997

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{523\text{nm}} = 9\text{E-}04 + (0,01057 \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99996

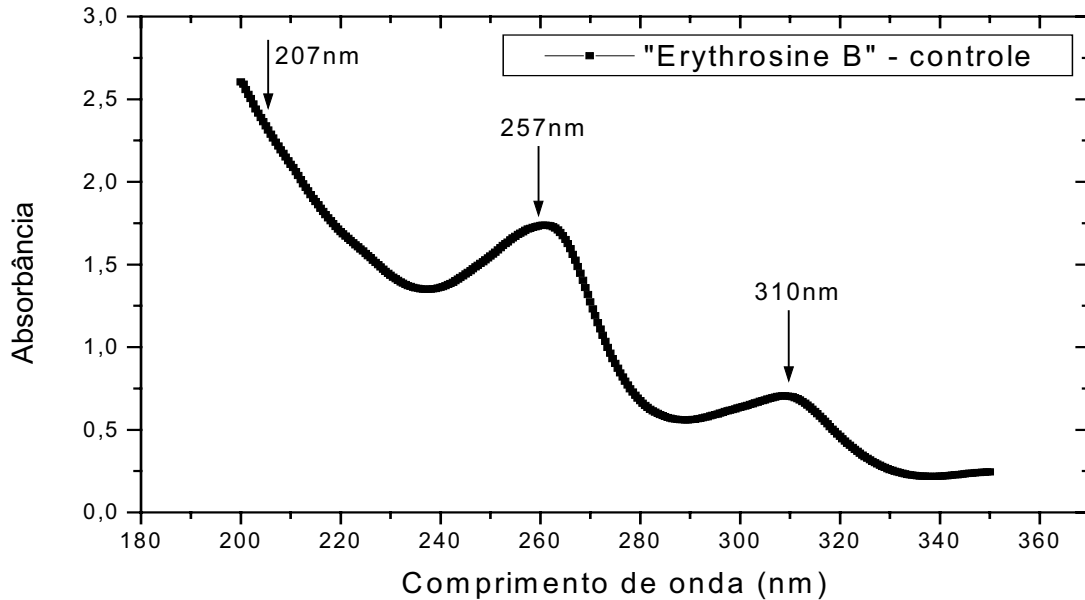
Análise em Espectro UV-Vis

FIGURA 4.11.2. Varredura espectral do corante “Erythrosine B” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100µg/mL; comprimento de onda de 200-800nm; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

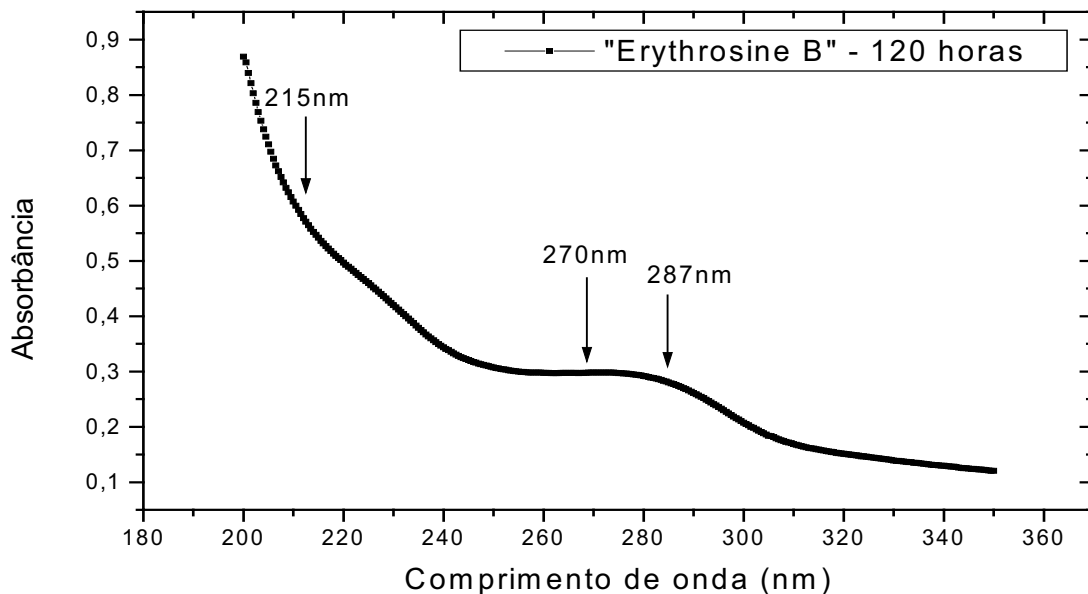


FIGURA 4.11.3. Varredura espectral do corante “Erythrosine B” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100µg/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

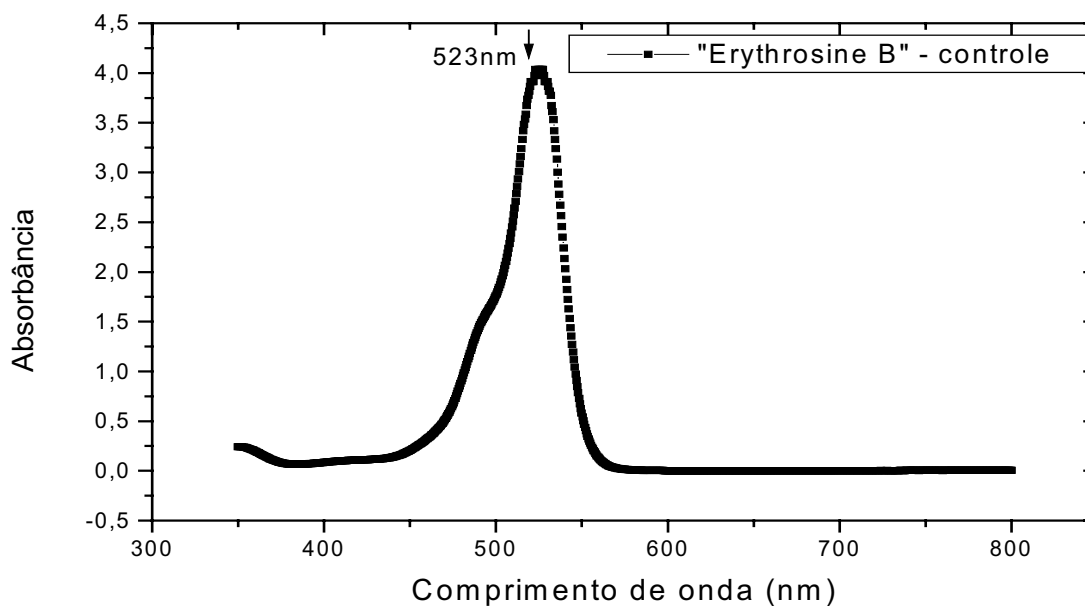


FIGURA 4.11.4. Varredura espectral do corante “Erythrosine B” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

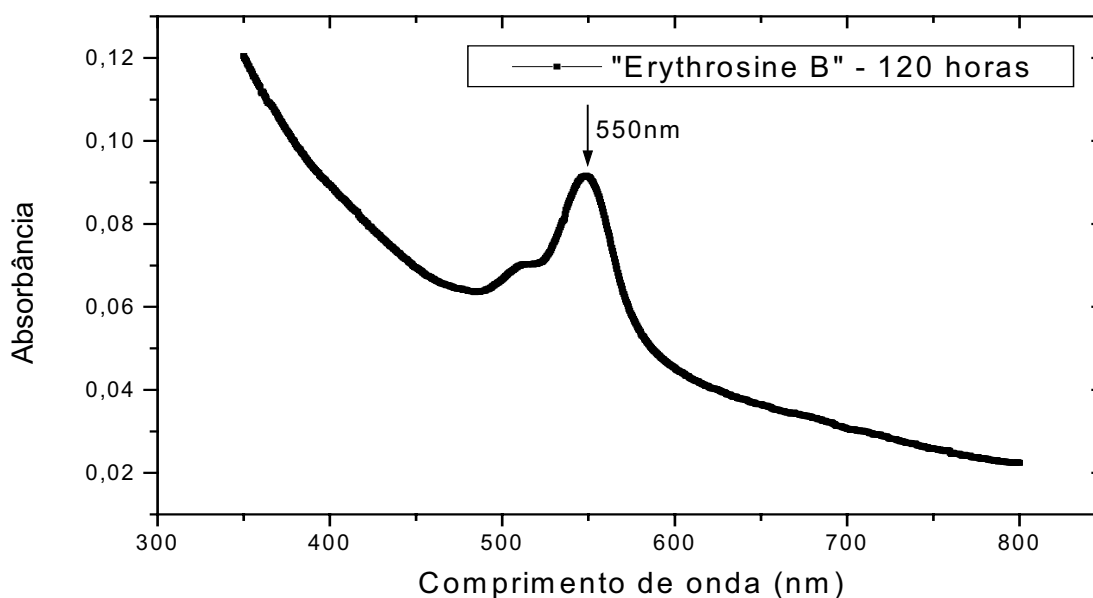


FIGURA 4.11.5. Varredura espectral do corante “Erythrosine B” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100 μ g/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

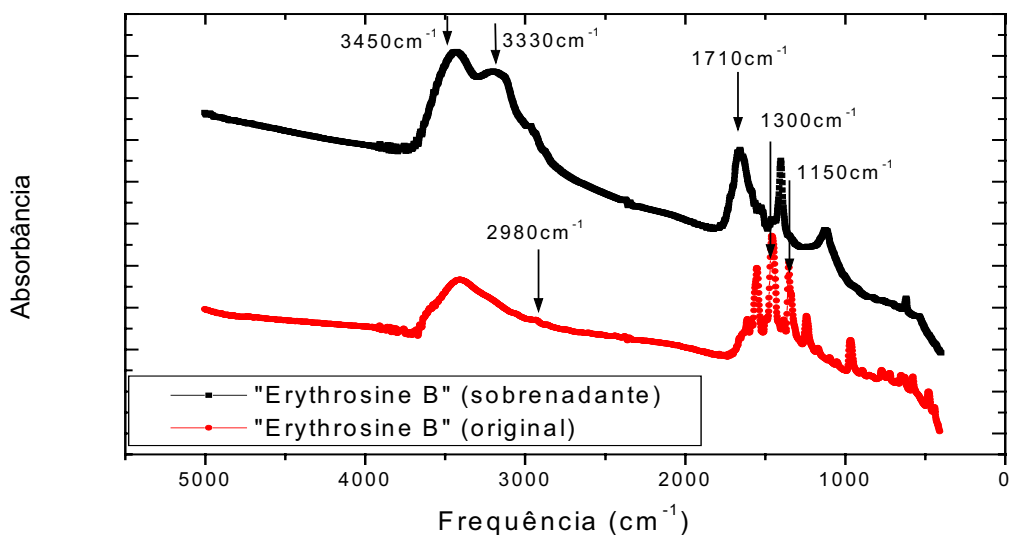


FIGURA 4.11.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} do corante "Erythrosine B" no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

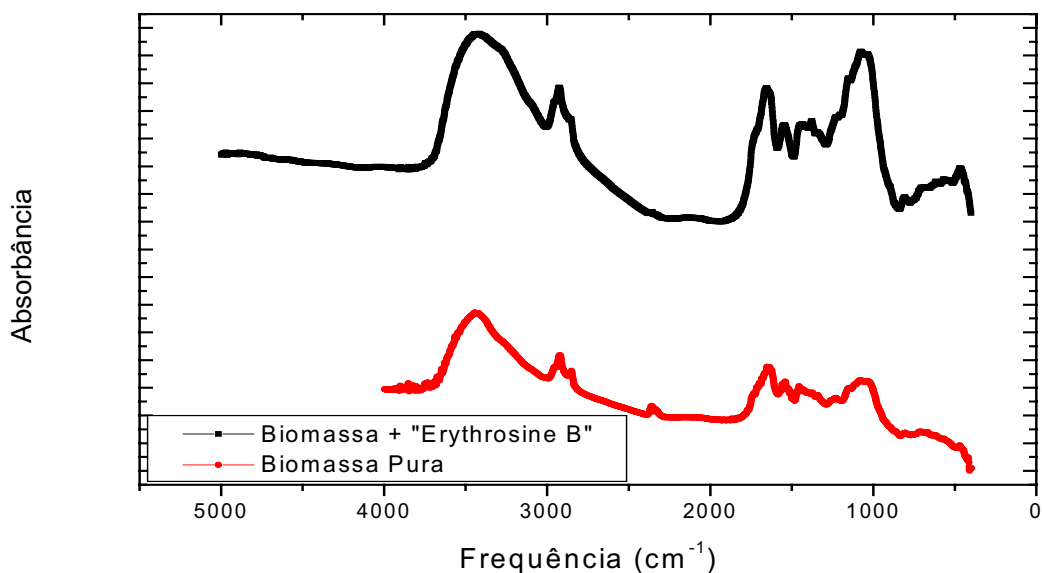


FIGURA 4.11.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000 cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante "Erythrosine B" por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

FIGURA 4.11.1. mostra que este corante apresenta absorvância estável quando submetido a variações dos valores de pH.

Na FIGURA 4.11.2. o corante apresenta bandas em 207 e 257nm, característicos das bandas de aromáticos halogenados (DYER, 1969), e banda em 310nm, típicos da ramificação quinólica. Já nos espectros do visível, este corante apresenta as suas propriedades cromóforas, com bandas em 523nm. (FIGURA 4.11.4.). Após 120 horas (FIGURA 4.11.3.), apresenta uma ondulação em 215nm, sugerindo a formação de benzeno sulfuroso (PASTO e JOHNSON, 1977). Entre 270 e 287nm ocorre a formação de banda difuso, sugerindo a presença de ácido benzóico em 270nm e íon fenóxido em 287nm (PASTO e JOHNSON, 1977). No visível (FIGURA 4.11.5.), ocorre um deslocamento de banda para 550nm.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

Na FIGURA 4.11.6., referente aos espectros de FTIR, podemos constatar que no controle há uma banda em torno de 3450cm^{-1} , provavelmente, segundo SILVERSTEIN et al., (1987), devido ao benzoato e ao oxano. Uma ligeira banda em 2980cm^{-1} , característico do grupo quinólico, o mesmo aconteceu em 1675cm^{-1} . Outras bandas características podem ser encontradas em 1300cm^{-1} e 1150cm^{-1} , atribuídas ao benzoato de sódio. Após 120 horas de contato com a biomassa de *N. crassa*, verificou-se o aparecimento de 2 bandas em 3450cm^{-1} e 3330cm^{-1} , provavelmente devido à formação de fenol. Em 1710cm^{-1} ocorreu o surgimento de uma banda nova, presumivelmente pela transformação de benzoato em ácido benzóico. Na FIGURA 4.11.7. constatou-se que a diferença entre controle e a biomassa, depois de 120 horas, apresenta características de biosorção, indicando que as células de *N. crassa* liberaram enzimas extracelulares, que transformaram o corante residual, atuando relativamente pouco nas moléculas de corante que estavam aderidas na parede celular.

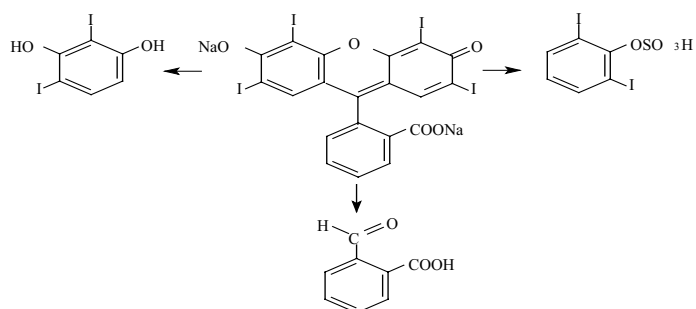


FIGURA 4.11.8. Corante “Erythrosine B”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

TESTE DE BIOSORTIVIDADE DO CORANTE “ERYTHROSINE B” EM DIFERENTES VALORES DE pH

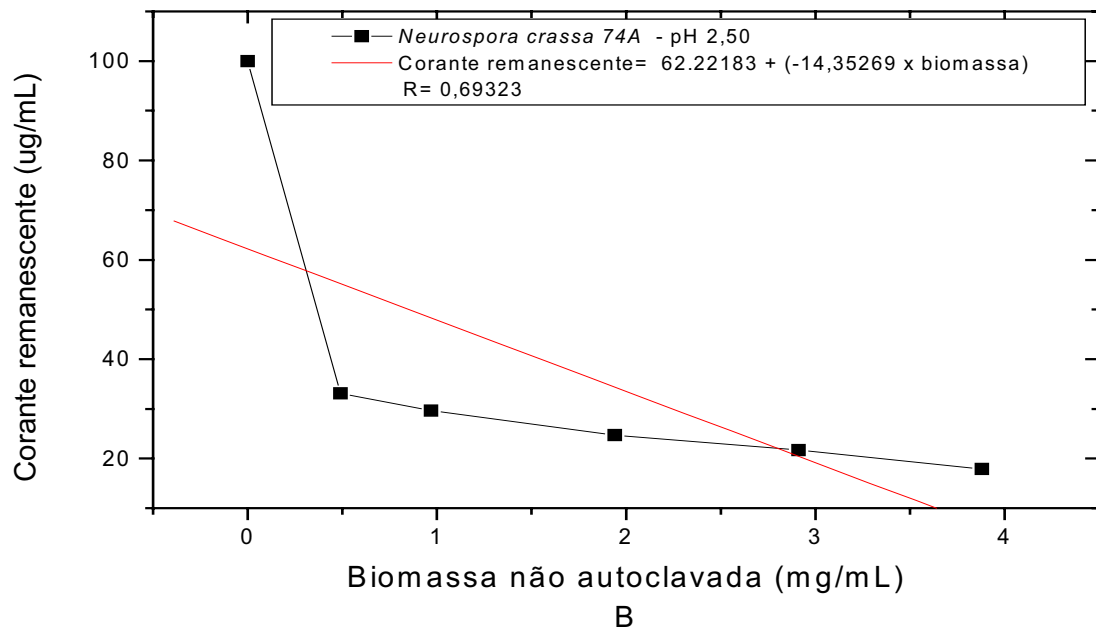
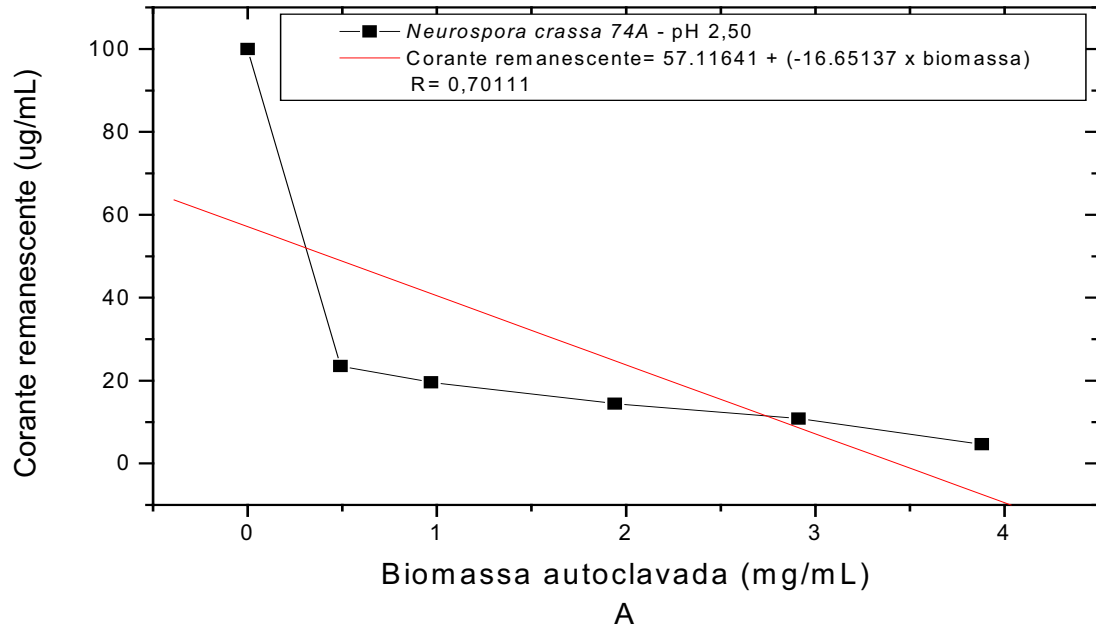


FIGURA 4.11.9. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante “Erythrosine B” (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 2,50; 30°C; 120 minutos de contato).

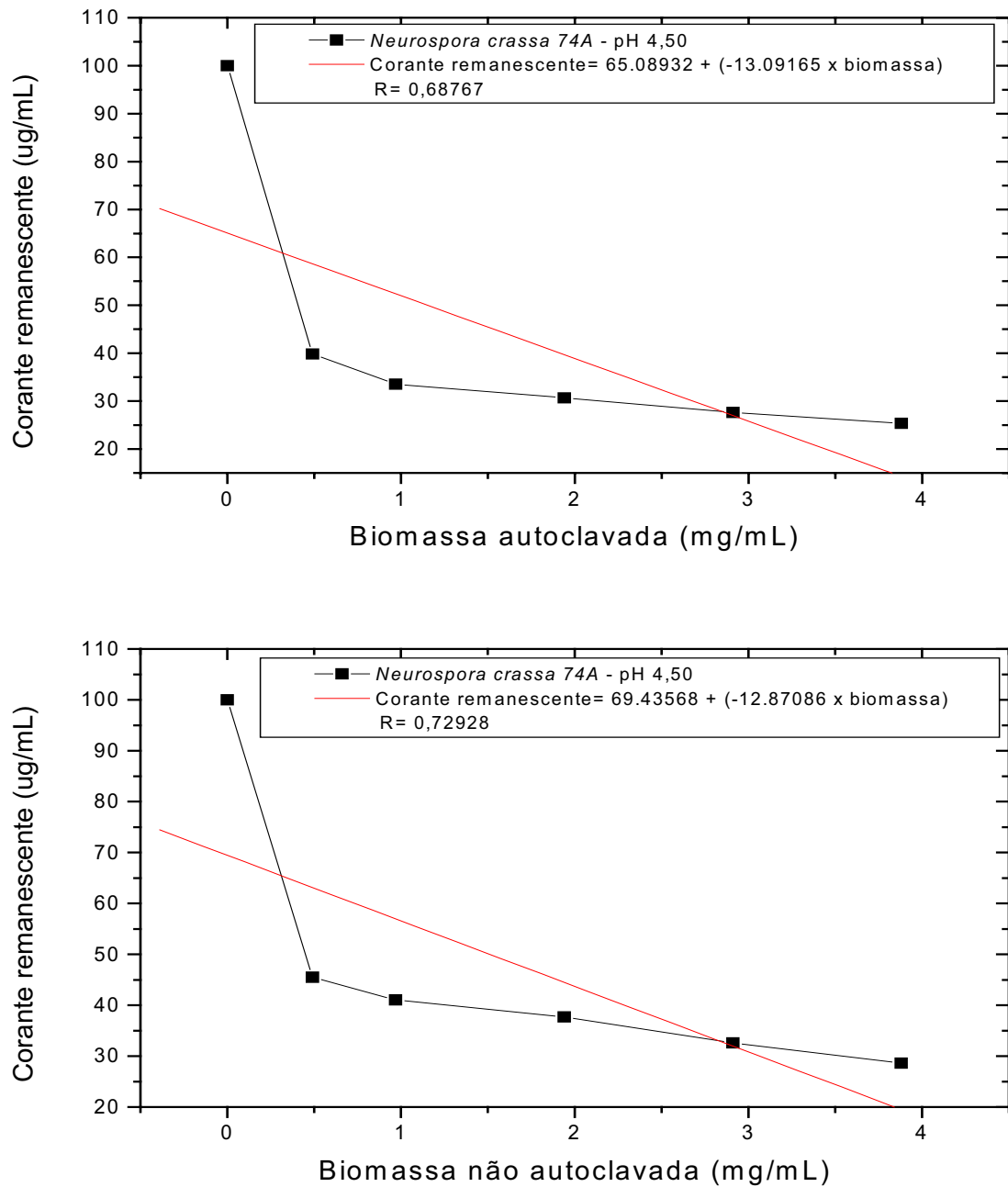


FIGURA 4.11.10. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante “Erythrosine B” (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 4,50; 30°C; 120 minutos de contato).

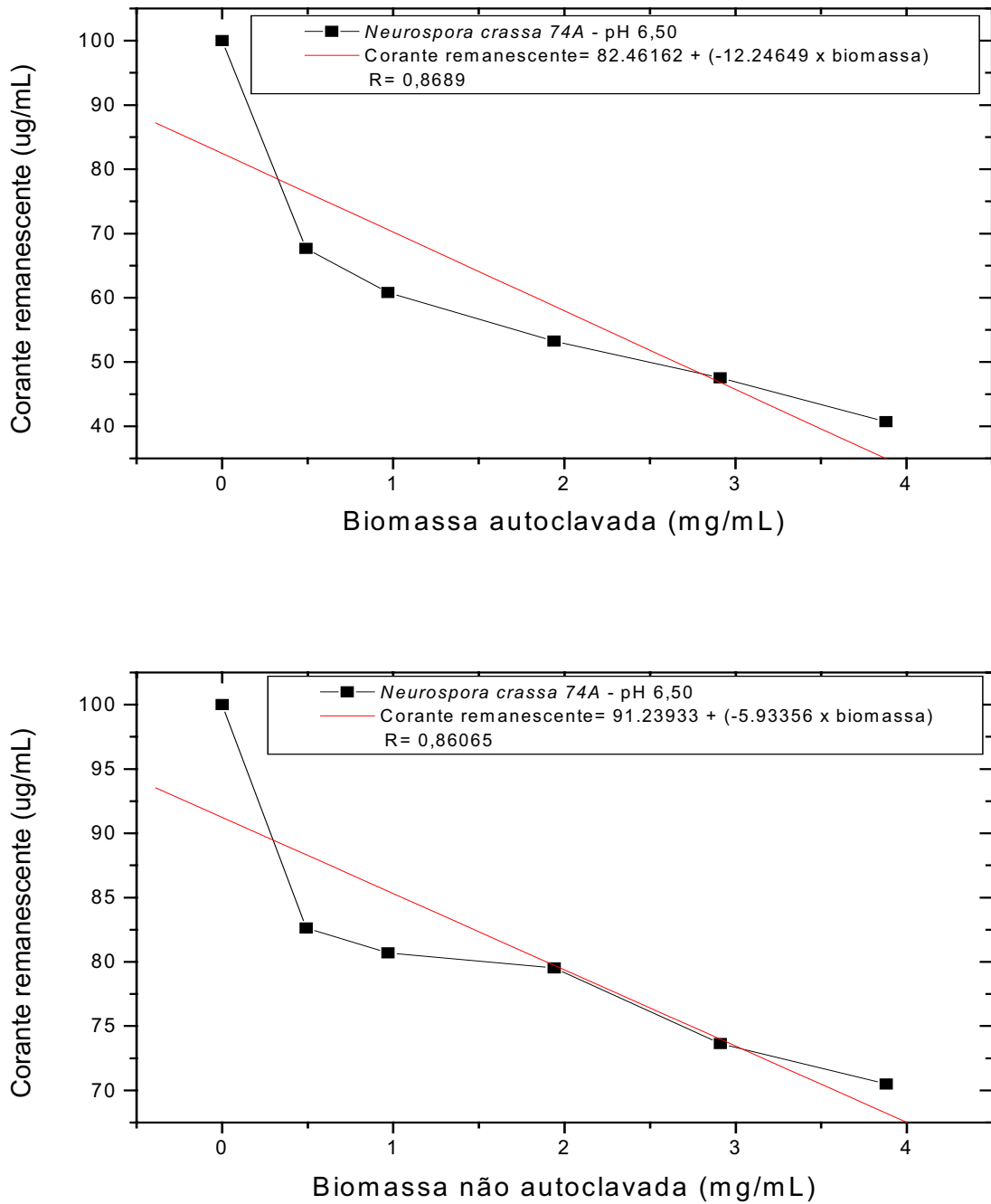


FIGURA 4.11.11. . *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante “Erythrosine B” (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 6,50; 30°C; 120 minutos de contato).

Os testes de biosorção em diferentes valores de pH do corante “Erythrosine B”; na concentração inicial de 100µg/mL e o fungo *Neurospora crassa* 74A, autoclavada e não autoclavada, indicaram que o meio mais ácido é mais eficaz na remoção do corante em solução aquosa, e que a biomassa autoclavada funciona como melhor substrato, do que a biomassa viva, no tempo de contato de 120 minutos. Conforme as estimativas das quantidades de biomassas necessárias para promover a remoção total dos corantes avaliados, nos valores de pH 2,50; 4,50 e 6,50. Estes resultados estão indicados nas (FIGURAS 4.11.9., 4.11.10., 4.11.11.).

Há demais aplicações científicas deste com corante, relacionando-se com biomassa microbiana, neste sentido SHARF, (1978), elaborou o teste de viabilidade celular para leveduras, utilizando o corante eritrosina, o qual indicaria pela coloração, as células que estavam mortas.

CORSO, (1998), relata que os fungos autoclavados apresentam melhor mecanismo de remoção do corante em solução aquosa. Já as células fúngicas vivas agem como se o corante fosse um corpo estranho e que necessita ser removido, através de sistemas enzimáticos, os quais dificultariam os sítios adsortivos a receberem as moléculas do corante. Por outro lado, no momento em que ocorre autoclavagem, estes sistemas enzimáticos cessam, e as células se tornam um substrato mais propício à aproximação de moléculas estranhas.

**TESTE DE BIOSORTIVIDADE DO CORANTE "ERYTHROSINE B"
SEGUNDO AS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE FREUNDLICH LANGMUIR**

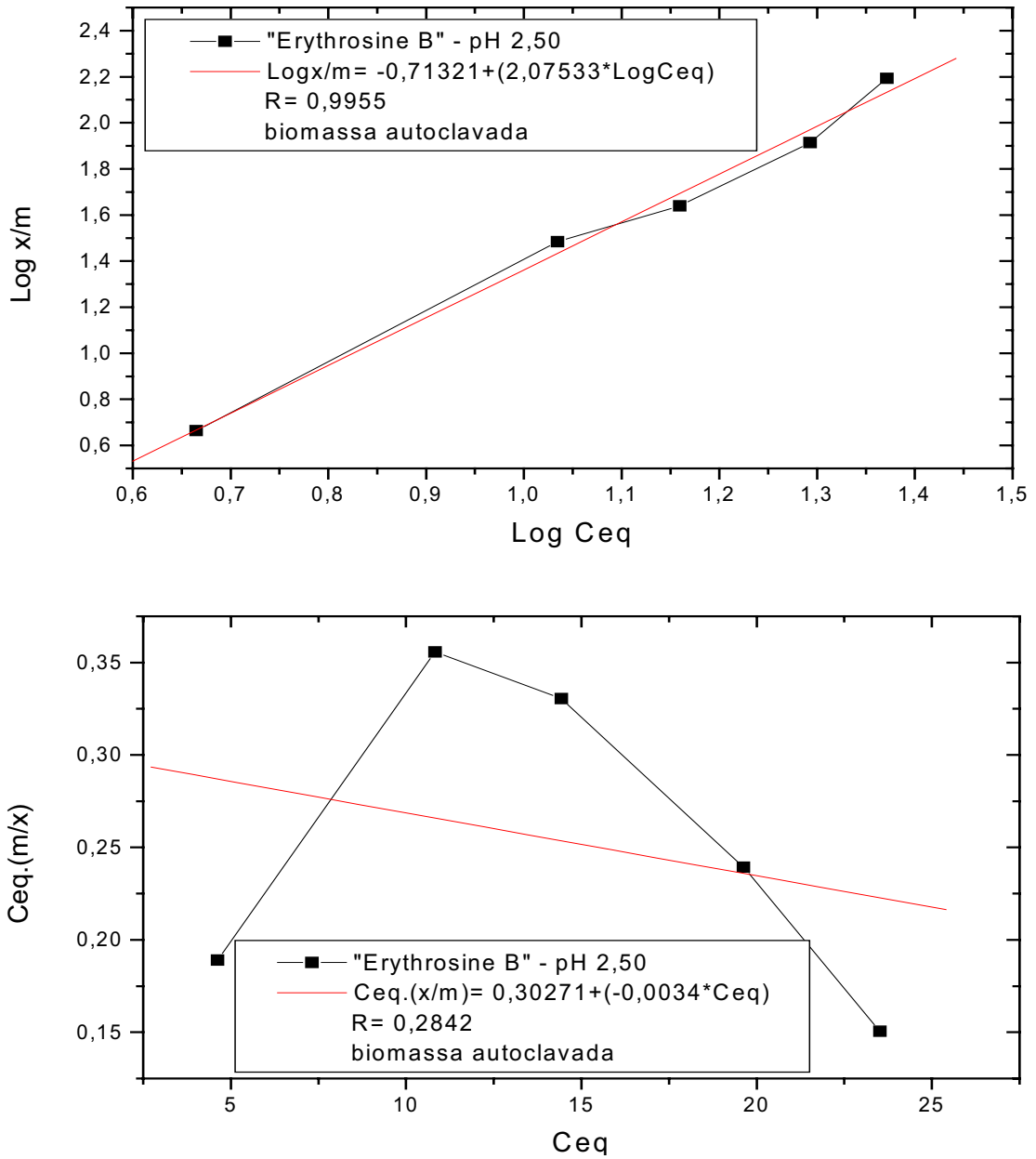


FIGURA 4.11.12. Estudo da biosorção do corante "Erythrosine B", por biomassa de *Neurospora crassa* 74A, autoclavada, realizado através das Isotermas de Freundlich (A) e Langmuir (B), no pH 2,50; 30°C; concentração inicial do corante de 100µg/mL; concentração de biomassa variando de 0,755 a 6,04µg/mL e tempo de contato de 120 minutos.

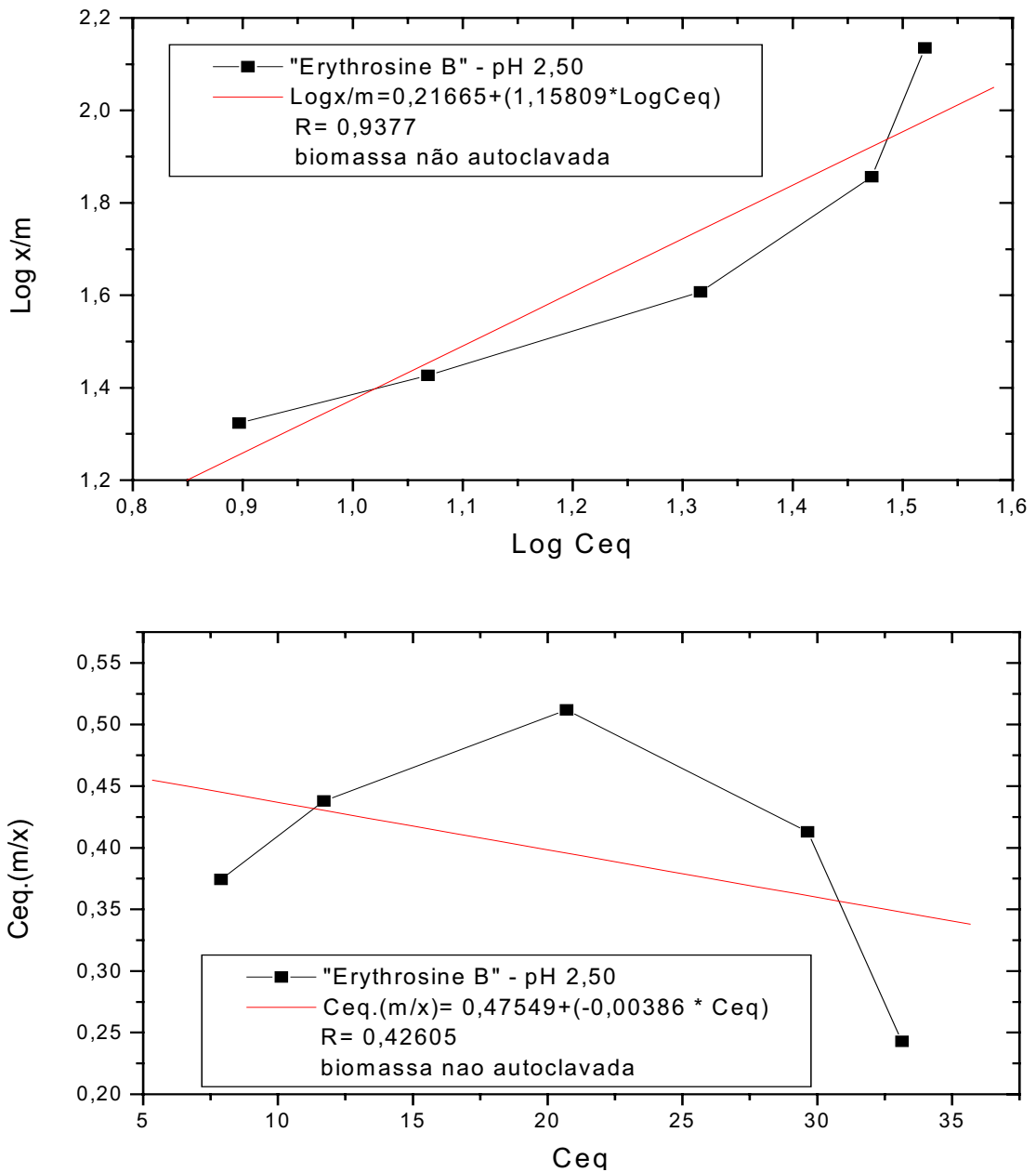


FIGURA 4.11.13. Estudo da biosorção do corante "Erythrosine B", por biomassa de *Neurospora crassa* 74A, não autoclavada, realizado através das Isotermas de Freundlich (A) e Langmuir (B), no pH 2,50; 30°C; concentração inicial do corante de 100µg/mL; concentração de biomassa variando de 0,755 a 6,04µg/mL e tempo de contato de 120 minutos.

A equação que relaciona a quantidade de moléculas sobre uma superfície à pressão e à temperatura constante, é denominada Isoterma de Adsorção, (MOORE, 1968).

As moléculas e átomos podem atacar a superfície de duas maneiras, fisicamente ou quimicamente. Na adsorção física, ou fisiosorção, ocorre uma interação de van der Waals entre o adsorbato e o substrato. Tais interações podem ser extensas, porém fracas, e a energia que é liberada quando a partícula é fisiosorvida é tão pequena que pode ser adsorvida como vibração de baixa intensidade, na verdade, as moléculas ficam aderidas à superfície após um processo de acomodação entre as forças atuantes no equilíbrio.

Por sua vez, na quimiosorção, ou adsorção química, as partículas interagem com a superfície, formando uma ligação química, usualmente ligações covalentes, e tendem a encontrar um número máximo de sítios com o substrato. A entalpia da quimiosorção é muito maior do que o da fisiosorção, uma molécula quimiosorvida pode ser removida separadamente se a valência da ligação não estiver correspondendo com a da superfície, (ATKINS, 1991).

A Isoterma de Langmuir baseia-se no recobrimento gradual de uma superfície pelas moléculas adsorvidas, dando-se a saturação quando a camada adsorvida tem a espessura uniforme de uma molécula. A Isoterma é especialmente aplicável aos casos de quimiosorção, onde as moléculas adsorvidas são mantidas na superfície por ligações comparáveis às dos compostos químicos, ficam em equilíbrio e formam uma mono camada, (CASTELLAN, 1964).

No entanto, como pode surgir também uma espécie de adsorção onde a camada quimiosorvida pode desempenhar o papel de um composto intermediário no processo de catálise da reação, em que ocorra ligações molécula-molécula do adsorbato, formando multicamadas e intercalando os processos de fisiosorção e quimiosorção. Surgiram outras Isotermas de Adsorção para tentarem melhor explicar cada fenômeno adsorativo, como a Equação de Freundlich que utiliza as proporções logarítmicas para analisar as possibilidades de reações, as quais permitem avaliar se um determinado

fenômeno é resultado de adsorção em monocamadas ou em multicamadas. Associando-se as variáveis a um sistema de regressão, permitindo verificar qual apresenta melhor correlação entre cada equação estudada, (ATKINS, 1991).

A aplicação das equações de Freundlich e Langmuir para a interação entre o fungo *Neurospora crassa* 74A e o corante “Erythrosine B” em pH 2,50, demonstra que a Equação de Freundlich foi a mais favorável, apresentando melhores coeficientes de regressão em todas as situações estudadas, tanto em biomassas não autoclavadas (FIGURA 4.11.12.) e autoclavadas (FIGURA 4.11.13.). Portanto, a adsorção ocorre por multicamadas de moléculas de corantes.

Para se realizar estes testes foram utilizados parâmetros semelhantes aos demais ensaios realizados, ou seja, manteve-se a concentração de corante constante e variou-se a concentração de biomassa para uma quantidade crescente.

TESTE DE TOLERÂNCIA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO CORANTE "ERYTHROSINE B"

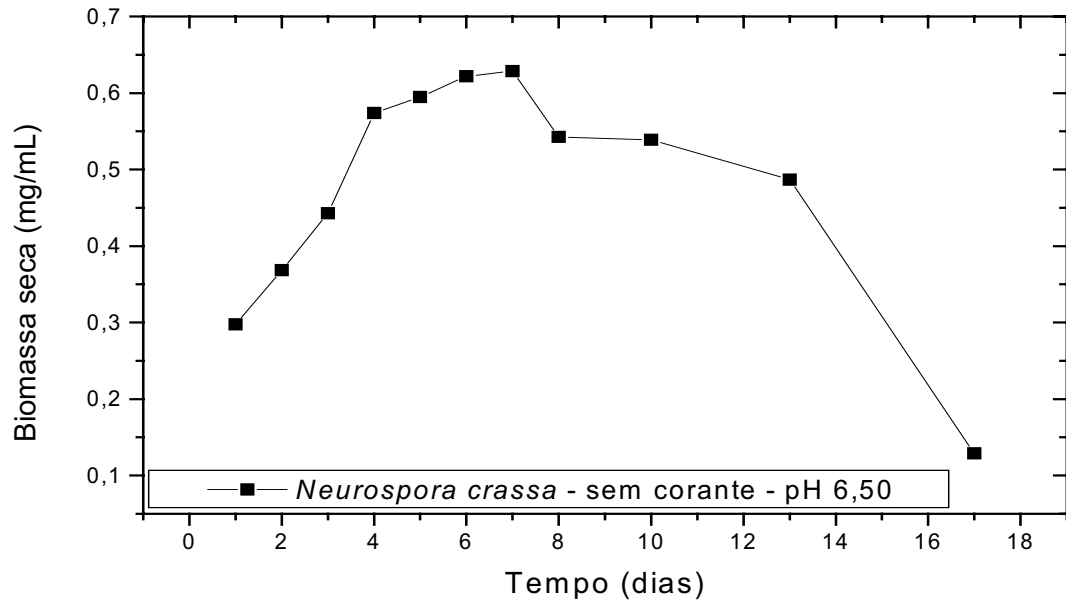


FIGURA 4.11.14. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, sem a adição do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias (controle).

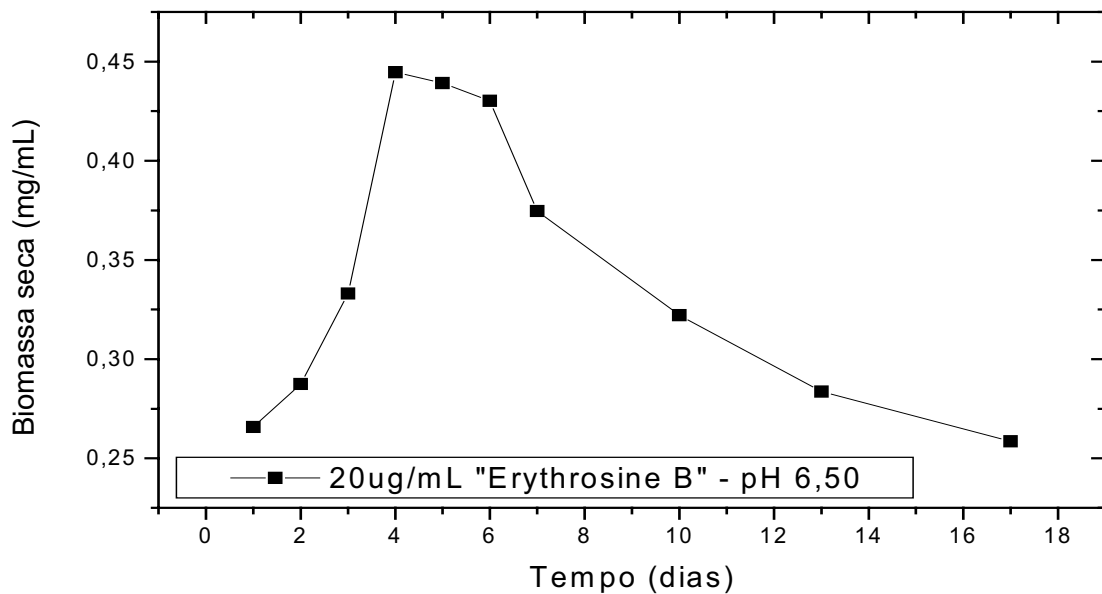


FIGURA 4.11.15. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 20ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

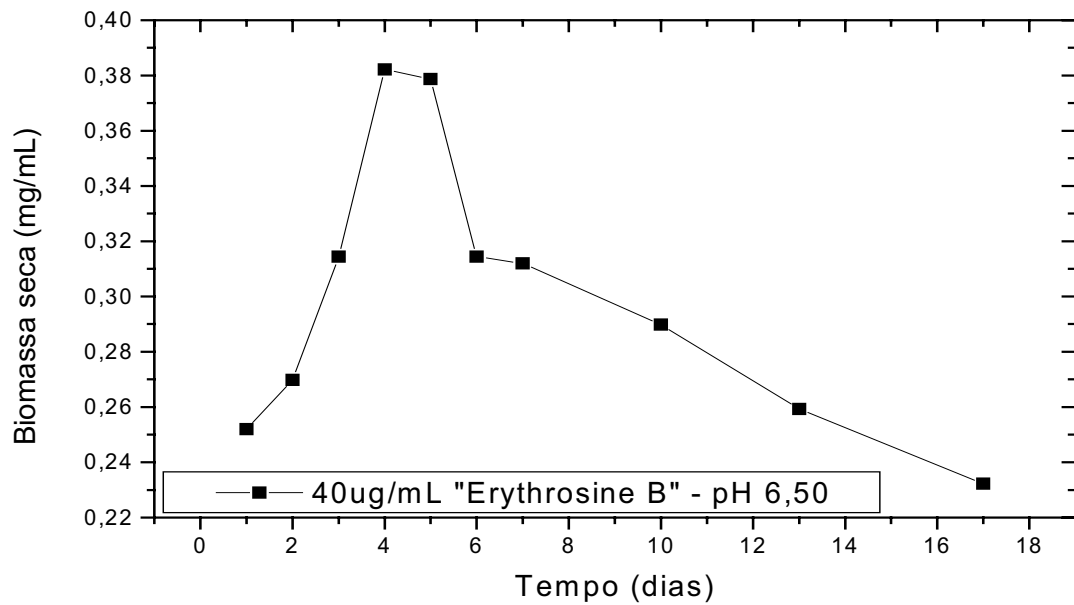


FIGURA 4.11.16. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 40ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

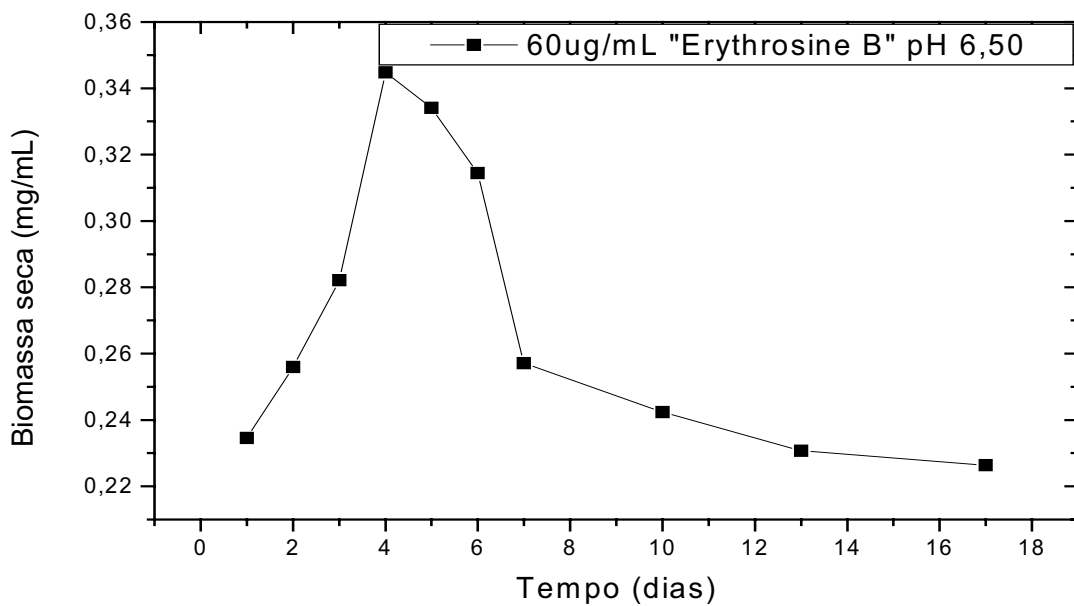


FIGURA 4.11.17. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 60ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

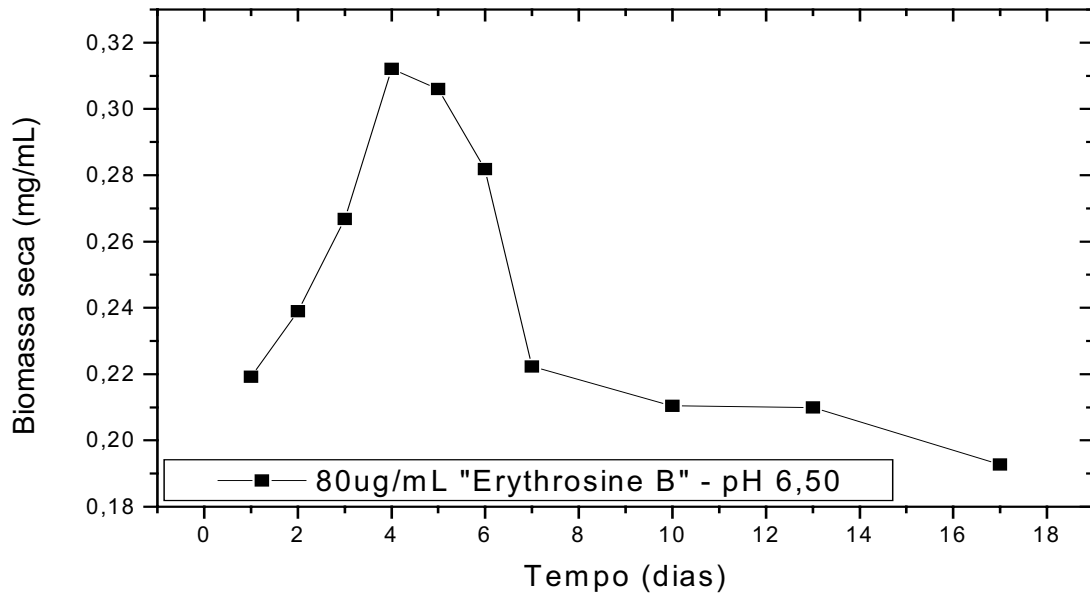


FIGURA 4.11.18. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 80ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

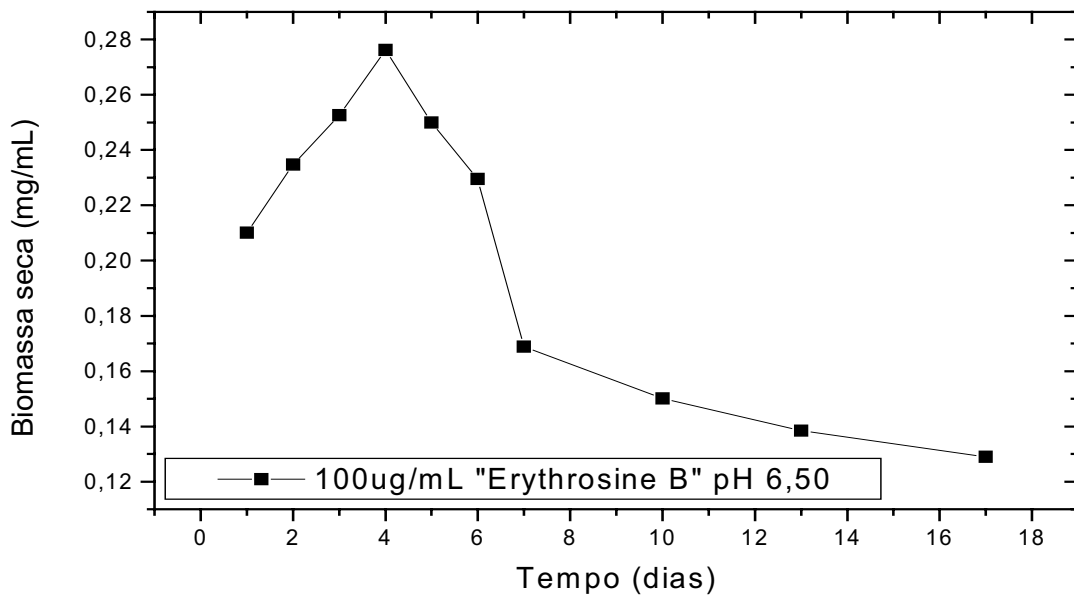


FIGURA 4.11.19. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 100ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

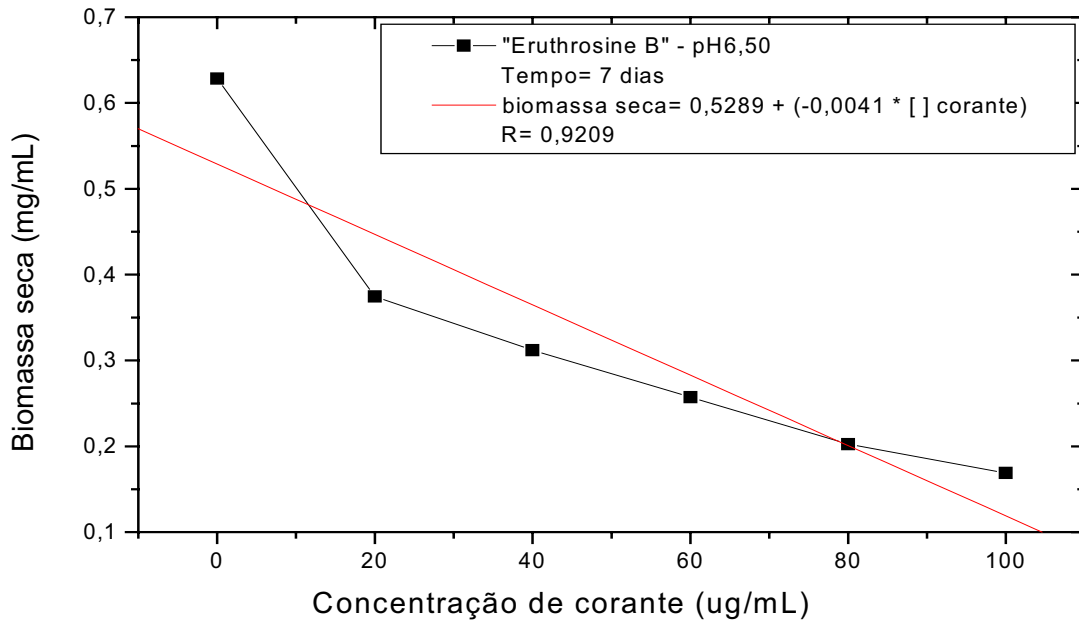


FIGURA 4.10.20. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 6,50, após 7 dias de cultivo.

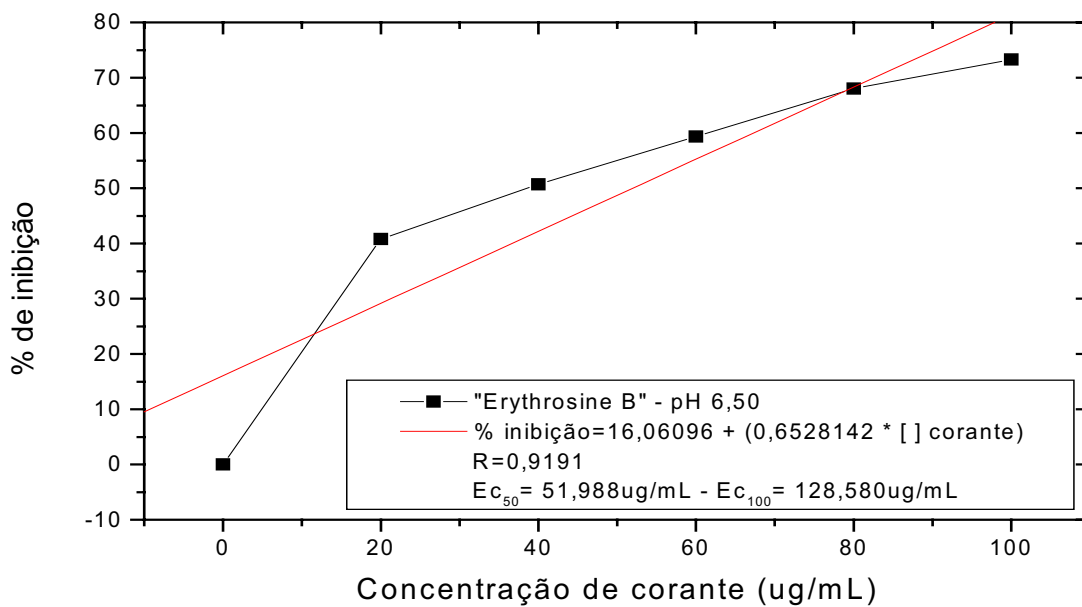


FIGURA 4.11.21. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 6,50, após 7 dias de cultivo.

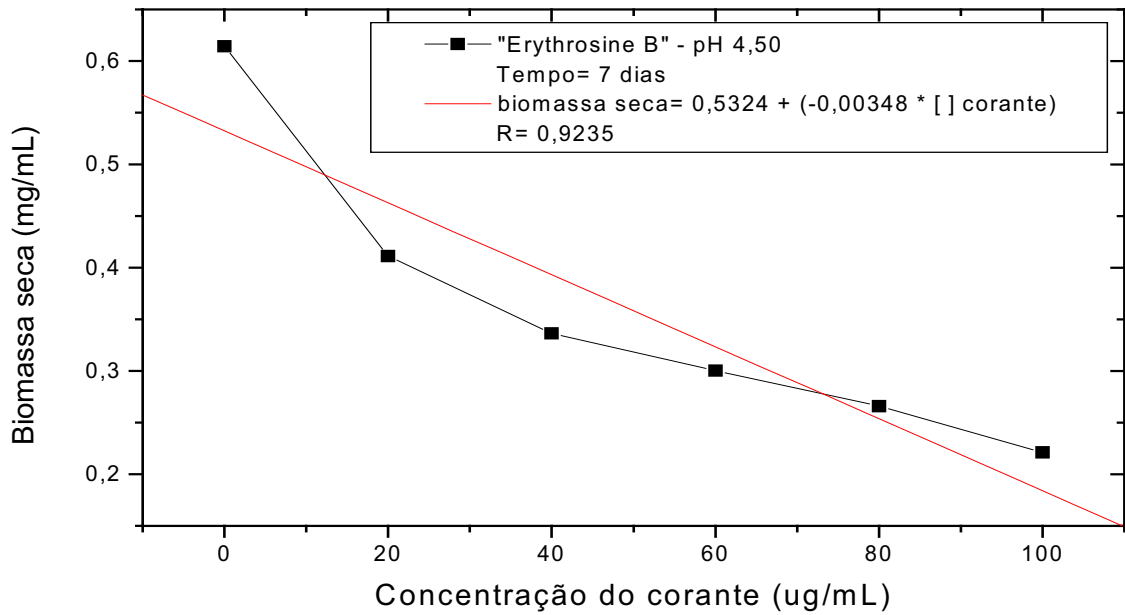


FIGURA 4.11.22. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 4,50, após 7 dias de cultivo.

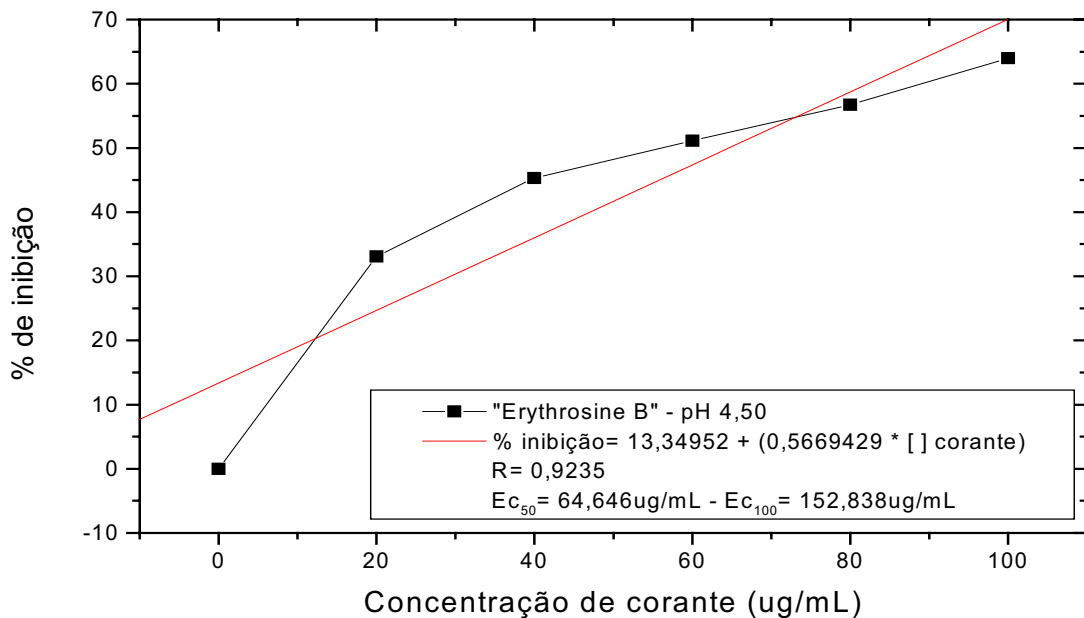


FIGURA 4.11.23. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 4,50, após 7 dias de cultivo.

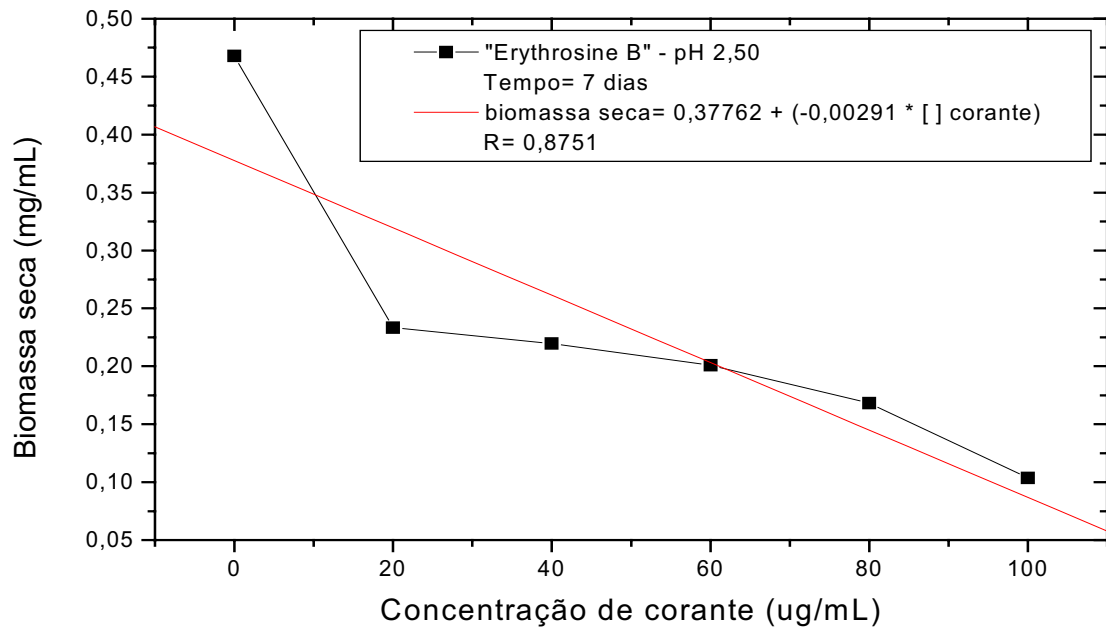


FIGURA 4.11.24. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 2,50, após 7 dias de cultivo.

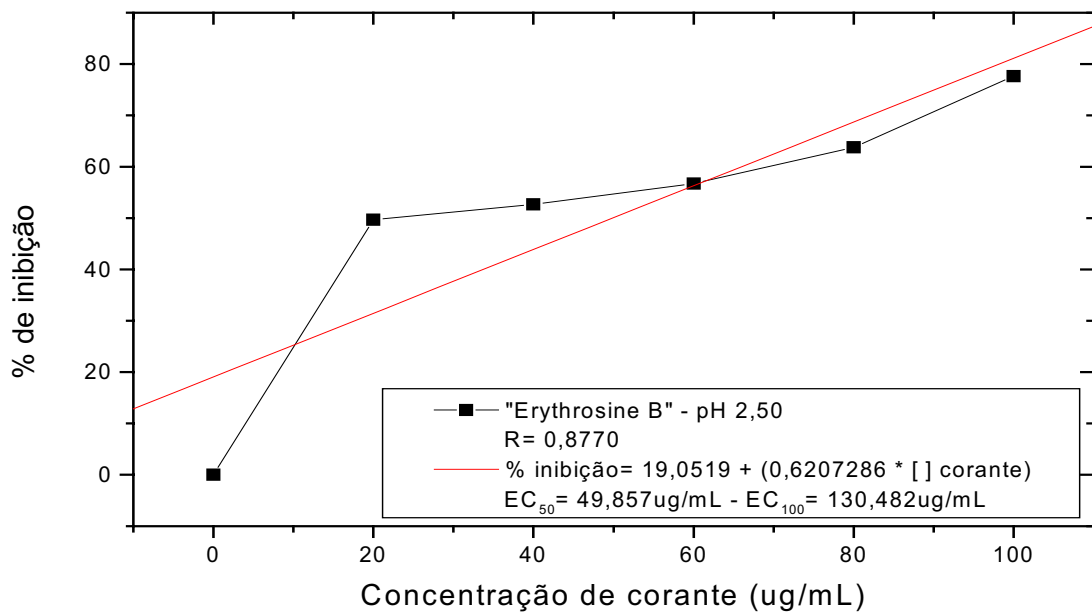


FIGURA 4.11.25. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 2,50, após 7 dias de cultivo.

Este estudo demonstrou o comportamento do fungo *Neurospora crassa* 74A à toxicidade do corante “Erythrosine B”, sendo influenciado também pelo pH em que ocorre a interação de desenvolvimento do fungo e diferentes concentrações do corante.

Como ficou demonstrado, *Neurospora crassa* 74A atingiu sua fase exponencial de crescimento no 7^o dia, (FIGURAS 4.11.14.), tempo este que foi estabelecido para a determinação do EC₅₀ e EC₁₀₀.

A sensibilidade do fungo para os 4 corantes analisados indicou que estes corantes apresentam certo grau de toxicidade, assim como, de tolerância, no desenvolvimento do fungo.

Pelas FIGURAS 4.11.15. a 4.11.19.), observa-se que a medida que aumenta a concentração de corante, a fase exponencial de crescimento em determinada concentração vai diminuindo, dando uma demonstração clara que, a resposta no crescimento do fungo a estes agentes se faz sentir, (FIGURAS 4.11.20. a 4.11.22 e 4.11.24.). Pode-se verificar que a produção de biomassa diminui com o aumento da concentração de corante.

No que se refere a “Erythrosine B”, pode-se perceber que em pH 4,50 ocorre diminuição da toxicidade com o aumento do EC₅₀, (FIGURAS 4.11.21.; 4.11.23. e 4.11.25.).

Pode-se verificar também que o EC₁₀₀ acompanha os parâmetros proporcionais do EC₅₀, em todos os casos.

4.12. Espectro UV-Vis do corante “Procion Red MX-5B” a diferentes valores de pH

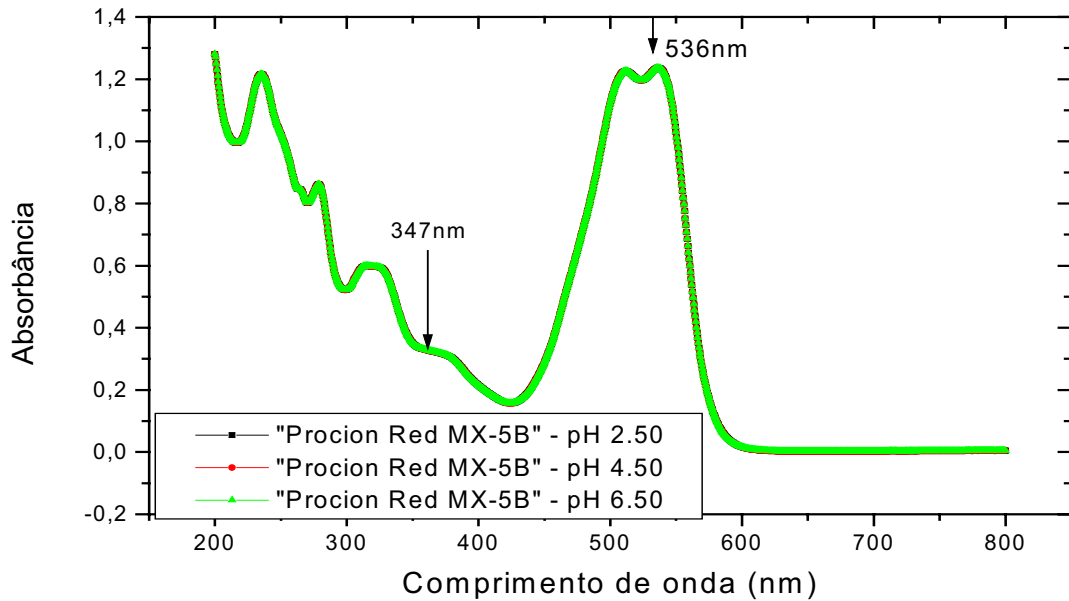


FIGURA 4.12.1. Varredura espectral do corante “Procion Red MX-5B”, nos valores de pH de 2,50; 4,50 e 6,50. Concentração do corante de 100µg/mL; comprimento de onda de 200-800nm, caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

pH 2,50

$$\text{Absorbância}^{536\text{nm}} = -3,33333 \cdot 10^{-5} + (3,23046 \cdot 10^{-4} \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99999

pH 4,50

$$\text{Absorbância}^{536\text{nm}} = 3 \cdot 10^{-4} + (6,36564 \cdot 10^{-4} \times \text{concentração do corante})$$

R= 0,99999

pH 6,50

$$\text{Absorbância}^{536\text{nm}} = -0,00303 + (8,732 \cdot 10^{-4} \times \text{concentração corante})$$

R= 0,99998

Análise em Espectro UV-Vis

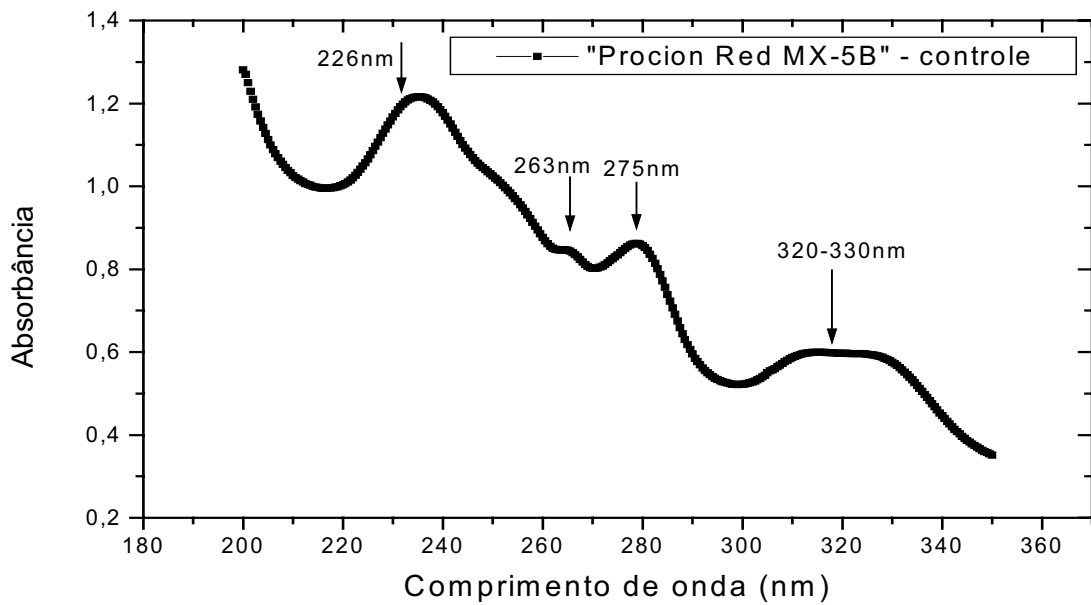


FIGURA 4.12.2. Varredura espectral do corante “Procion Red MX-5B” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100µg/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

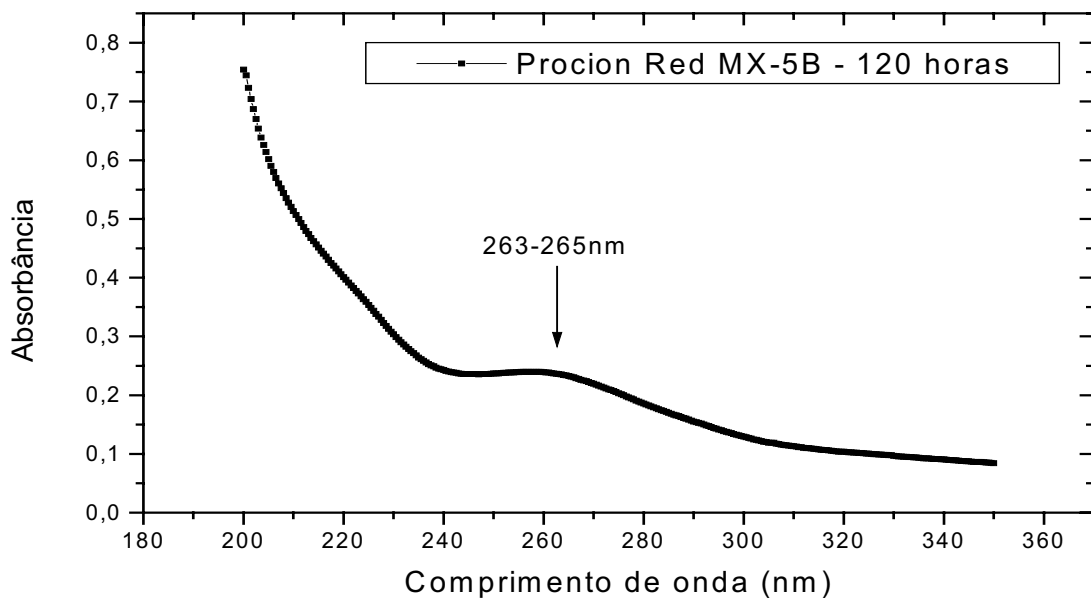


FIGURA 4.12.3. Varredura espectral do corante “Procion Red MX-5B” de 200-350nm (ultravioleta), concentração do corante de 100µg/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

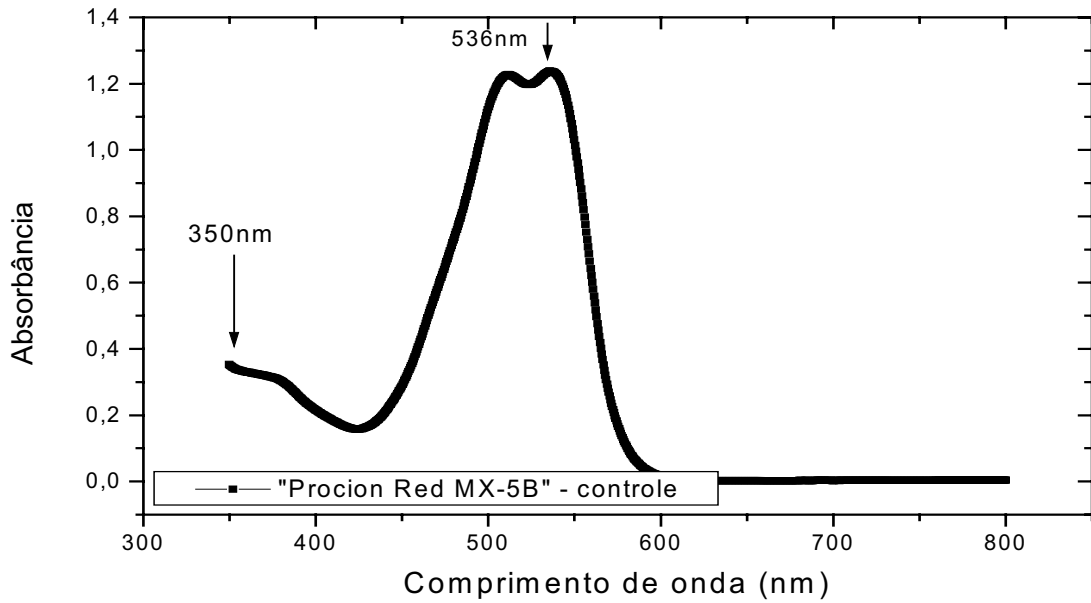


FIGURA 4.12.4. Varredura espectral do corante “Procion Red MX-5B” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100µg/mL; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

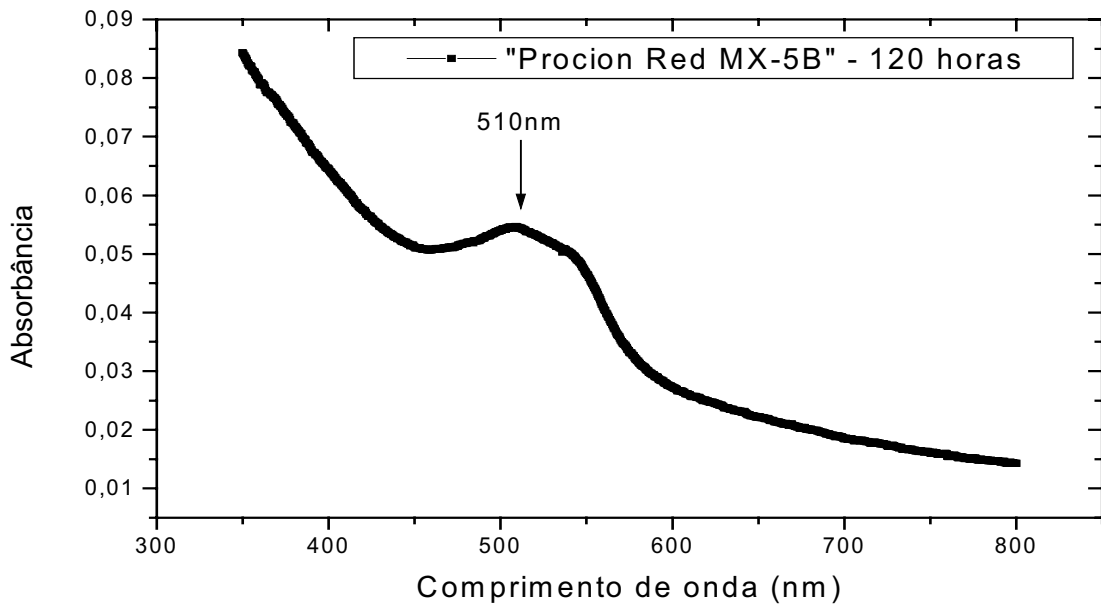


FIGURA 4.12.5. Varredura espectral do corante “Procion Red MX-5B” de 350-800nm (visível), concentração do corante de 100µg/mL; após 120 horas de contato; pH 2,50; caminho óptico de 5mm; cubeta de Quartzo; leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

Análise em Espectro FT-IR

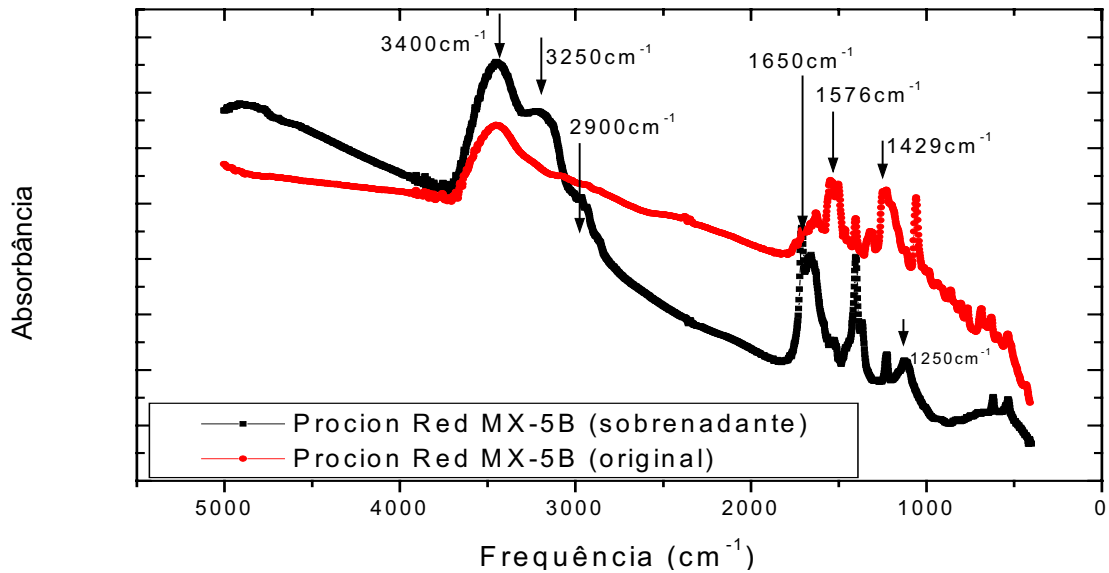


FIGURA 4.12.6. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} do corante "Procion Red MX-5B" no pH 2,50 (original e após 120 horas de contato), na forma de pastilha preparadas na proporção de 1mg do corante (massa seca) para 149mg de KBr, com leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

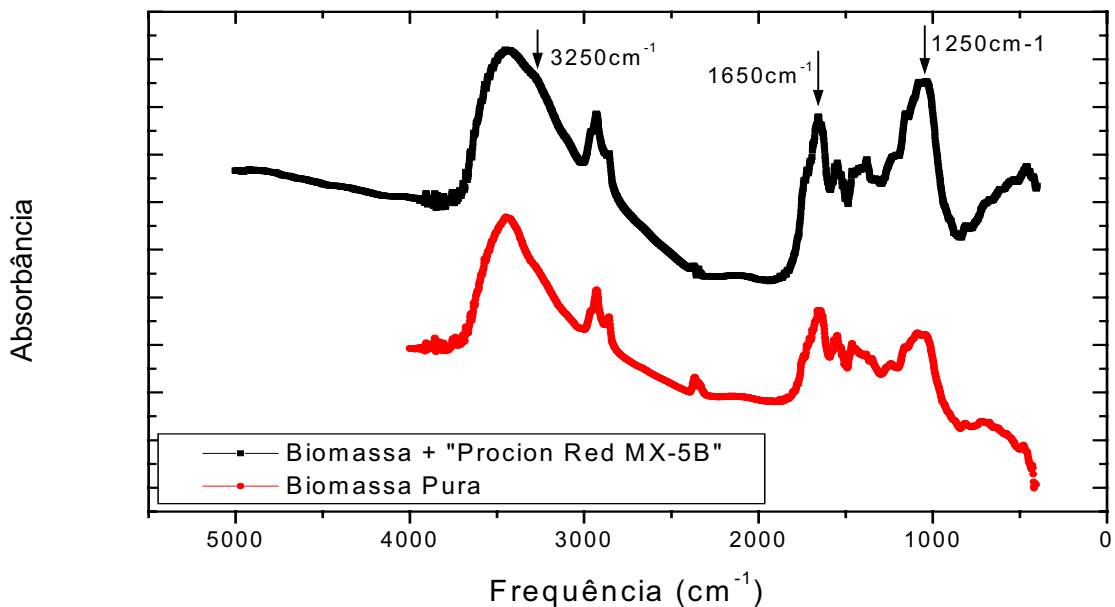


FIGURA 4.12.7. Espectros de absorção em FT-IR na região de 400 a 5000cm^{-1} de parede celular de *Neurospora crassa* 74A, e micélio fúngico em contato com o corante "Procion Red MX-5B" por 120 horas em pH 2,50, na forma de pastilhas preparadas na proporção de 1mg da amostra para 149mg de KBr, leituras feitas em espectrofotômetro Shimadzu 8300.

Estudo na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

A FIGURA 4.12.1. revela que este corante não altera suas características absorptivas, quando submetido à variação de pH.

O espectro UV-Vis do corante controle (FIGURA 4.12.2.) o naftol se sobressai nas bandas 226, 275, 320 e 331nm, segundo INDEX MERCK (1976). Sendo que, em 263nm provavelmente seja o efeito de cloro-triazina, (SILVERSTEIN et al., 1987). A FIGURA 4.12.4., percebeu-se uma ligeira ondulação entre 350 e 360nm, presumivelmente devido às ligações azo, e a banda principal cromóforo em 536 nm. Na FIGURA 4.12.3. do espectro de UV da região de contato, resta apenas uma ondulação na região entre 263 e 265nm, devido à formação de cloro-triazina livre e naftol livre. A FIGURA 4.12.5. revela uma oscilação de banda para 510nm, pode-se perceber também que, grande parte do corante foi removida do sobrenadante.

Estudo na região do Infravermelho (FT-IR)

A FIGURA 4.12.6. do espectro do corante controle indica banda entre 3300 e 3400cm^{-1} , característico do fenol/ naftol, outra em 1576 e 1429cm^{-1} , típica, segundo SILVERSTEIN et al., (1987), das ligações azobenzeno. Também em 900cm^{-1} , característico do naftol. Após contato de 120 horas verificou-se o aparecimento de banda em 3250cm^{-1} , outra em 2900cm^{-1} , característico do surgimento de aminas primárias. Bandas em 1650cm^{-1} e 1250cm^{-1} também são características da existência de aminas primárias livres. O mesmo pode-se observar na FIGURA 4.12.7, com ampliação da banda em 3250cm^{-1} e 3000cm^{-1} e em 1650cm^{-1} e 1250cm^{-1} , devido à presença de aminas primárias.

Como todos os demais corantes, este pode ter sofrido hidrólise química. Alguns aspectos mais explicativos poderiam ter sido confirmados por Espectrofotometria de Massa.

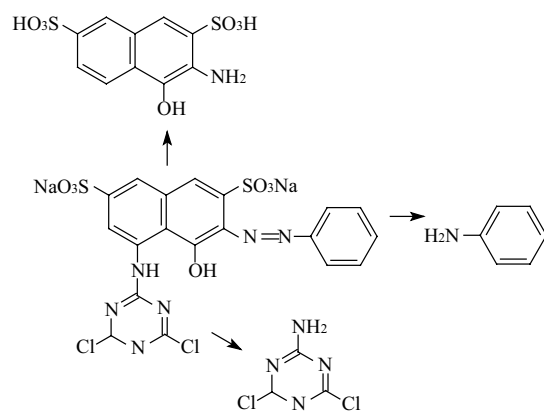


FIGURA 4.12.8. Corante “Procion Red MX-5B”, com as prováveis alterações estruturais após processo de biosorção/biodegradação, após 120 horas de contato.

TESTE DE BIOSORTIVIDADE DO CORANTE “PROCION RED MX-5B” EM DIFERENTES VALORES DE pH

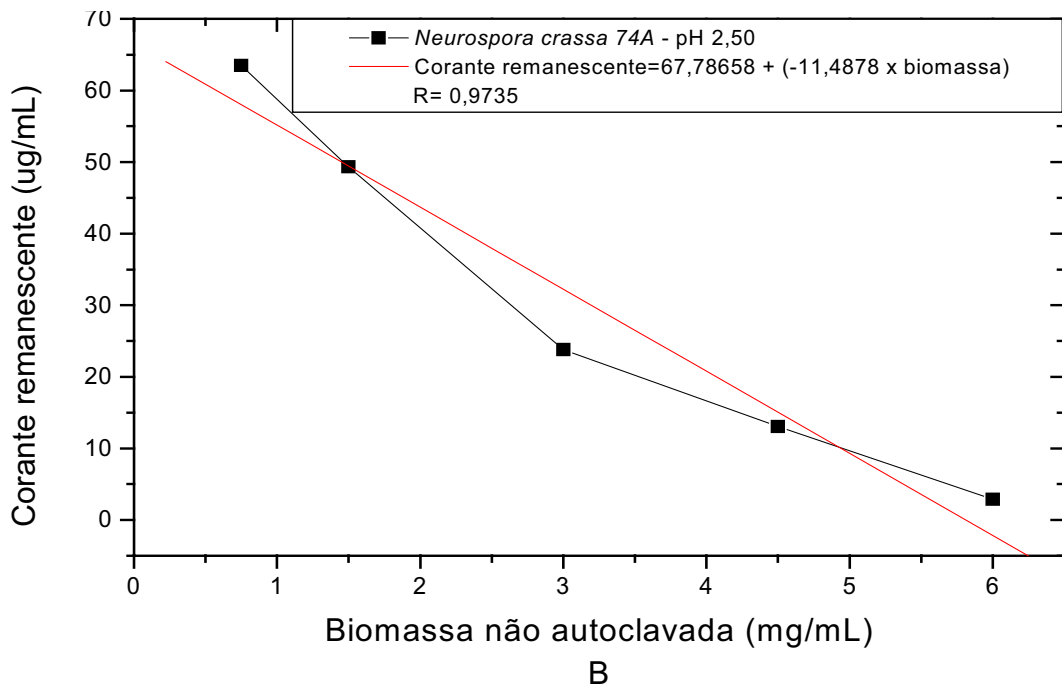
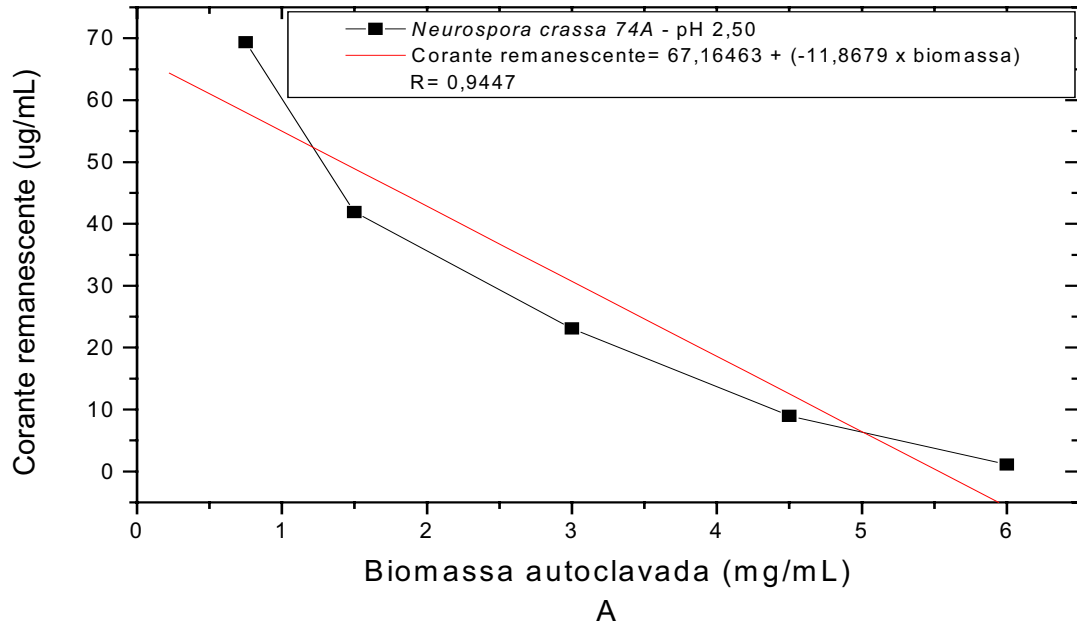


FIGURA 4.12.9. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante “Procion Red MX-5B” (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 2,50; 30°C; 120 minutos de contato. Estimativa da quantidade de biomassa necessária para se conseguir a remoção total do corante= (A) autoclavada: 5,662mg/mL; (B) não autoclavada: 5,900mg/mL.

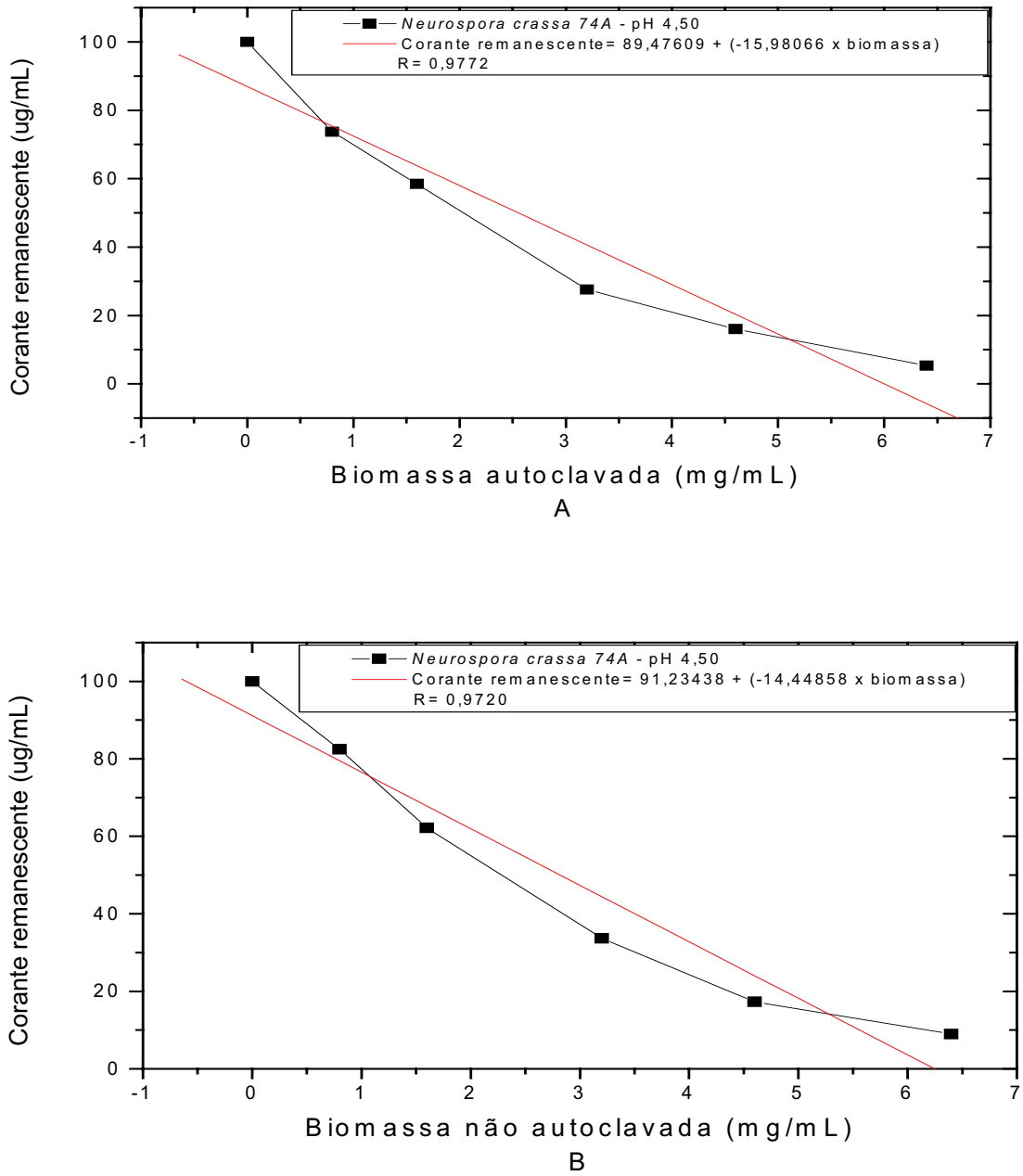


FIGURA 4.12.10. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante “Procion Red MX-5B” (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 4,50; 30°C; 120 minutos de contato. Estimativa da quantidade de biomassa necessária para se conseguir a remoção total do corante= (A) autoclavada: 5,599mg/mL; (B) não autoclavada: 6,298mg/mL.

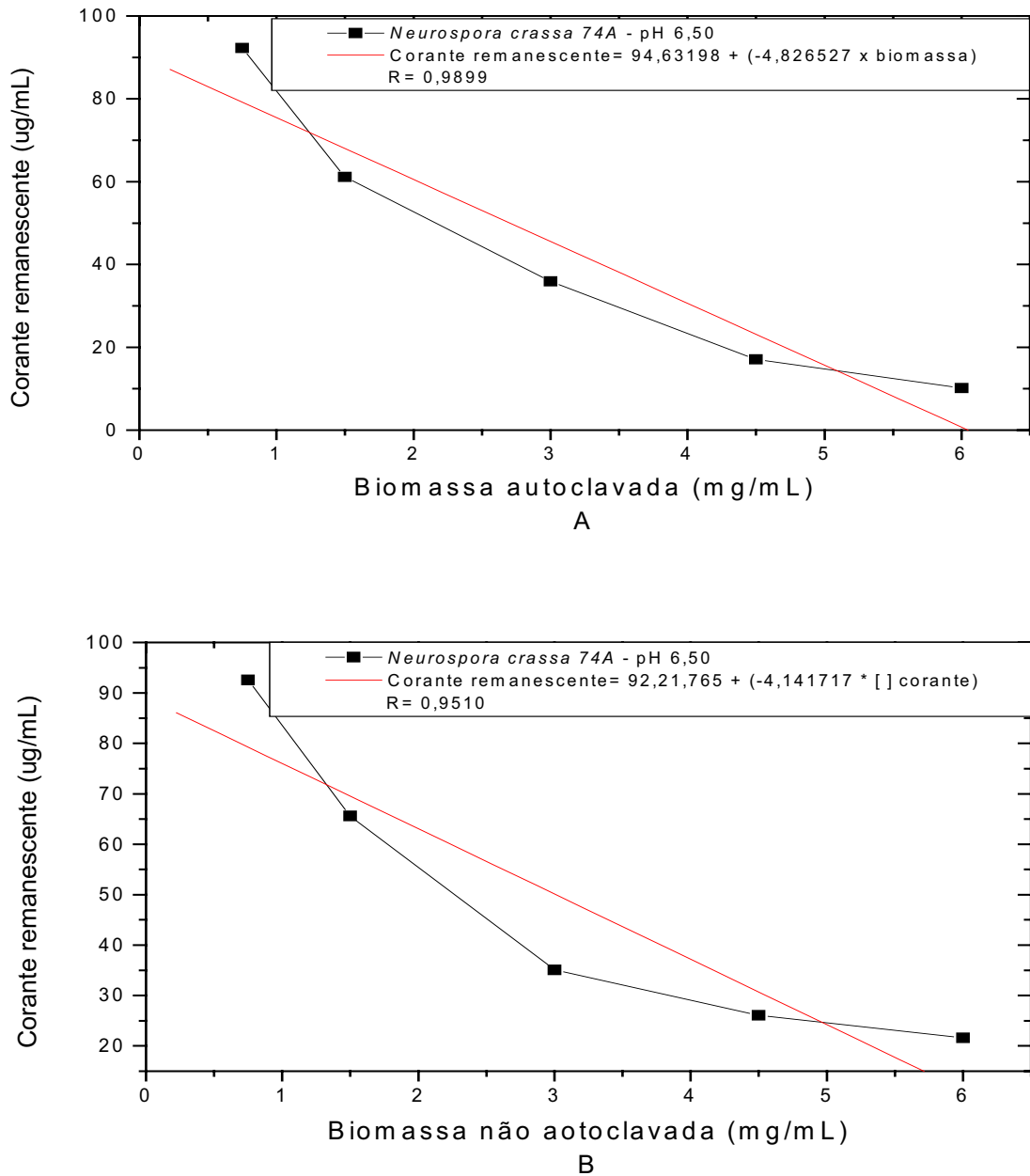


FIGURA 4.12.11. *Neurospora crassa* 74A autoclavada (A) e não autoclavada (B), em contato com o corante “Procion Red MX-5B” (concentração inicial de 100µg/mL, em pH 4,50; 30°C; 120 minutos de contato. Estimativa da quantidade de biomassa necessária para se conseguir a remoção total do corante= (A) autoclavada: 6,099mg/mL; (B) não autoclavada: 6,858mg.mL.

Os testes de biosorção em diferentes valores de pH do corante “Procion Red MX-5B”, na concentração inicial de 100µg/mL e o fungo

Neurospora crassa 74A, autoclavada e não autoclavada, indicaram que o meio mais ácido é mais eficaz na remoção do corante em solução aquosa, e que a biomassa autoclavada funciona como melhor substrato, do que a biomassa viva, no tempo de contato de 120 minutos. Conforme as estimativas das quantidades de biomassas necessárias para promover a remoção total dos corantes avaliados, nos valores de pH 2,50; 4,50 e 6,50. Estes resultados estão indicados nas (FIGURAS 4.12.9., 4.12.10., 4.12.11.), para o corante “Procion Red MX-5B”.

CORSO, (1998), relata que os fungos autoclavados apresentam melhor mecanismo de remoção do corante em solução aquosa. Já as células fúngicas vivas agem como se o corante fosse um corpo estranho e que necessita ser removido, através de sistemas enzimáticos, os quais dificultariam os sítios adsortivos a receberem as moléculas do corante. Por outro lado, no momento em que ocorre autoclavagem, estes sistemas enzimáticos cessam, e as células se tornam um substrato mais propício à aproximação de moléculas estranhas.

**TESTE DE BIOSORTIVIDADE DO CORANTE “PROCION RED MX-5B”
SEGUNDO AS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE FREUNDLICH LANGMUIR**

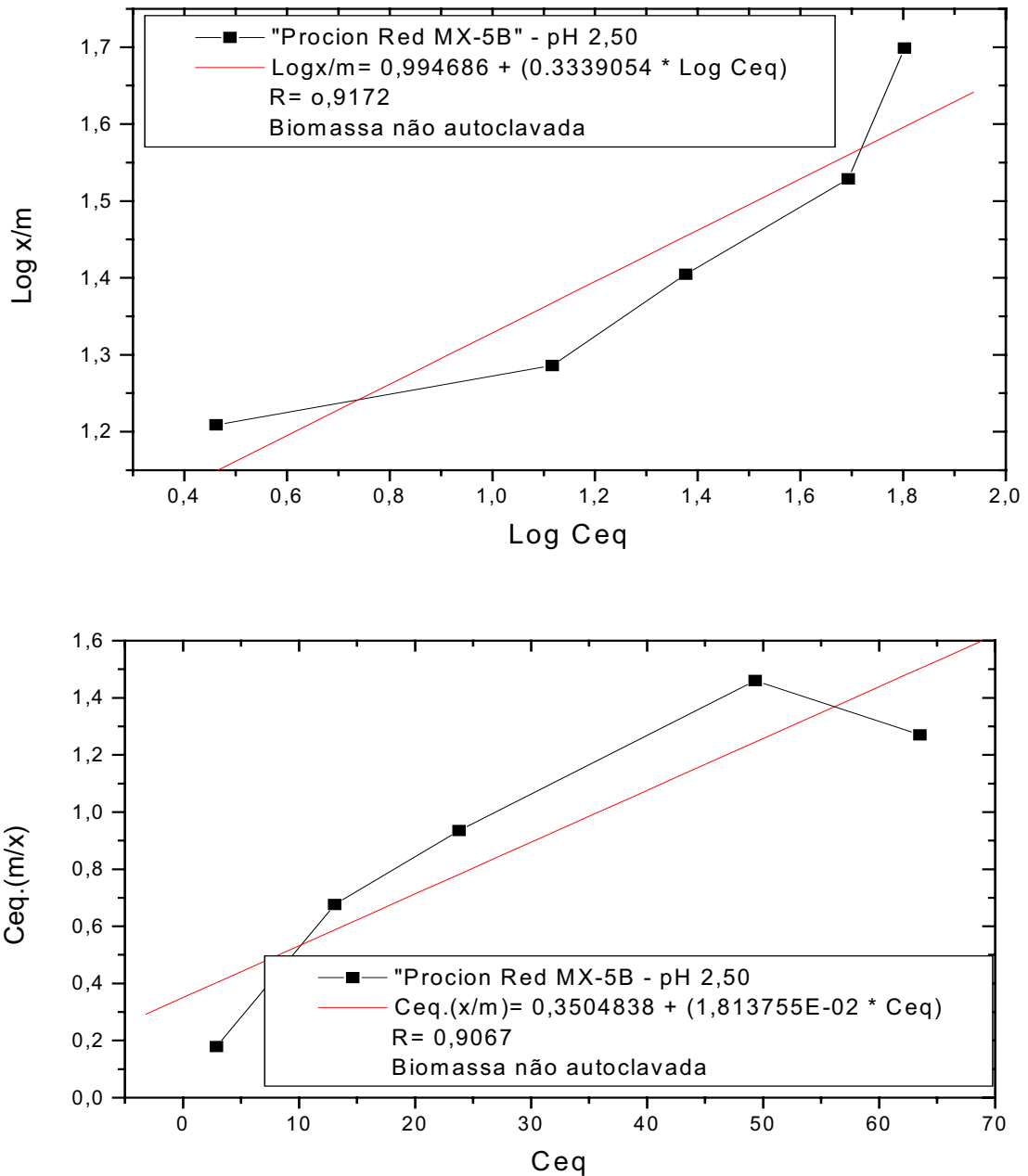


FIGURA 4.12.12. Estudo da biosorção do corante “Procion Red MX-5B”, por biomassa de *Neurospora crassa* 74A, não autoclavada, realizado através das Isotermas de Freundlich (A) e Langmuir (B), no pH 2,50; 30°C; concentração inicial do corante de 100µg/mL; concentração de biomassa variando de 0,755 à 6,04µg/mL e tempo de contato de 120 minutos.

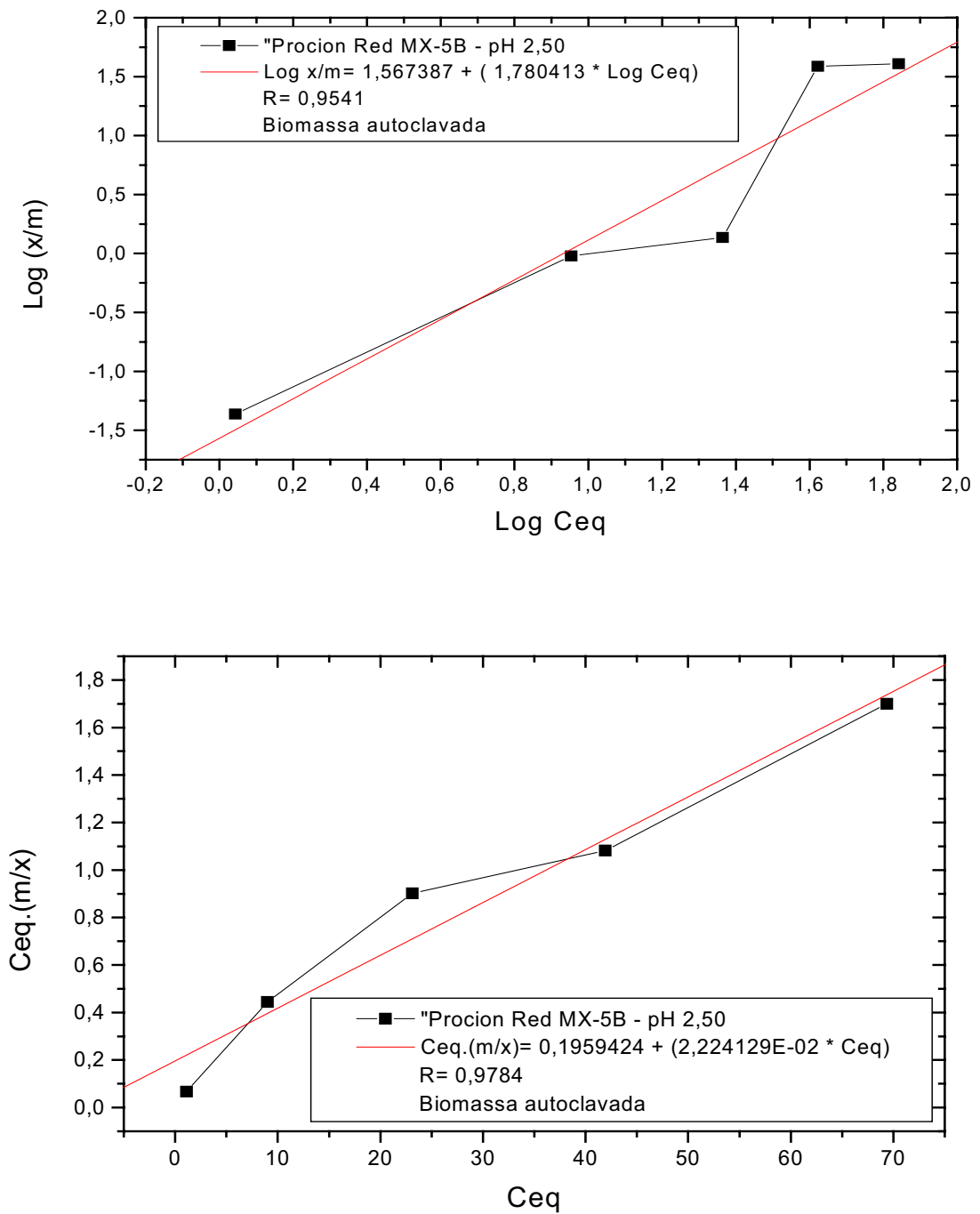


FIGURA 4.12.13. Estudo da biosorção do corante “Procion Red MX-5B”, por biomassa de *Neurospora crassa* 74A, autoclavada, realizado através das Isotermas de Freundlich (A) e Langmuir (B), no pH 2,50; 30°C; concentração inicial do corante de 100µg/mL; concentração de biomassa variando de 0,755 à 6,04µg/mL e tempo de contato de 120 minutos.

A equação que relaciona a quantidade de moléculas sobre uma superfície à pressão e à temperatura constante, é denominada Isoterma de Adsorção, (MOORE, 1968).

As moléculas e átomos podem atacar a superfície de duas maneiras, fisicamente ou quimicamente. Na adsorção física, ou fisiosorção, ocorre uma interação de van der Waals entre o adsorbato e o substrato. Tais interações podem ser extensas, porém fracas, e a energia que é liberada quando a partícula é fisiosorvida é tão pequena que pode ser adsorvida como vibração de baixa intensidade, na verdade, as moléculas ficam aderidas à superfície após um processo de acomodação entre as forças atuantes no equilíbrio.

Por sua vez, na quimiosorção, ou adsorção química, as partículas interagem com a superfície, formando uma ligação química, usualmente ligações covalentes, e tendem a encontrar um número máximo de sítios com o substrato. A entalpia da quimiosorção é muito maior do que o da fisiosorção, uma molécula quimiosorvida pode ser removida separadamente se a valência da ligação não estiver correspondendo com a da superfície, (ATKINS, 1991).

A Isoterma de Langmuir baseia-se no recobrimento gradual de uma superfície pelas moléculas adsorvidas, dando-se a saturação quando a camada adsorvida tem a espessura uniforme de uma molécula. A Isoterma é especialmente aplicável aos casos de quimiosorção, onde as moléculas adsorvidas são mantidas na superfície por ligações comparáveis às dos compostos químicos, ficam em equilíbrio e formam uma mono camada, (CASTELLAN, 1964).

No entanto, como pode surgir também uma espécie de adsorção onde a camada quimiosorvida pode desempenhar o papel de um composto intermediário no processo de catálise da reação, em que ocorram ligações molécula-molécula do adsorbato, formando multicamadas e intercalando os processos de fisiosorção e quimiosorção. Surgiram outras Isotermas de Adsorção para tentarem melhor explicar cada fenômeno adsorativo, como a Equação de Freundlich que utiliza as proporções logarítmicas para analisar as possibilidades de reações, as quais permitem avaliar se um determinado

fenômeno é resultado de adsorção em monocamadas ou em multicamadas. Associando-se as variáveis a um sistema de regressão, permitindo verificar qual apresenta melhor correlação entre cada equação estudada, (ATKINS, 1991).

A aplicação das equações de Freundlich e Langmuir para a interação entre o fungo *Neurospora crassa* 74A e o corante “Procion Red MX-5B”, em pH 2,50, revelam que a Equação de Freundlich foi a mais favorável, apresentando melhores coeficientes de regressão em todas as situações estudadas, tanto em biomassas não autoclavadas (FIGURA 4.12.12.) e autoclavadas (FIGURA 4.12.13.). Portanto, a adsorção ocorre por multicamadas de moléculas de corantes.

Para se realizar estes testes foram utilizados parâmetros semelhantes aos demais ensaios realizados, ou seja, manteve-se a concentração de corante constante e variou-se a concentração de biomassa para uma quantidade crescente.

**TESTE DE TOLERÂNCIA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO
CORANTE “PROCION RED MX-5B”**

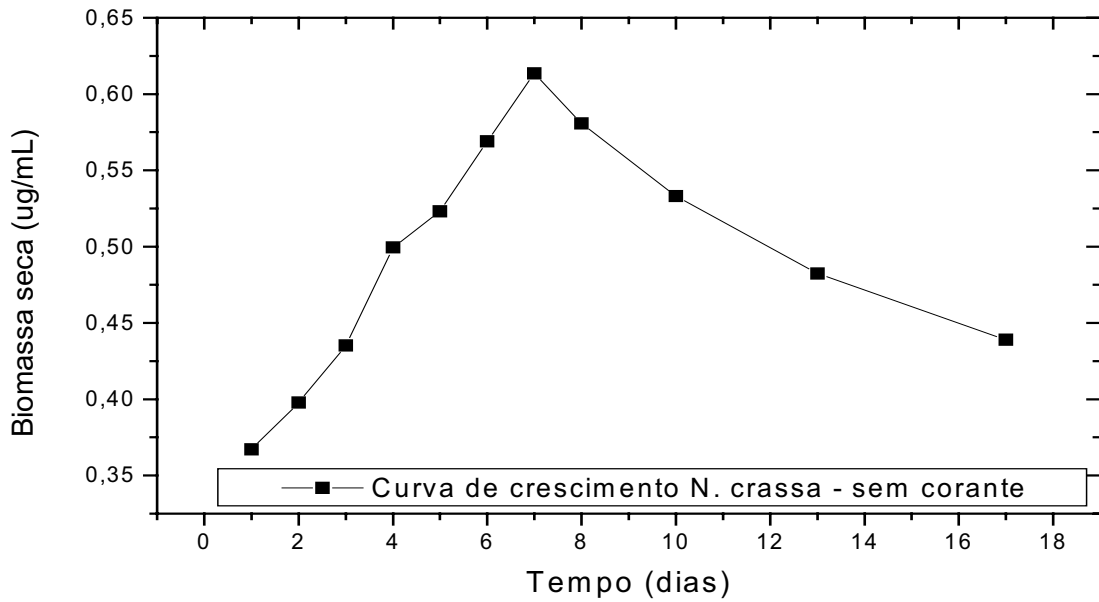


FIGURA 4.12.14. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, sem a adição do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias de cultivo (controle).

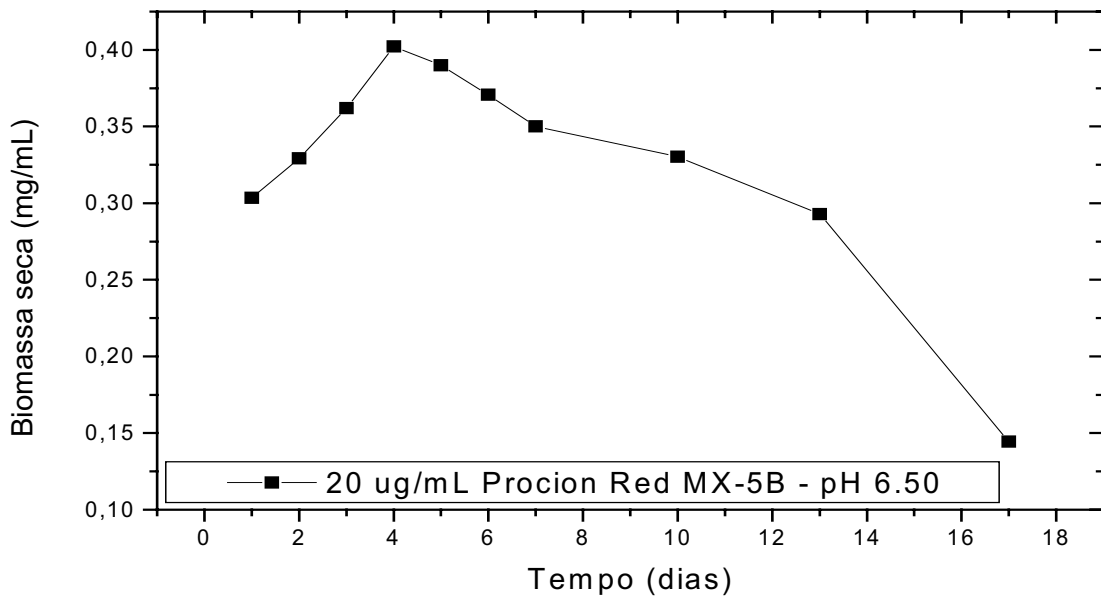


FIGURA 4.12.15. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 20ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

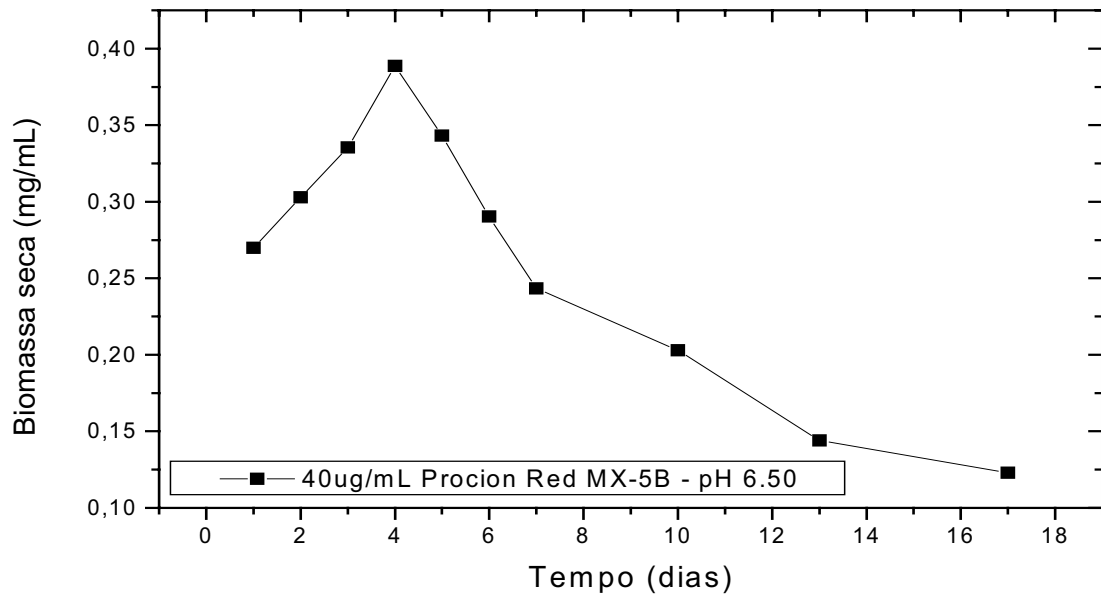


FIGURA 4.12.16. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 40ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

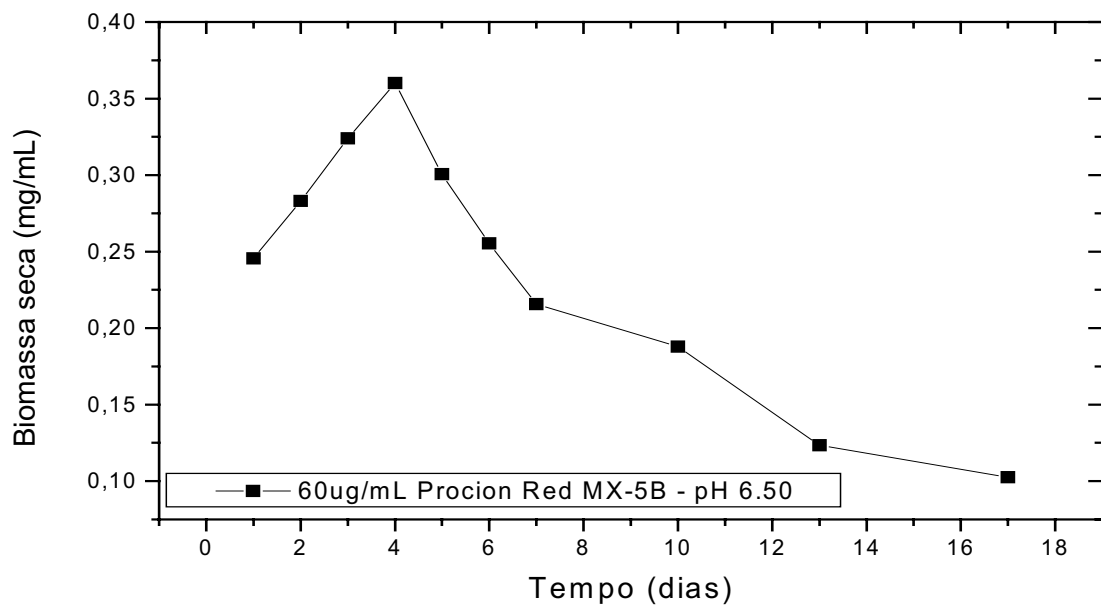


FIGURA 4.12.17. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 60ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

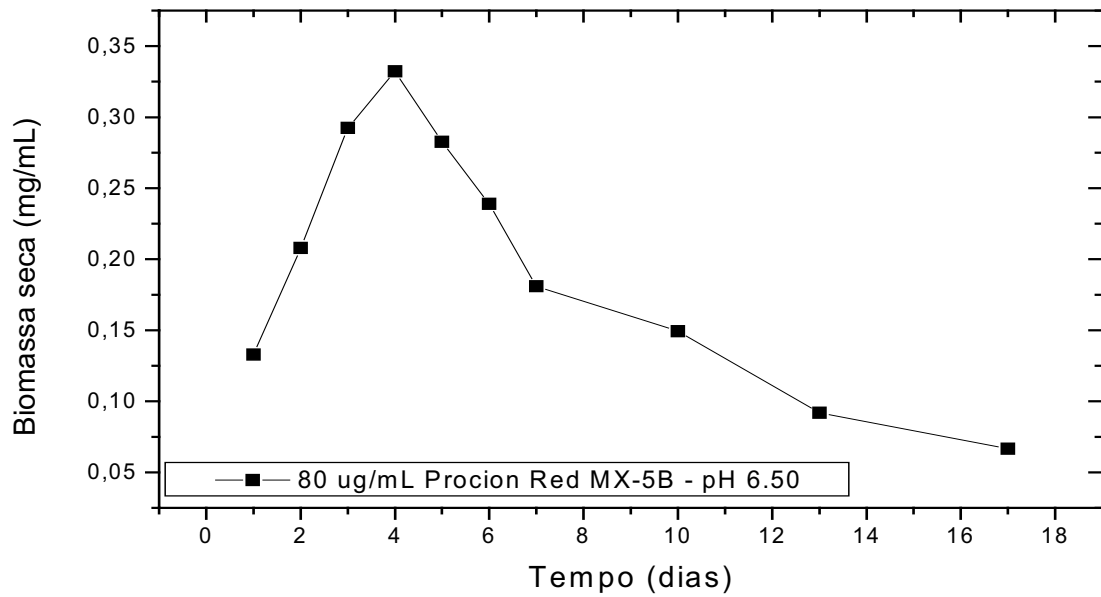


FIGURA 4.12.18. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 80ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

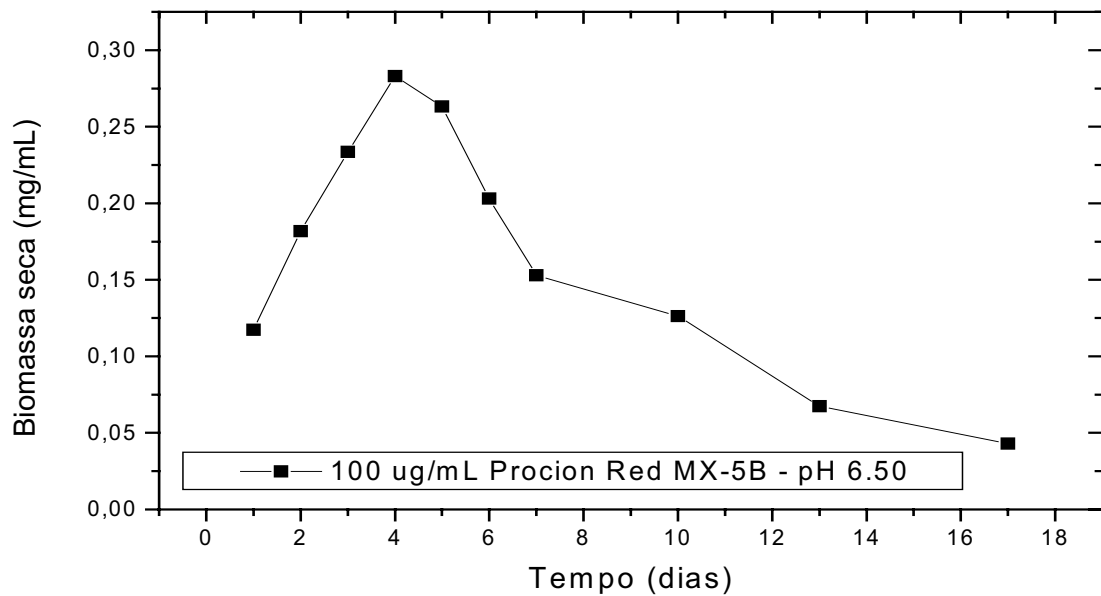


FIGURA 4.12.19. Curva de crescimento do fungo *Neurospora crassa* 74A, com a adição de 100ug/mL do corante, em pH 6,50, pelo período de 17 dias.

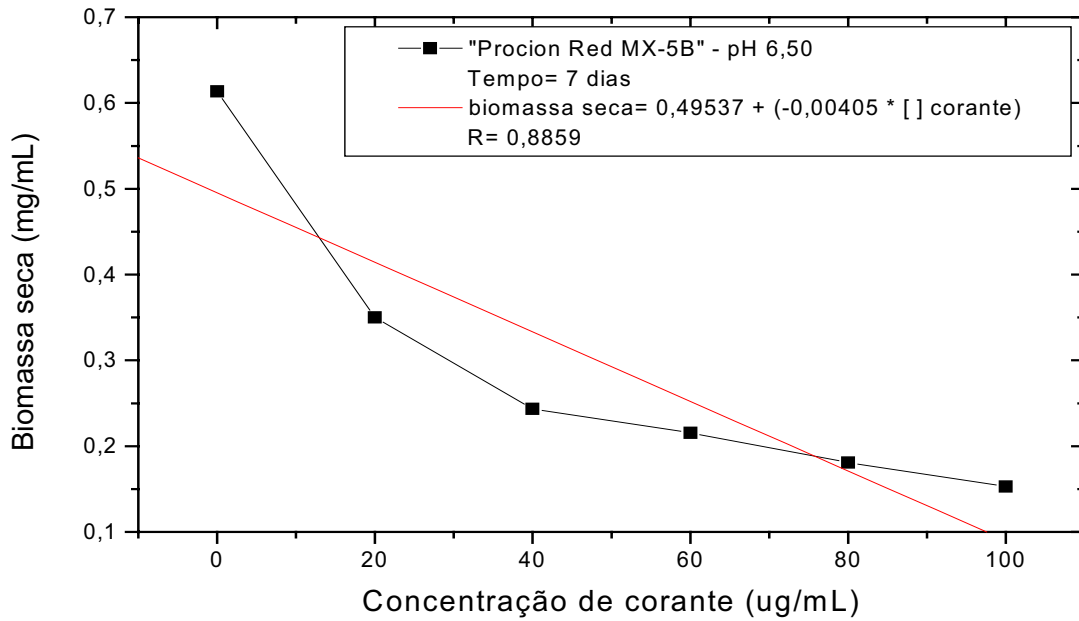


FIGURA 4.12.20. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 6,50, após 7 dias de cultivo.

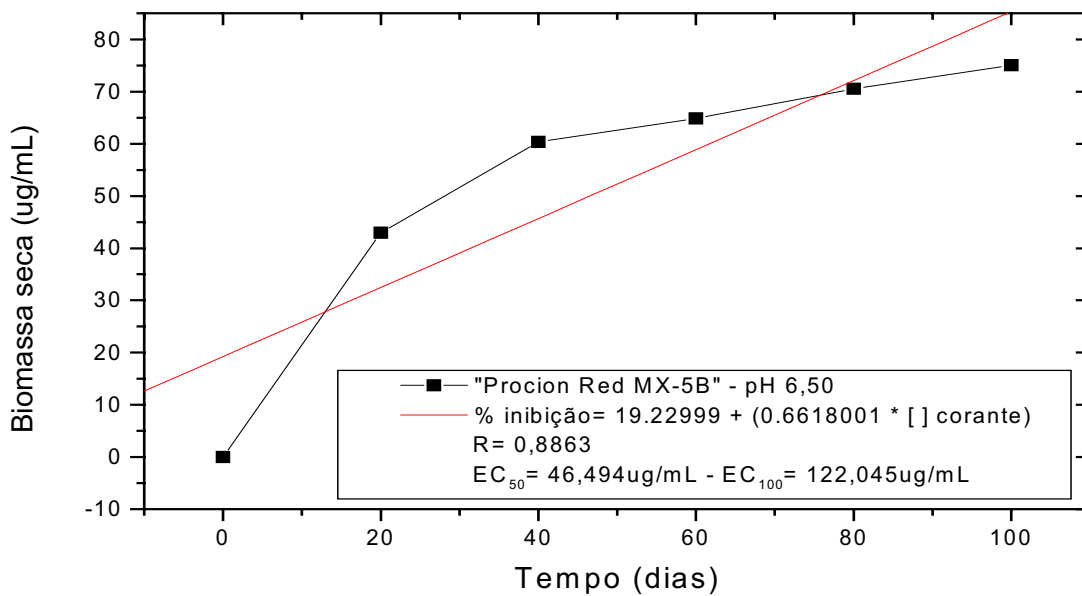


FIGURA 4.12.21. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 6,50, após 7 dias de cultivo.

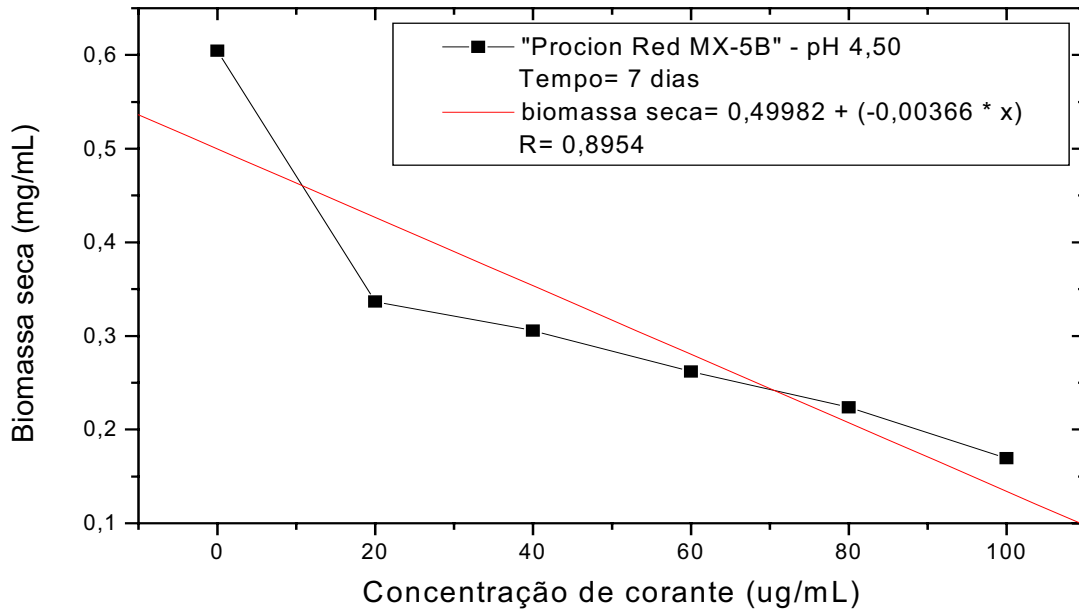


FIGURA 4.12.22. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 4,50, após 7 dias de cultivo.

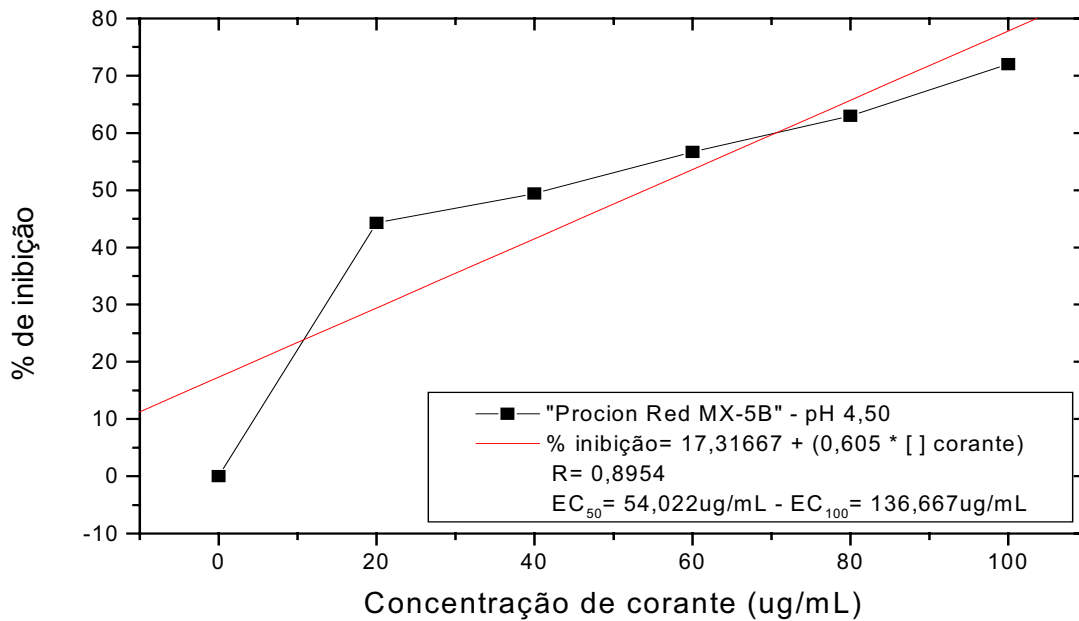


FIGURA 4.12.23. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 4,50, após 7 dias de cultivo.

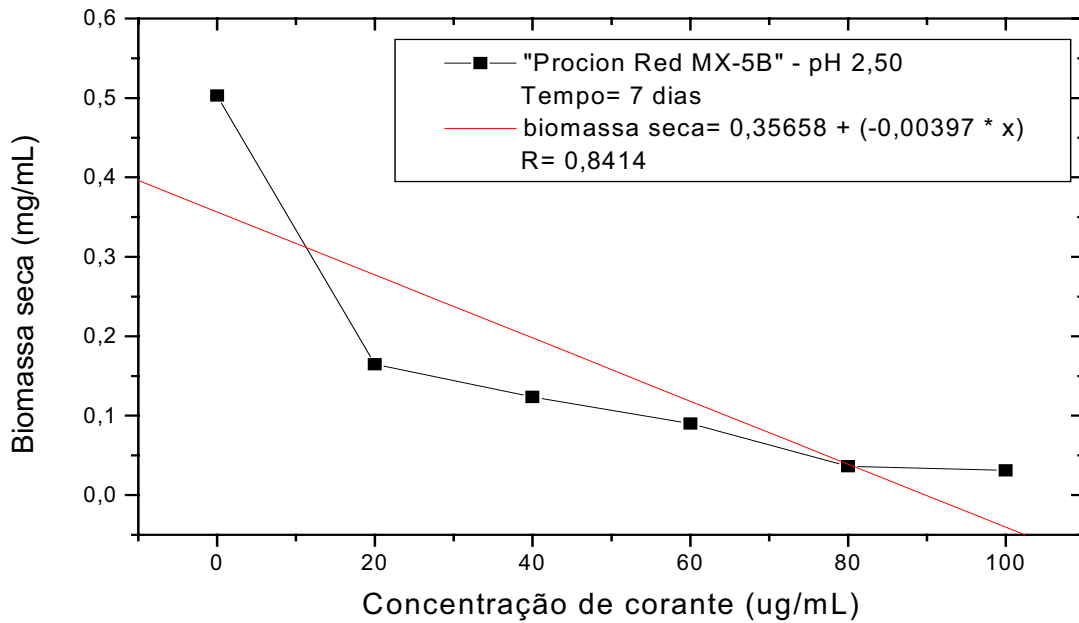


FIGURA 4.12.24. Correlação entre a produção de biomassa e as concentrações crescentes do corante, em pH 2,50, após 7 dias de cultivo.

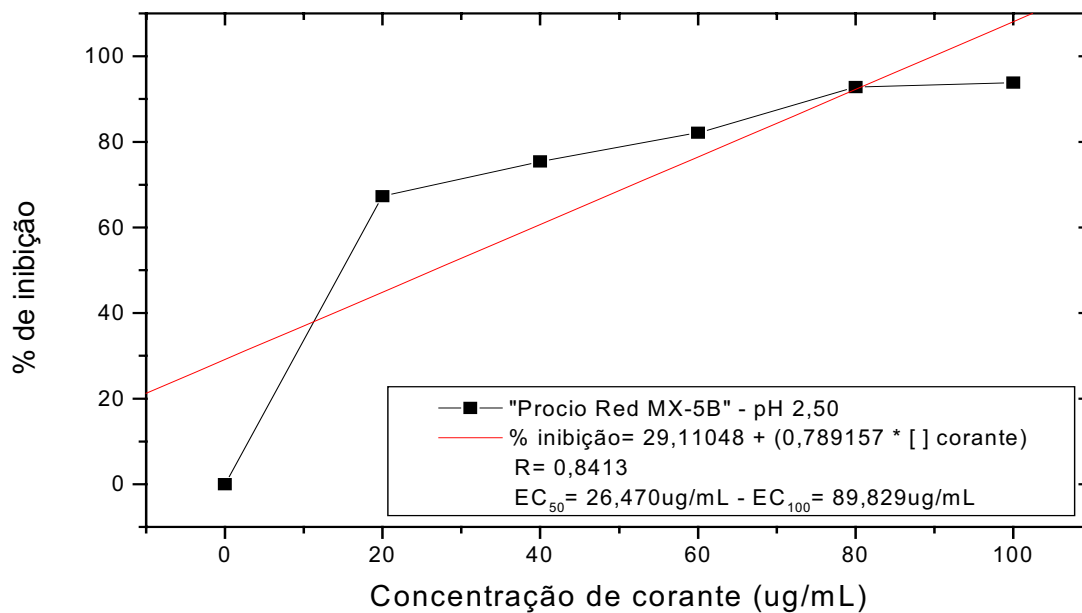


FIGURA 4.12.25. Teste de tolerância: % inibição na produção de biomassa com concentração crescente do corante, em pH 2,50, após 7 dias de cultivo.

Este estudo demonstrou o comportamento do fungo *Neurospora crassa* 74A à toxicidade do corante, esta ocorrência varia de corante para corante, sendo influenciado também pelo pH em que ocorre a interação de desenvolvimento do fungo e diferentes concentrações de corantes.

Como ficou demonstrado, *Neurospora crassa* 74A atingiu sua fase exponencial de crescimento no 7^o dia, (FIGURAS 4.12.14), tempo este que foi estabelecido para a determinação do EC₅₀ e EC₁₀₀.

A sensibilidade do fungo para os 4 corantes analisados indicou que estes corantes apresentam certo grau de toxicidade, assim como, de tolerância, no desenvolvimento do fungo.

Pelas FIGURAS de 4.12.15. a 4.12.19., observa-se que a medida que aumenta a concentração de corante, a fase exponencial de crescimento em determinada concentração vai diminuindo, dando uma demonstração clara que, a resposta no crescimento do fungo a estes agentes se faz sentir, (FIGURAS 4.12.20. a 4.12.22. e 4.12.24.). Pode-se verificar que a produção de biomassa diminui com o aumento da concentração de corante.

O corante reativo "Procion Red MX-5B", tem comportamento diferente dos demais corantes, pois, diminui sua toxicidade no pH 4,50 e aumenta muito em pH 2,50, (FIGURAS 4.12.21.; 4.12.23. e 4.12.25.)

Pode-se verificar também que o EC₁₀₀ acompanha os parâmetros proporcionais do EC₅₀, em todos os casos.

5. CONCLUSÕES

O processo inicial da remoção da cor de efluentes aquáticos por microrganismos, se desenvolveu em duas etapas; a primeira delas foi à biosorção e o segundo foi a biodegradação. Na biosorção pode-se perceber que as paredes celulares dos microrganismos, funcionaram como um filtro que atrai as moléculas dos corantes dissolvidas no meio. Este processo é bastante rápido, ocorreu em 120 minutos para cada corante escolhido, pois, em experiências anteriores, a aderência dos corantes a parede celular entra em equilíbrio em torno deste período.

Após este tempo, foi possível realizar a previsão da quantidade de biomassa necessária para, teoricamente, remover todo o corante presente em solução aquosa. Neste trabalho, os corantes escolhidos apresentaram uma característica básica para todos eles, os resultados demonstraram que as biomassas autoclavadas removeram mais corante do meio, do que as biomassas não autoclavadas; à medida que o valor de pH aumentou, diminuiu a capacidade de remoção dos corantes.

Com as melhores condições de remoção no teste de biosortividade, isto é, pH 2,50; foi realizado o estudo da aplicabilidade das equações das isotermas de Freundlich e Langmuir. A interação biomassa microbiana e moléculas de corante dependem de dois fatores, do tipo de corante e da qualidade da parede celular. Com os corantes escolhidos foi feita interação “corante-parede celular” e outra “corante-corante”, como ficou

evidenciado nos coeficientes de correlação da isoterma de Freundlich (multicamadas de moléculas de corante sobre o substrato adsorativo), em detrimento a de Langmuir, só admite-se a interação “corante-parede celular” (monocamada de moléculas de corante sobre o substrato).

O estudo da biodegradação foi possível a partir dos espectros no UV-Vis e da Transformada de Fourier no Infravermelho (FT-IR). As principais modificações estruturais de cada corante puderam ser presumidas pelos deslocamentos de bandas no UV-Vis, ou de deslocamento e aparecimento de bandas em FT-IR. Nos espectros de UV-Vis foi possível estabelecer o grau de remoção do corante por biosorção, seguido, após um tempo mais longo de contato, do início de processo biodegradativo. Deste modo, pode deduzir que o fungo após esgotar sua fonte de carbono decorrente do inóculo, recorreu à fonte de carbono alternativo, vindo do substrato mais próximo, ou seja, as moléculas de corantes.

A redução dos azos corantes provocou a quebra das ligações (N=N-), as quais implicaram na fragmentação das moléculas dos azos compostos, em pelo menos dois compostos amino (R-NH₂). Esta reação esteve presente, praticamente, em quase todos os corantes estudados, explicando assim, o processo redutivo que atua sobre as moléculas dos corantes, provocando sua descoloração.

A interação que ocorreu em meio ácido, provocou aumento da concentração hidrogeniônica e indução das enzimas azo redutases presentes no fungo. Contudo, esta reação de degradação produziu aumento na produção de anilina.

O estudo da tolerância refletiu o grau de toxicidade que um determinado corante pode exercer sobre o desenvolvimento da biomassa de um determinado fungo. Ficou evidenciado que todos os corantes estudados apresentaram fatores que provocaram uma diminuição da produção de biomassa, contudo, foi possível com a determinação do EC₅₀ saber o grau de toxicidade destes corantes. Os mais tóxicos foram “Procion Red MX-5B” em pH 2,50; seguido do “Acid Red 151” em pH 2,50. Menos tóxicos foram “Direct Red 23” no pH 6,50 e “Erythrosine B” no pH 4,50.

6. LITERATURA CITADA

ANGELIS, D. F. de; COVOLAN, H.; OLIVEIRA, J. de CORSO, C. R.; KIYAN, C. Remoção de compostos azo por *Saccharomyces boulardii* IZ-1904. **Ciência e cultura**, v.34, nº7, p.585, 1982.

ATIKNS, P. W. **Physical chemistry**, 4. ed. England: Oxford University Press, 1991, 541p.

AZMI, W; SANI, R. J.; BANERJEE, U.C. Biodegradation of triphenylmethane dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 185-191, 1998.

BANAT, I.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile dye containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.

BAKER, A. J. M. Metal tolerance. **New Phytol.**, v. 106, p. 93-111, 1987.

BAKER, A. J.; WALKER, P. L. Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. **Chem Spec. Biovail.**, v. 1, p. 7-17, 1989.

BHANOORI, M.; VENKATESWERLU, G. In vivo chitin-cadmium complexation in cell wall of *Neurospora crassa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1519, p. 21-28, 2000.

CASTELAN, G. W. **Physical chemistry**, 1. ed. London: Addison-Wesley Publishing Company, 1964, 717p.

CAMBRIA, M. T.; CAMBRIA, A. RAGUSA, S.; RIZZARELLI, E. Production, purification and properties of an extracellular Laccase from *Rigidoporus lignosus*. **Protein Expression and Purification**, v. 18, p. 141-147, 2000.

COLPAERT, J. V.; MULLER, L. A.H.; LAMBAERTS, M.; ADRIAENSEN, K.; VANGRONSVELD, J. Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of *Suilloid* fungi. **New Phytologist**, v. 162, p. 549-559, 2004.

CHRISTOV, L. P.; DRIESSEL, B.V.; PLESSIS, C.A. Fungal biomass from *Rhizomucor pusillus* as adsorbent of chromospheres from a bleach plant effluent. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 91-95, 1999.

CHU, H., Yizhong, W. Decolorization and biodegradability of photocatalytic treated azo dyes and wool textile wastewater. **Chemosphere**, v. 39, n. 12, p. 2107-2115, 1999.

CHU, W. Dye Removal from textile dye wastewater using recycled alum sludge. **Water Research**, v. 35, n. 13, p. 3147-3152, 2001.

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

CORSO, C. R.; BIDÓIA, E. D.; EPIPHÂNIO, R.; CASTELLAN, M. S.; DOMINGOS, R. N. Remoção do corante azóico Direct Violet 51 por células de *Saccharomyces cerevisiae* eletrolisadas. **19º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, v. 19, p. AB-50, 1996.

DOHÁNYOS, M.; MADERA, V.; SEDLACEK, M. Removal of organic dyes by activated sludge. **Prog. Water Technology**, v. 10, n (5-6), p. 559-575, 1978.

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

EL-SHAFEI, H. A. Influence of L-sorbose and the cell-wall-lytic *Micrococcus sp* on the major polymers of *Aspergillus fumigatus*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 57, p. 151-156, 1997.

FOUREST, E.; ROUX, J.C. Heavy metal biosorption by fungal micelial by products: mechanisms and influence of pH. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.37, p.399-403, 1992.

GALICHET, A.; SOCKALINGUM, G. D.; BELARBI, A.; MANFAIT, M. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, p. 179-186, 2001.

GANESH, R., BOARDMAN, G. D.; MICHELSEN, D. Fate of azo dyes in sludge. **Water Research**, New York, v.28, n.6, p.1367-76, 1994.

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

HALLER, M. Tratamento de efluentes - Meio Ambiente. **Textilia**, v.7, p.48-49, 1993.

HARTLEY, J.; CAIRNEY, J. W. G.; MEHARG, A. A. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptative tolerance to potentially toxic metals in the environment? **Plant and Soil**, v. 189, p. 303-319, 1997a.

HARTLEY, J.; CAIRNEY, J. W. G.; SANDERS, F. E.; MEHARG, A. A. Toxic interactions of metal ions (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} and Sb^{3-}) on *in vitro* biomass production of ectomycorrhizal fungi. **New Phytol.**, v. 137, p. 551-562, 1997b.

HU, T. L. Degradation of azo dye RP₂ B by *Pseudomonas luteola*. **Water Science Technology**, v. 38, n. 4-5, p. 299-306, 1998.

JESUS, G. J. **Estudo da interação biosortiva entre corantes azóicos e *Neurospora crassa* 74A paramorfogênico**. 2001, 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

KAPADAN, I. K.; KARGI, F.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. Versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 381-387, 2000.

KAMNEV, A.A.; RISTIÉ, M.; ANTONYUK, L.P.; CHERNYCHEV, A.V.; IGNATOV, V.V. Fourier transform infrared spectroscopic study of intact cells of the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasiliens*. **Journal of Molecular Structure**, v. 408-409, p. 201-205, 1997.

KIRBY, N.; MARCHANT, R.; McMULLAN, G. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. **Fems Microbiology Letters**, v. 188, p. 93-96, 2000.

KIRK-OTHMER. **Encyclopedia of chemical technology**, Publ. by John Wiley & Sons, 3. ed. New York: Wiley-Inter Science, vol. 8 in: Dyes, natural, p. 363-368, e Dyes and dyes intermediates, p. 159-172, 1979.

LAHLOU, E. H.; NOMA, Y.; HASHIHIRO, T.; ASAKAWA, Y. Microbial transformation of dehydropinguisenol by *Aspergillus* sp. **Phytochemistry**, v. 54, 455-460, 2000.

MANU, B; CHAUDHARI, S. Anaerobic decolorization of simulated textile wastewater containing azo dyes. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 225-231, 2002.

MARCANTI-CONTATO, I.; CORSO, C. R.; OLIVEIRA, J. E. Induction of physical paramorphogenesis in *Aspergillus* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 65-67, 1997.

MARIEY, L.; SIGNOLLE, J. P.; AMIEL, C.; TRAVERT, J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. **Vibrational Spectroscopy**, v. 26, p. 151-159, 2001.

MARTINS, M. A. M; FERREIRA, I. C.; SANTOS, I. M.; QUEIROZ, M. J.; LIMA, N. "Biodegradação of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*". **Journal of Biotechnology**, v 89, p. 91-98, 2001.

MEHARG, A. A. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant Cell Environ.**, v. 17, p. 989-993, 1994.

MOORE, W. J. **Físico Química**, 2. ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico S. A., 1968, 1001p.

NIGAM, P.; BANAT, I. M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. **Process Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 435-442, 1996.

OLIVEIRA, J. E.; ANGELIS, D. F.; CORSO, C. R.; KIYAN, C. Investigation on the adsorption equilibria of the acid azo dye Amaranth (C.I. 16.185) from aqueous solutions on *Saccharomyces uvarum* IZ 1904 cells. **Naturalia**, v. 8, p. 211-217, 1983.

ORSINI, F.; AMI, D.; VILLA, A. M.; SALA, G.; BELLOTTI, M.G.; DOGLIA, S. M. FT-IR microspectroscopy for microbiological studies. **Journal of Microbiological Methods**, v. 42, p. 17-27, 2000.

PAGGA, U.; BRAUN, D. The degradation of dyestuffs: part II Behavior of aerobic biodegradation tests. **Chemosphere**, v. 15, n. 4, p. 49-491, 1986.

PASTO, D. J.; JOHNSON, C. R. **Determinación de estructuras orgánicas**. Barcelona: ed. Editorial Reverte, S. A., 1977, 159p.

ROMERO, M.D.; AGUADO, J.; GONZALES, L.; LADERO, M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme and Microbiol Technology**, 25: (3-5), p. 244-250, 1999.

SERRES, F.J.; KOLMARK, H.G.; BROCKMAN, H.E. Factors influencing the survival of *Neurospora crassa* conidia in Sorbose-Sucrose media. **Nature**, v.183, p. 556-557, 1962.

SILVERSTEIN, R. M.; BASTER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1987, 224p.

SHARF, J. M. **Métodos recomendados para o exame de alimentos**. São Paulo: Ed. Polígono, 1978, 257p.

SHAUL, G.M.; LIEBERMAN, R.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Treatability of water soluble azo dyes by the activated sludge process. **Proceedings of the Industrial Wastes Symposia WPCF**, p. 1-18, p. 1986.

SCHINDLER, R.; LENDI, B. Simultaneous determination of enzyme activities by FTIR-spectroscopy in an on-step assay. **Analytica Chemical Acta**, v. 391, p. 19-28, 1999.

SU, W. W.; HE, B. J. Secreted enzyme production by fungal pellets in a perfusion bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 54, p. 43-52, 1997.

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

SURESH, K.; SUBRAMANYAM, C. Polyphenols are involved in copper binding to cell walls of *Neurospora crassa*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 69, p. 209-215, 1998.

TATUM, E.I.; BARRATT, R.W.; CUTTER, V.M.-Jr. Chemical induction of colonial paramorphic in *Neurospora crassa* and *Syncephalastrum*. **Science**, v. 109, p.509-511, 1949.

TRINDADE, R.C., ANGELIS, D. F. de; CAMARGO, A.T.de. Estudos sobre adsorção de compostos azóicos por leveduras do gênero *Rhodotorula*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 7, 1986. **Programas e Resumos de Comunicações**, p.10.

THE MERCK INDEX. **Merck & Co., INC**. Rahway, N. J., U.S.A., 1976, 9856p.

THEVISSSEN, K., TERRAS, F. R. G.; BROEKAERT, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defenses inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5451-5458, 1999.

USSMAN, M. A tecnologia da matéria viva nos têxteis. **Química Têxtil**, v. 24, p. 32-41, 2001.

VITOR, V. **Emprego da linhagem selvagem de *Candida albicans* isolada de efluente industrial para a avaliação da biosorção/biodegradação do corante azóico "Direct Violet 51"**, 2005, 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N.). **Microbiology Genetic**, v. 13, p.42-43, 1956.

WANG, Y; YU, J Adsorption and Degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*. **Water. Science. Technology**, v. 38, n. 4-5, p. 233-238, 1998.

WALKER, G. M.; WEATHERLEY, L. R. Biodegradation and biosorption of acid anthraquinone dye. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 219-223, 2000.

WH, L.; CHUA, H; LAM, K.H.; BI, S. P. A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. **Chemosphere**, v. 39, n. 15, p. 2723-2736, 1999.

ZEE, F. P. van der; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. **Chemosphere**, v. 44, p. 1169-1176, 2001.

ZISSI, U.; LYBERATOS, G. Azo-dye Biodegradation under Anoxic Conditions. **Water Science Technology**, v. 34, n. 5-6, p. 495-500, 2000.