

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS.
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

LEANDRO JORGE DA SILVA

**PRODUÇÃO DE EXO-BIOPOLÍMEROS POR ASCOMICETOS E SEU POTENCIAL
DE UTILIZAÇÃO NA BIOSSORÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO**

São José do Rio Preto – SP

2010

**PRODUÇÃO DE EXO-BIOPOLÍMEROS POR ASCOMICETOS E SEU
POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO NA BIOSSORÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO**

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de concentração Microbiologia Industrial, Ambiental, e de Alimentos, junto ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

São José do Rio Preto – SP

2010

Silva, Leandro Jorge da.

Produção de exo-biopolímeros por Ascomicetos e seu potencial de utilização na bio sorção de cádmio e chumbo / Leandro Jorge da Silva. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

85 f. ; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia-Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Bio sorção - Microbiologia. 2. Biopolímeros - Produção. 3. Biomassa - Microbiologia. 4. Ascomicetos. 5. Metais pesados - Purificação - Tratamento biológico. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 577.124.5

LEANDRO JORGE DASILVA

**PRODUÇÃO DE EXO-BIOPOLÍMEROS POR ASCOMICETOS E SEU POTENCIAL
DE UTILIZAÇÃO NA BIODISSORÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de concentração Microbiologia Industrial, Ambiental, e de Alimentos, junto ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
Universidade Estadual Paulista – IBILCE/UNESP
Orientador

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
Professor Assistente Doutor
Universidade Estadual Paulista – IBILCE/UNESP

Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira
Professor Assistente Doutor
Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP

São José do Rio Preto, 14 de maio de 2010

A minha família,

Ao meu pai Jamil, minha mãe Maria e meus irmãos Jorge e Alex que pavimentaram e nortearam a estrada que percorri; acompanham a minha história e compreendem melhor que os outros o significado disso.

DEDICO

Aos meus avós paternos Bernardino da Silva Quilerga e Firmiana Martins da Silva (“in memoriam”), avós maternos Antônio da Natividade de São Justo (“in memoriam”) e Lourdes Missias Morais de São Justo.

Ao meu sobrinho Gabriel por constantemente iluminar meu espírito.

Aos meus primos Bruno, Daniele, Geórgia, Gisele, Igor, João, Letícia, Marcos (Juninho) e minha cunhada Camila pela amizade.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A sociedade pelo investimento despendido.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE – UNESP) pela estrutura fornecida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz pela oportunidade de trabalhar com um tema tão interessante.

Aos funcionários do departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos pela amizade e apoio técnico.

Aos colegas de laboratório Adriana Navarro da Silva, Aline Zago de Grandi e Juliana Guerra de Oliveira pela grande amizade.

Ao professor Dr. Luiz Augusto do Amaral e a Ma. Fernanda de Rezende Pinto da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) pelo apoio nos experimentos de bioissorção.

Aos funcionários da IBILCE.

Aos docentes do programa de mestrado em Microbiologia do IBILCE.

Aos discentes do programa de mestrado em Microbiologia do IBILCE.

A CNPQ pelo apoio financeiro concedido.

Enfim, a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	02
2.1. Metais Pesados.....	02
2.1.1. Cádmio.....	04
2.1.2. Chumbo.....	06
2.1.3. Métodos convencionais e avançados de remoção de metais pesados.....	09
2.2. Biossorção.....	10
2.2.1. Biomassa fúngica como biossorvente.....	15
2.2.2. Polímeros extracelulares como biossorventes.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Gerais.....	20
3.2. Específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Material biológico.....	21
4.2. Manutenção das culturas.....	22
4.3. Obtenção do exo-biopolímero e da biomassa.....	22
4.3.1. Avaliação do crescimento.....	22
4.3.2. Variação das fontes de nitrogênio.....	22
4.3.3. Pré-inóculo.....	23
4.3.4. Fermentação submersa.....	23
4.3.5. Interrupção dos cultivos.....	24
4.4. Delineamento experimental.....	24
4.5. Determinações quantitativas analíticas.....	24
4.5.1. Determinação quantitativa da biomassa microbiana.....	24
4.5.2. Determinação do exo-biopolímero.....	25
4.5.3. Determinação do pH e volume.....	27
4.5.4. Determinação dos açúcares totais.....	27

4.5.5. Determinação dos açúcares redutores.....	27
4.5.6. Determinação das proteínas extracelulares.....	27
4.6. Avaliação da bioissorção.....	28
4.6.1. Preparação dos bioissorventes.....	28
4.6.1.1. Preparação do exo-biopolímero.....	28
4.6.1.2. Preparação da Biomassa seca (inativa).....	28
4.6.2. Preparação das soluções de chumbo e cádmio.....	28
4.6.3. Testes de bioissorção.....	29
4.6.3.1. Estudo cinético da bioissorção.....	29
4.6.3.2. Efeito da variação do pH inicial na bioissorção.....	29
4.6.3.3. Efeito da concentração inicial de metal na bioissorção.....	29
4.6.4. Determinação da massa de íon bioissorvido.....	30
4.6.5. Destino do material contaminado.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1. Avaliação do crescimento.....	32
5.2. Avaliação dos efeitos das fontes de nitrogênio sobre a produção de exo-biopolímero e biomassa.....	34
5.3. Avaliação do crescimento utilizando a melhor fonte de nitrogênio.....	38
5.4. Delineamento experimental.....	43
5.5. Testes de bioissorção.....	51
5.5.1. Bioissorção de cádmio pelo exo-biopolímero do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.....	51
5.5.1.1. Estudo cinético da bioissorção de cádmio pelo exo-biopolímero do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.....	51
5.5.1.2. Variação do pH inicial.....	52
5.5.1.3. Variação da concentração inicial de cádmio na solução.....	53
5.5.2. Bioissorção de cádmio pela biomassa seca do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.....	56
5.5.2.1. Estudo cinético da bioissorção de cádmio pela biomassa seca do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.....	56
5.5.2.2. Variação do pH inicial.....	57
5.5.2.3. Variação da concentração inicial de cádmio na solução.....	58
5.5.3. Bioissorção de chumbo pelo exo-biopolímero do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.....	60
5.5.3.1. Estudo cinético da bioissorção de chumbo pelo exo-biopolímero do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.....	60

5.5.3.2. Variação do pH inicial.....	61
5.5.3.3. Variação da concentração inicial de chumbo na solução.....	62
5.5.4. Biossorção de chumbo pela biomassa seca do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.....	64
5.5.4.1. Estudo cinético biossorção de chumbo pela biomassa seca do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.....	64
5.5.4.2. Variação do pH inicial.....	65
5.5.4.3. Variação da concentração inicial de chumbo na solução.....	67
6. CONCLUSÕES.....	68
7. PERSPECTIVAS.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICES.....	82
ANEXO.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de um processo de biossorção de metal pesado.....	14
Figura 2.	Crescimento micelial dos fungos <i>Colletotrichum</i> sp. (2A), <i>Guignardia</i> sp. (2B) e <i>Phomopsis</i> sp. (2C) em placas de Petri, meio de VGA e em estufa a 30 °C.....	21
Figura 3.	Exo-biopolímeros produzidos pelos fungos <i>Colletotrichum</i> sp. (A), <i>Guignardia</i> sp. (B) e <i>Phomopsis</i> sp. (C) incubados em shaker a 28 °C e 150 rpm, em um meio de cultivo contendo glicose 6% (p/v) e meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (p/v).....	41
Figura 4.	Curvas de crescimento dos fungos <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Guignardia</i> sp. e <i>Phomopsis</i> sp. durante o período de 240 horas, incubados em shaker a 28 °C e 150 rpm, em um meio de cultivo contendo glicose 6% (p/v) e meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (p/v).....	42
Figura 5.	Produção de exo-biopolímeros pelos fungos <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Guignardia</i> sp. e <i>Phomopsis</i> sp. durante o período de 240 horas, incubados em shaker a 28 °C e 150 rpm, em um meio de cultivo contendo glicose 6% (p/v) e meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (p/v).....	43
Figura 6.	Produção de biomassa seca em função da temperatura e tempo de cultivo.....	46
Figura 7.	Produção de biomassa seca em função da concentração inicial de glicose e a temperatura de cultivo.....	47
Figura 8.	Produção de exo-biopolímero em função da concentração inicial de glicose e a temperatura de cultivo.....	48
Figura 9.	Produção de exo-biopolímero em função de temperatura e tempo de cultivo.....	49
Figura 10.	Quantidade de cádmio biossorvido pelo exo-biopolímero do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	51
Figura 11.	Quantidade de cádmio biossorvido pelo exo-biopolímero do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em diferentes valores de pH, durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	52
Figura 12.	Quantidade de cádmio biossorvido pelo exo-biopolímero do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em função de diferentes concentrações iniciais de cádmio, durante o período de 48 horas, pH 6, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	54

Figura 13.	Quantidade de cádmio bioissorvido pela biomassa seca do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	56
Figura 14.	Quantidade de cádmio bioissorvido pela biomassa seca do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em diferentes valores de pH, durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	57
Figura 15.	Quantidade de cádmio bioissorvido pela biomassa seca do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em função de diferentes concentrações iniciais de cádmio, durante o período de 48 horas, pH 6, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	59
Figura 16.	Quantidade de chumbo bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	60
Figura 17.	Quantidade de chumbo bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em diferentes valores de pH, durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	61
Figura 18.	Quantidade de chumbo bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em função de diferentes concentrações iniciais de chumbo, durante o período de 48 horas, pH 6, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	62
Figura 19.	Quantidade de chumbo bioissorvido pela biomassa seca do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	64
Figura 20.	Quantidade de chumbo bioissorvido pela biomassa seca do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em diferentes valores de pH, durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	65
Figura 21.	Quantidade de chumbo bioissorvido pela biomassa seca do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em função de diferentes concentrações iniciais de chumbo, durante o período de 48 horas, pH 6, sob agitação de 200 rpm e 30 °C.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Vantagens e desvantagens dos processos convencionais e avançados de remoção de metais pesados (HUAMÁN-PINO, 2005, modificado).....	10
Tabela 2.	Comparação entre as principais características da biossorção e bioacumulação (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008, modificado).....	11
Tabela 3.	Fontes de nitrogênio avaliadas e suas respectivas quantidades.....	23
Tabela 4.	Delineamento experimental $3^{(3-0)}$ com 27 experimentos em duplicata.....	26
Tabela 5.	Variáveis codificadas no delineamento experimental.....	26
Tabela 6.	Parâmetros de crescimento do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. durante o período de cultivo de 240 horas a 28 °C e 150 rpm.....	32
Tabela 7.	Parâmetros de crescimento do fungo <i>Guignardia</i> sp. durante o período de cultivo de 240 horas a 28 °C e 150 rpm.....	33
Tabela 8.	Parâmetros de crescimento do fungo <i>Phomopsis</i> sp. durante o período de cultivo de 240 horas a 28 °C e 150 rpm.....	34
Tabela 9.	Parâmetros de crescimento do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. utilizando diferentes fontes de nitrogênio em 144 horas de cultivo a 28 °C e 150 rpm.....	35
Tabela 10.	Parâmetros de crescimento do fungo <i>Guignardia</i> sp. utilizando diferentes fontes de nitrogênio em 168 horas de cultivo a 28 °C e 150 rpm.....	36
Tabela 11.	Parâmetros de crescimento do fungo <i>Phomopsis</i> sp. utilizando diferentes fontes de nitrogênio em 168 horas de cultivo a 28 °C e 150 rpm.....	37
Tabela 12.	Parâmetros do crescimento do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. durante o período de cultivo de 240 horas utilizando uréia como fonte de nitrogênio a 28 °C e 150 rpm.....	38
Tabela 13.	Parâmetros do crescimento do fungo <i>Guignardia</i> sp. durante o período de cultivo de 240 horas utilizando uréia como fonte de nitrogênio a 28 °C e 150 rpm.....	39
Tabela 14.	Parâmetros do crescimento do fungo <i>Phomopsis</i> sp. durante o período de cultivo de 240 horas utilizando fosfato de amônio como fonte de nitrogênio, a 28 °C e 150 rpm.....	40
Tabela 15.	Resultados do planejamento fatorial $3^{(3-0)}$ com 27 experimentos em duplicata a 150 rpm.....	44

Tabela 16.	Significância (p) das interações lineares (L) e quadráticas (Q) entre as variáveis dependentes e independentes.....	45
Tabela 17.	Comparação entre quantidade de cádmio (Cd^{+2}) bioissorvido pelo exo-biopolímero de microrganismos reportados na literatura e o utilizado nesse estudo.....	55
Tabela 18.	Comparação entre quantidade de cádmio (Cd^{+2}) bioissorvido pela biomassa de microrganismos reportados na literatura e o utilizado nesse estudo.....	59
Tabela 19.	Comparação entre quantidade de chumbo (Pb^{+2}) bioissorvido pelo exo-biopolímero de microrganismos reportados na literatura e o utilizado nesse estudo.....	63
Tabela 20.	Comparação entre quantidade de chumbo (Pb^{+2}) bioissorvido pela biomassa seca de microrganismos reportados na literatura e o utilizado nesse estudo.....	67

SILVA, L. J. Produção de Exo-Biopolímeros por Ascomicetos e seu Potencial de Utilização na Biossorção de Cádmi e Chumbo. São José do Rio Preto.

RESUMO

Os polímeros microbianos extracelulares (exo-biopolímeros) são moléculas que apresentam um grande potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, petrolíferas, de cosméticos, têxteis, de papéis, tintas, produtos agrícolas entre outras. Como biorremediadores, podem ser utilizados na remoção de metais pesados em ambientes aquáticos poluídos, atuando como agentes de biossorção por meio da acumulação de nutrientes a partir do meio ambiente. O objetivo do trabalho foi a produção de exo-biopolímeros a partir de três Ascomicetos endofíticos (*Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e *Phomopsis* sp.). Foi selecionado o fungo que apresentou a maior produção desse material biológico. Tanto esse exo-biopolímero quanto a biomassa foram avaliados quanto aos seus potenciais de biossorção dos íons metálicos chumbo (Pb^{+2}) e cádmio (Cd^{+2}). Para a obtenção do meio de cultivo utilizado para a produção de exo-biopolímeros, foram testados o meio mínimo de sais de Vogel modificado com diferentes fontes de nitrogênio definidas e glicose como única fonte de carbono. Em seguida, foi realizado um planejamento fatorial $3^{(3-0)}$ com 27 experimentos em duplicata, onde as variáveis independentes foram o tempo, temperatura de cultivo e a concentração inicial de glicose. O fungo *Colletotrichum* sp. apresentou a maior produção de exo-biopolímero ($5,71 \text{ gL}^{-1}$) utilizando a uréia como fonte de nitrogênio, em cultivo a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm e glicose 6 % (p/v) em 192 horas de cultivo. A execução do planejamento fatorial demonstrou que a produção de biomassa seca foi favorecida por faixas de temperatura e concentração inicial de glicose entre $24 \text{ e } 32 \text{ }^\circ\text{C}$ e $35 \text{ e } 75 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente. A produção de exo-biopolímero foi favorecida por faixas de temperatura e concentração inicial de glicose entre $24 \text{ e } 36 \text{ }^\circ\text{C}$ e $35 \text{ e } 70 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente. No delineamento experimental, o fungo *Colletotrichum* sp. produziu $6,11 \text{ gL}^{-1}$ de exo-biopolímero em meio mínimo de sais de Vogel modificado com uréia como fonte de nitrogênio, glicose 5% em 216 horas de cultivo. Dentre os materiais biológicos avaliados, os exo-biopolímeros demonstraram capacidade de biossorção superiores às biomassas. Em solução aquosa com concentração inicial 150 mgL^{-1} dos íons metálicos, houve a biossorção 143,63 e 132,30 mg de chumbo e cádmio, respectivamente, por grama de biossorventes,

ambos em pH 6. No entanto, as biomassas também apresentaram capacidade de bioadsorção relativamente altas, quando comparadas com outros resultados reportados na literatura. A capacidade da biomassa do fungo *Colletotrichum* sp. de bioadsorver os íons de cádmio e chumbo foram 125,96 e 136,90 mg g^{-1} , respectivamente, ambos em solução aquosa com concentração inicial 150 mg L^{-1} e pH 6. A eficiência de remoção dos íons metálicos pelos exo-biopolímeros foi de 98,0% nas soluções de chumbo (com concentração inicial 100 mg L^{-1}) e 92,6% nas soluções de cádmio (com concentração inicial 25 mg L^{-1}), ambos em pH 6. A eficiência de remoção dos íons metálicos pelas biomassas foi de 87,4% nas soluções de chumbo (com concentração inicial 25 mg L^{-1}) e 91,3% nas soluções de cádmio (com concentração inicial 150 mg L^{-1}), ambos em pH 6, mostrando-se tanto a biomassa quanto os exo-biopolímeros materiais biológicos promissores no campo da bioadsorção.

Palavras-chave: exo-biopolímero, biomassa fúngica, bioadsorção de chumbo, bioadsorção de cádmio, metais pesados.

SILVA, L. J. Production of Exo-Biopolymers by Ascomycetes and its Potential Use in Biosorption of Cadmium and Lead. São José do Rio Preto.

ABSTRACT

The microbial extracellular polymer (exo-biopolymers) are molecules that have a great potential for application in the industries of food, pharmaceutical, oil, cosmetics, textiles, paper, paints, agricultural products and others. As bioremediation, can be used in the removal of heavy metals in polluted aquatic environments, acting as agents of bioremediation through the accumulation of nutrients from the environment. Objective of this study was to produce exo-biopolymer from three endophytic Ascomycota (*Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. and *Phomopsis* sp.). Then, was selected the fungus that showed the highest production of exo-biopolymer. Both the exo-biopolymer and biomass were assessed for their potential of biosorption of metallic ions lead (Pb^{+2}) and cadmium (Cd^{+2}). To obtain the culture medium used for the production of exo-biopolymers, was tested a minimal medium salts of Vogel modified with different nitrogen sources and glucose defined as the only carbon source. Next, was performed a factorial design $3^{(3-0)}$ with 27 experiments in duplicate, where the independent variables were the time and temperature of cultivation and the initial concentration of glucose. *Colletotrichum* sp. had the highest production of exo-biopolymer (5.71 gL^{-1}) using urea as the nitrogen source in cultivation at $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm, and glucose 6% (w/v) in 192 hours of culture. The implementation of the factorial design showed that the dry biomass production was enhanced by a range of temperatures and initial concentration of glucose between 24 and $32 \text{ }^\circ\text{C}$ and 35 and 75 gL^{-1} , respectively. The production of exo-biopolymer was favored by a range of temperatures and initial concentration of glucose between 24 and $36 \text{ }^\circ\text{C}$ and 35 and 70 gL^{-1} , respectively. In the experiment, the fungus *Colletotrichum* sp. produced 6.11 gL^{-1} of exo-biopolymer in minimal medium of Vogel salts modified with urea as nitrogen source, glucose 5% in 216 hours of cultivation. Among the biological materials evaluated, the exo-biopolymers demonstrated ability to biosorption higher than biomass. In aqueous solution with initial concentration 150 mgL^{-1} dos metal ions, there was the biosorption 143.63 and 132.30 mg of lead and cadmium, respectively, per gram of biosorbent, both at pH 6. However, as biomass also showed relatively high biosorption capacity, when compared with other results reported in the literature. The capacity of *Colletotrichum* sp. fungal biomass of cadmium and lead ions biosorption were 125.96 and

136.90 mgg^{-1} , respectively, both in aqueous solution with initial concentration 150 mgL^{-1} and pH 6. More effective removal of metal ions of the solutions was 98.0% of lead in solution with initial concentration 100 mgL^{-1} and 92.6% of the cadmium in solution with initial concentration 25 mgL^{-1} , both at pH 6. Efficiency removal of metal ion for biomass was 87.4% in solutions lead (initial concentration of 25 mgL^{-1}) and 91.3% in solutions cadmium (initial concentration of 150 mgL^{-1}), both at pH 6, showing both exo-biopolymer and biomass promising biological materials in bioremediation field.

Keywords: exo-biopolymer, fungal biomass, biosorption of lead, biosorption of cadmium, heavy metals.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por metais pesados pode representar um grande problema ecológico devido aos seus elevados potenciais como poluentes e contaminantes. Nestes casos, podem prover diversos efeitos toxicológicos em uma grande variedade de seres vivos. Como exemplos, nos seres humanos, o cádmio pode causar disfunção nos rins, danos ósseos, doenças cardiovasculares, efeitos sistêmicos, e provável indução da carcinogênese. O chumbo, de um modo geral, pode provocar danos nos sistemas nervoso, digestório e sanguíneo, apresentando sintomas como letargia, anemia, dores de cabeça e cólicas abdominais. As principais fontes de contaminação ambiental por metais pesados são as fontes antropogênicas, em especial as atividades de mineração, metalurgia, o uso de agroquímicos, lodos de esgoto, entre outras.

A remoção dos metais pesados presentes em efluentes industriais pode ser feita por meio de vários processos convencionais e avançados, tais como precipitação por via química, evaporação, osmose reversa, eletrodiálise, adsorção em carvão ativado ou alumina, oxi-redução ou permuta iônica, cristalização, coagulação, floculação, ultrafiltração, entre outros. Porém, a utilização desses processos é geralmente restrita por razões técnicas, custos operacionais ou dos materiais. Além disso, esses métodos não são eficazes na remoção de metais presentes em baixas concentrações.

A biossorção é um processo alternativo aos processos convencionais e avançados de remoção de metais pesados presentes em efluentes líquidos. Esse processo apresenta diversas vantagens como a não produção de resíduos químicos, fácil operação, baixo custo, eficiente remoção de poluentes presentes em soluções altamente diluídas, diversidade microbiana e devido a grande capacidade de muitas biomassas e de polímeros extracelulares de reter íons metálicos. As pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas tecnologias de tratamento de águas contaminadas por íons metálicos tem voltado a atenção para a capacidade de microrganismos se ligarem a metais. Essa ligação ocorre por meio de grupamentos químicos presentes em suas biomassas ou nos polímeros que estão na superfície celular.

Portanto, pesquisas visando o desenvolvimento de processos de biossorção podem ampliar as perspectivas sobre a resolução do grande problema da presença de metais pesados nas águas de descarte, considerando os seus potenciais danos aos sistemas biológicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Metais Pesados

Inúmeras atividades industriais geram resíduos com elevadas concentrações de metais pesados. Esses resíduos podem representar um grande problema ecológico devido aos seus elevados potenciais como poluentes e contaminantes.

Erroneamente refere-se indistintamente aos metais tóxicos para os seres humanos como metais pesados. Embora não exista uma clara definição de metal pesado, a densidade é tomada, na maioria dos casos, como um fator de definição. Segundo Järup (2003) os metais pesados são os elementos que tem peso específico maior que 5 gcm^{-3} . Diferente do que o termo metal pesado sugere, dentro desse grupo de elementos podem ser encontrados, além de metais, semimetais e ametais.

As principais fontes de introdução de metais pesados nos ecossistemas são as indústrias de agroquímicos com impurezas (RAMALHO, AMARAL SOBRINHO e VELLOSO, 2000), de metalurgia, destacando-se as atividades de mineração, galvanoplastia e fundição (CHAOUÍ *et al.*, 1997), o lodo de esgoto, resíduos das usinas de cana-de-açúcar como a vinhaça (CAMIOTTI *et al.*, 2007), resíduos de curtumes (BAILEY *et al.*, 1999), fabricação e descarte de baterias (BARANDAS *et al.*, 2007), entre outras. Para Veglio e Beolchini (1997) os efluentes da mineração e da metalurgia são as principais fontes de contaminação ambiental por metais pesados.

As emissões dos metais pesados para o ambiente ocorrem por meio de uma grande variedade de vias, incluindo o ar (como exemplo, durante as reações de combustão), os corpos d'água (por meio da água de escoamento superficial) e o solo (em agroquímicos) (JÄRUP, 2003).

A poluição por metais pesados ocorre em função do modelo de crescimento industrial, bem como do tipo de indústria instalada no país. Pouco se sabe sobre a dimensão do problema da contaminação por metais pesados no Brasil, considerando que não existe um levantamento abrangente ou estimativas confiáveis (PALLU, 2006). No entanto, alguns trabalhos evidenciam o grande problema que é a contaminação por metais pesados nos solos. Nos solos do Brasil, os problemas de contaminação começaram a partir de 1970 e se intensificaram nos últimos anos, com a descoberta de

depósitos clandestinos de resíduos químicos perigosos (SANTOS e RODELLA, 2007). No estado de São Paulo até novembro de 2007, o cadastro de locais contaminados era de 2.272, sendo 276 por metais pesados (CETESB, 2008).

A ingestão de água, bem como de animais aquáticos contaminados por metais pesados podem ser fontes de contaminação humana, pois, por meio da cadeia alimentar, esses metais podem alcançar o homem. Esse fato foi observado na contaminação industrial por mercúrio na baía de Minamata, no Japão, a partir de 1932. Estima-se que essa contaminação tenha resultado na morte de milhares de pessoas (CUNHA *et al.*, 2007)

No Brasil, estudos revelaram elevados níveis de contaminação por metais pesados na baía de Sepetiba, no Rio de Janeiro, (LACERDA e MOLISANI, 2006), no sistema estuarino Santos - Cubatão, em São Paulo (LUIZ-SILVA *et al.*, 2006) no rio Tarumã e alguns afluentes do rio Amazonas, no Amazonas (SANTOS *et al.*, 2006).

A toxicidade dos metais pesados varia conforme a sua concentração, tempo de exposição, forma física e química do elemento e da via de absorção (TAVARES, 1992). Sendo assim, para os microrganismos, plantas e animais, alguns metais podem ser benéficos ou inertes em pequenas quantidades. Porém, em elevadas concentrações podem apresentar efeitos tóxicos.

Alguns metais podem reagir com ligantes difusores, com macromoléculas e com ligantes presentes em membranas celulares. Estas ligações muitas vezes conferem as propriedades de bioacumulação, biomagnificação nas teias alimentares, persistência no ambiente e distúrbios nos processos metabólicos dos seres vivos (TAVARES, 1992). Segundo essa autora, as bioacumulações e biomagnificações se encarregam de transformar concentrações consideradas normais em concentrações tóxicas para diferentes espécies da biota, especialmente o homem.

2.1.1. Cádmio

O cádmio (Cd) é um metal de transição tóxico pertencente ao grupo IIB da tabela periódica. À temperatura ambiente é sólido, apresenta coloração prata-escuro, sendo encontrado na crosta terrestre em concentrações variando de 0,1 a 1 ppm. Tem número atômico 48, massa atômica 112,4 u, densidade de $8,64 \text{ gcm}^{-3}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura de ebulição de $765 \text{ }^\circ\text{C}$ e de fusão de $320,9 \text{ }^\circ\text{C}$ (IARC, 2000). No ambiente, pode ser encontrado em dois estados de oxidação (zero e +2). No entanto, o zero (estado metálico) é raro de ser encontrado. O cádmio é o 67º elemento químico mais abundante na crosta terrestre (JOSEPH, 2009).

Na natureza, esse metal é encontrado geralmente associado ao zinco, cobre e chumbo (GODT *et al.*, 2006). Portanto, o cádmio pode ser obtido como um subproduto da extração de outros metais (ATSDR, 2008). A produção, o consumo e conseqüentemente as emissões ambientais de cádmio tem aumentado drasticamente no século XX. Produtos contendo cádmio raramente são reciclados. Geralmente são descartados juntamente aos resíduos domésticos, contaminando o ambiente, especialmente se estes resíduos forem incinerados (JÄRUP, 2003). A produção de cádmio em 2009 foi estimada em 18,8 mil toneladas (USGS, 2010).

O cádmio é introduzido no ambiente por meio de atividades naturais ou antropogênicas, sendo que introdução via atividades antropogênicas corresponde de três a 10 vezes mais que as naturais (ATSDR, 2008). As principais atividades naturais responsáveis pela introdução de cádmio no ambiente são as vulcânicas, queimas de combustíveis fósseis, os incêndios em florestas e o transporte de partículas do solo contaminado (JOSEPH, 2009).

As principais atividades antropogênicas responsáveis pela introdução de cádmio no ambiente são a mineração e processamento de metais não ferrosos, manufatura e aplicação de fertilizantes não fosfatados, queima de combustíveis fósseis e disposição e incineração de resíduos (ATSDR, 2008).

Os compostos de cádmio apresentam diversas aplicações industriais. São freqüentemente utilizados em baterias de níquel-cádmio (JOSEPH, 2009), como agentes anticorrosivos, estabilizadores em produtos de PVC (policloreto de vinila), pigmentos de cor, podem estar presentes em fertilizantes fosfatados (GODT *et al.*, 2006), em

galvanoplastia, como estabilizadores em tintas, entre outras. Cerca de 80 % do consumo mundial de cádmio destina-se à produção de baterias (ATSDR, 2008).

As principais fontes de contaminação humana por cádmio são a fumaça de cigarro e os alimentos (JÄRUP, 2003; ATSDR, 2008). As plantas de tabaco podem acumular seletivamente o cádmio a partir do solo. Segundo Mannino e colaboradores (2004) os níveis sanguíneos de cádmio em fumantes são significativamente maiores que os dos não-fumantes. Além disso, os fumantes e pessoas que vivem em zonas contaminadas por cádmio geralmente tem as maiores concentrações urinárias desse metal. Em fumantes, a concentração urinária pode corresponder ao dobro da concentração urinária dos não-fumantes (JÄRUP *et al.*, 1998).

Os alimentos são a principal fonte de contaminação humana por cádmio para as populações não fumantes na maioria dos países (JÄRUP, 2003). Esse metal pode-se acumular em organismos aquáticos e em produtos agrícolas (ATSDR, 2008). Alguns alimentos vegetais podem receber o cádmio a partir do solo contaminado. Embora não seja um elemento essencial para as plantas, esse metal é absorvido a partir do solo e acumulado nas partes comestíveis, em diversas concentrações (WANG *et al.*, 2006).

As fontes antropogênicas de cádmio como as emissões industriais, a aplicação de fertilizantes na lavoura e as lamas de depuração de terras agrícolas, entre outras, podem levar à contaminação dos solos e ao aumento da captação de cádmio por culturas e produtos hortícolas, cultivadas para o consumo humano (KHOSHGOFTARMANESH e CHANEY, 2007).

A exposição ao cádmio pode provocar diversos problemas nos organismos. Nos seres humanos, pode causar disfunção nos rins (KOBAYASHI *et al.*, 2009), danos ósseos (ÅKESSON *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2009), doenças cardiovasculares (EVERETT e FRITHSEN, 2008), efeitos sistêmicos (GODT *et al.*, 2006) e provável indução da carcinogênese (JÄRUP e ÅKESSON, 2009).

O cádmio pode promover a redução na densidade mineral dos ossos, aumentando o risco de fraturas e de osteoporose. Diversos casos desse quadro clínico foram observados na cidade japonesa de Toyama na década de 50, onde o efluente de uma mineração atingiu culturas de arroz (ATSDR, 2008). A população consumidora apresentou problemas neurotóxicos, descalcificação acentuada dos ossos e osteomalácia em vários níveis de osteoporose, acompanhada de doenças renais severas e proteinúrias. Essa moléstia ficou conhecida como doença de Itai-Itai (DUDKA e MILLER, 1999).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), por meio da Resolução nº 357, estabeleceu que a concentração máxima permitida para o descarte de efluentes com cádmio em corpos d'água receptores (como exemplo, rios) é de $0,2 \text{ mgL}^{-1}$.

Portanto, é de grande importância ecológica e para a saúde humana a redução das emissões de cádmio no ambiente (GODT *et al.*, 2006), principalmente devido à sua persistência no ambiente, potencial de transferência ao longo das teias alimentares (biomagnificação) e toxicidade aos organismos.

2.1.2. Chumbo

O chumbo (Pb) é um metal representativo pertencente ao grupo IVA da tabela periódica dos elementos. Apresenta cor cinza-azulada, número atômico 82, massa atômica 207,2 u, densidade relativa de $11,4 \text{ gcm}^{-3}$ a $16 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura ebulição de $1749 \text{ }^\circ\text{C}$ e fusão de $327,4 \text{ }^\circ\text{C}$ (MOREIRA e MOREIRA, 2004). No ambiente, o chumbo pode ser encontrado em três estados de oxidação (zero, +2 e +4) (ATSDR, 2007). No entanto, apesar desse metal apresentar quatro elétrons livres na camada de valência, somente dois ionizam-se facilmente, sendo +2 o estado mais facilmente encontrado no ambiente (MOREIRA e MOREIRA, 2004).

O chumbo geralmente apresenta-se combinado com dois ou mais outros elementos (ATSDR, 2007), sendo o sulfeto de chumbo a forma mais comum na natureza (GULSON *et al.*, 2009). O chumbo não é um elemento abundante.

A principal fonte de contaminação ambiental por chumbo são as atividades antropogênicas. Nos últimos três séculos, os níveis ambientais desse metal aumentaram cerca de mil vezes (ATSDR, 2007). Sua utilização intensiva é justificada pelas suas propriedades físico-químicas características, tais como o seu baixo ponto de fusão, ductibilidade, facilidade em formar ligas metálicas (CORDEIRO e LIMA FILHO, 1995). Sua resistência à corrosão, densidade e baixa temperatura de fusão torna um metal comum em tubulações, soldas, pesos e baterias (ATSDR, 2007).

Em geral, a população está exposta ao chumbo por meio do ar e dos alimentos em proporções aproximadamente iguais (JÄRUP, 2003). As principais fontes de contaminação pelo chumbo são a mineração e o refino do chumbo, baterias, gasolina, tubulações e alguns materiais presentes em construções antigas como tintas e estruturas

metálicas (JOHANSEN *et al.*, 2006; ATSDR, 2007). No entanto, várias destas fontes como a gasolina com chumbo e pesticidas foram eliminadas em alguns países. Como consequência, a exposição humana ao chumbo tem diminuído nos últimos anos (JOHANSEN *et al.*, 2006; ATSDR, 2007). Nas últimas duas décadas, a proporção de crianças dos Estados Unidos com concentrações sanguíneas de chumbo superiores a 100 mgL^{-1} diminuiu mais de 80% (JOHANSEN *et al.*, 2006). Acredita-se que a combustão da gasolina com chumbo colaborava com mais de 50% das emissões atmosféricas (JÄRUP, 2003).

Outra fonte de contaminação ambiental e humana por chumbo são as munições de armas de fogo. Em países como a Groelândia, onde há as “estações de caça às aves”, o consumo dessas aves abatidas por munições pode ser uma fonte de contaminação humana, principalmente para as crianças, que são mais vulneráveis aos efeitos tóxicos do chumbo (JOHANSEN *et al.*, 2006).

O chumbo, a partir de uma fonte de contaminação, pode ser transportado pelo vento e se depositar no solo ou em algum corpo d’água. Em ambas situações pode atingir as teias alimentares. Presente no solo pode atingir alimentos agrícolas. O chumbo presente nos corpos d’água pode contaminar a água de consumo e os animais aquáticos utilizados como alimento humano ou também os alimentos agrícolas (JÄRUP, 2003).

Todos os seres humanos tem chumbo em seus organismos, originalmente como resultado de exposição às fontes exógenas (MOREIRA e MOREIRA, 2004). Esses níveis tem aumentado progressivamente conforme aumenta a concentração do chumbo atmosférico. Estudos em esqueletos humanos enterrados antes da disseminação do uso do chumbo demonstram um aumento de cerca de cem vezes na carga óssea do metal entre o homem vivente a 1500 a.C. e o contemporâneo (ERICSON, SMITH e FLEGAL, 1991).

Na mesma linha de pesquisa, foram relatadas elevadas concentrações de chumbo em esqueletos de contemporâneos do império romano e bizantino (MARTINEZ-GARCIA *et al.*, 2005). Esses impérios são reconhecidos como dominadores de técnicas de processamento de vários metais, dentre os quais o chumbo.

Ao atingir um organismo, o chumbo pode se concentrar principalmente no sangue (cerca de 2%), nos ossos e na dentina (cerca de 90%). No sangue, o chumbo está associado aos eritrócitos, podendo levar à anemia (JÄRUP, 2003). Esta concentração irá

evidenciar a recente exposição, considerando que a sua meia-vida biológica no sangue é de cerca de 35 dias (GORDON, TAYLOR e BENNETT, 2002).

Nos ossos e na dentina, pode apresentar uma meia-vida de 20 a 30 anos. Portanto pode permanecer nos organismos durante muitos anos após a cessação da exposição, devido à redistribuição dos ossos (GORDON, TAYLOR e BENNETT, 2002). Sendo assim, a análise da concentração de chumbo no sangue e nos ossos pode ser um fator de avaliação do grau de exposição humana a esse metal (JOHANSEN *et al.*, 2006).

O Scientific Committee on Neurotoxicology and Psychophysiology e o Scientific Committee on the Toxicology of Metals da International Commission on Occupational Health, em 2006, recomendou que o limite máximo de chumbo no sangue não deva atingir níveis superiores a $30 \mu\text{gDL}^{-1}$ para trabalhadores industriais e $5 \mu\text{gDL}^{-1}$ para crianças (MURATA *et al.*, 2009).

Diversos estudos relataram os efeitos do chumbo sobre a saúde humana (ATSDR, 2007; JÄRUP, 2003; CAVALIERI-COSTA *et al.*, 1994). Os efeitos tóxicos do chumbo são conhecidos há séculos. Nas últimas décadas foram descobertos efeitos adversos à saúde em níveis sanguíneos relativamente baixos (inferiores a 20mgDL^{-1}) em fetos e crianças (ATSDR, 2007). Estes efeitos estão associados com o desenvolvimento do organismo e do sistema nervoso central (SNC) desse grupo de indivíduos. Nesses casos, o SNC é mais susceptível ao chumbo inorgânico, pois a barreira sangue-cérebro está pouco desenvolvida, contrário aos adultos (JÄRUP, 2003). Em crianças, o chumbo pode afetar a inteligência, o tempo de reação, integração motora-visual, habilidades motoras finas, além da atenção (ATSDR, 2007) e do desenvolvimento cognitivo (GLASS *et al.*, 2009).

Altas concentrações de chumbo em adultos também podem provocar danos no SNC, pois, compostos orgânicos tal como o tetrametilchumbo pode atravessar a barreira sangue-cérebro em adultos provocando encefalopatia aguda (JÄRUP, 2003). Além do SNC, o chumbo pode provocar sintomas como letargia, anemia, dores de cabeça e cólicas abdominais (GORDON, TAYLOR e BENNETT, 2002). A intoxicação humana por chumbo é chamada de saturnismo (CAVALIERI-COSTA *et al.*, 1994).

O chumbo, diferente de outros metais – como o ferro, zinco, cobalto, cromo, manganês, cobre – é um elemento estranho ao metabolismo humano em qualquer quantidade (CORDEIRO e LIMA FILHO, 1995). Portanto, acredita-se não haver um limite inferior seguro de níveis sanguíneos de chumbo (ATSDR, 2007). Mesmo assim,

o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), por meio da Resolução nº 357, estabeleceu que a concentração máxima permitida para o descarte de efluentes com chumbo em corpos d'água receptores é de $0,5 \text{ mgL}^{-1}$.

2.2. Métodos convencionais e avançados de remoção de metais pesados

O tratamento de efluentes é um dos mais importantes objetivos das indústrias, principalmente daquelas cujos efluentes contém metais pesados como contaminantes, devido à toxicidade e à demanda de métodos específicos de remoção. Além disso, devido ao aumento do valor de alguns metais, bem como, à grande sensibilização sobre os seus danos ecológicos, o número de estudos sobre a acumulação de metais, com foco na sua recuperação a partir de soluções tem aumentado (VOLESKY, 1990).

A remoção dos metais pesados presentes em efluentes industriais pode ser feita por meio de diversos processos, tais como precipitação por via química (GIOVANNINI, TAVARES e BENDASSOLLI, 2008), evaporação (TAVARES e SILVA, 2001), osmose reversa, eletrodialise, adsorção em carvão ativado ou alumina, oxi-redução ou permuta iônica (AHLUWAHLIA e GOYAL, 2007), cristalização, coagulação, floculação, ultrafiltração, entre outros (SOUZA *et al.*, 2008).

Porém, a utilização desses processos de remoção de metais é geralmente restrita por razões técnicas, custos operacionais ou dos materiais. Além disso, os métodos convencionais de baixo custo, como o da precipitação química, não são eficientes na remoção dos metais presentes em baixas concentrações (COSTA, RUBIO e SCHNEIDER, 1999). As principais vantagens e desvantagens dos processos convencionais e avançados de remoção de metais pesados encontram-se apresentados na

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos processos convencionais e avançados de remoção de metais pesados (HUAMÁN-PINO, 2005, modificado)

Processo	Desvantagens	Vantagens
Precipitação química e filtração	Separação difícil em elevadas concentrações, pouco efetiva e produção de lamas	Simple e de baixo custo
Oxidação e redução biológica	Lenta taxa de conversão e sensibilidade ao clima	Mineralização
Oxidação e redução química	Requer agentes químicos	Mineralização
Tratamento eletroquímico	Útil somente em elevadas concentrações e custo elevado	Possibilita a recuperação dos metais
Osmose reversa	Altas pressões e custo elevado	Efluente puro (para reciclagem)
Troca iônica	Sensível à presença de partículas. As resinas apresentam custo elevado	Possível recuperação do metal
Adsorção	Não efetivo para alguns metais	Adsorventes convencionais (carvão)

2.3. Biossorção

Os graves problemas ambientais causados pelo aumento do lançamento de efluentes industriais ricos em metais pesados nos rios e mares, aliados às leis ambientais cada vez mais rigorosas, tem estimulado as pesquisas no campo da biossorção. Essas pesquisas visam à obtenção de métodos alternativos de baixo custo e mais eficientes no tratamento de águas residuais e despejos (AGUIAR, NOVAES e GUARINO, 2002).

A biossorção é definida como a remoção de compostos metálicos de uma solução por meio de um material biológico (biossorvente). Essa remoção deve ser desprovida da ação do metabolismo do biossorvente, do contrário ela será melhor denominada “bioacumulação”. Portanto, a biossorção pode ocorrer em seres vivos ou mortos, enquanto que a bioacumulação apenas pode ocorrer em organismos vivos (CALFA e TOREM, 2007). A Tabela 2 apresenta as principais diferenças entre a bioacumulação e a biossorção.

Tabela 2 – Comparação entre as principais características da biossorção e bioacumulação (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008, modificado)

Característica	Biossorção	Bioacumulação
Custo	Geralmente baixo. A maioria dos biossorbentes utilizados é de origem industrial, agrícola e outros tipos de resíduos de biomassa	Geralmente elevado, já que, o processo envolve células ativas
pH	Influencia fortemente a capacidade de adsorção. O processo pode ser operado em ampla faixa de pH	Além do processo de adsorção, as células ativas são afetadas pelo pH
Temperatura	Com biomassa inativa, o processo não é influenciado	Afeta seriamente o processo
Manutenção/ Armazenamento	Fácil de armazenar e utilizar	Energia metabólica externa é necessária para a manutenção da cultura
Seletividade aos metais	Pobre. Pode ser melhorada por modificação/ transformação da biomassa	Melhor do que na biossorção
Versatilidade aos metais	Razoavelmente boa. Os sítios de ligação podem acomodar grande variedade de íons	Pouco flexível. Propenso a ser afetado por elevadas concentrações metal/ sal
Grau de adsorção	Muito alta. Algumas biomassas acomodam uma quantidade de produto tóxico quase tão elevada quanto o seu peso seco	Geralmente baixa, já que, as células ativas são sensíveis às altas concentrações de substâncias tóxicas
Taxa de adsorção	Geralmente rápida	Geralmente mais lenta que a biossorção
Afinidade à tóxicos	Alta em condições favoráveis	Depende da toxicidade do poluente
Regeneração e reutilização	Alta possibilidade de regeneração e reutilização do biossorbente ao longo de certo número de ciclos	Chances limitadas, já que, a maioria das substâncias tóxicas é acumulada intracelularmente
Recuperação dos tóxicos	A recuperação dos tóxicos é possível	A biomassa não poderá ser utilizada no próximo ciclo

Existem muitos mecanismos por meio dos quais os metais podem ser removidos de uma solução e incorporados à superfície de um bioissorvente. Esses mecanismos se devem principalmente à química complexa das superfícies dos diversos bioissorventes. O mecanismo pode ser devido à troca iônica, sorção física, sorção química, reação química, ao compartilhamento ou doação de um par de elétrons e vários outros (CALFA e TOREM, 2007).

A bioissorção é um processo alternativo aos processos convencionais e avançados de remoção de metais pesados com diversas vantagens. Esse processo não produz resíduos químicos, possui fácil operação, apresenta baixo custo e eficiente remoção de poluentes em soluções altamente diluídas (TEWARI, VASUDEVAN e GUHA, 2005; GADD, 1993). Segundo Volesky (1990) os métodos convencionais avançados de remoção de metais apresentam diversas desvantagens quando estes se apresentam em concentrações inferiores a 100 mgL^{-1} . Já Tomko e colaboradores (2006) afirmam que os tratamentos convencionais e avançados são menos efetivos para soluções com concentrações iônicas inferiores a 10 mgL^{-1} . Além disso, a bioissorção pode ser empregada no tratamento de efluentes contaminados tanto por metais quanto por compostos orgânicos. Outra vantagem é o baixo custo do material bioissorvente, considerando que a matéria prima pode ser obtida a partir dos descartes industriais, urbanos, florestais ou agrícolas (BONIOLO, 2008).

A bioissorção é um processo passivo, rápido e potencialmente reversível, realizado tanto por biomassa viva quanto por biomassa morta, no qual atuam forças físico-químicas que promovem a atração e a ligação dos íons metálicos, moléculas ou materiais particulados à biomassa (GADD, 1993). Segundo Huamán-Pino (2005) biomassa é toda matéria orgânica de origem vegetal, animal ou microbiana, incluindo os materiais procedentes de suas transformações naturais ou artificiais. Duas outras definições são importantes dentro do contexto da bioissorção: absorção, que é a captura de metais para o interior da célula, sendo geralmente um processo dependente do metabolismo; adsorção, que é a captura de metais por meio da associação extracelular passiva com a exposição a superfícies de biomassa (CALFA e TOREM, 2007).

Portanto, conforme a dependência do metabolismo celular, os mecanismos de bioissorção podem ser classificados em dependentes e não dependentes do metabolismo. Por outro lado, podem ser classificados de acordo com o modo no qual o metal é

removido da solução: acumulação/precipitação extracelular, sorção e precipitação na superfície celular e acumulação intracelular (VEGLIO e BEOLCHINI, 1997).

As pesquisas sobre biossorção apresentam grande variedade de materiais biológicos que podem ser utilizados para a remoção de metais pesados. Essas pesquisas estão voltadas à avaliação da capacidade de biossorção das biomassas ou seus derivados a um baixo custo e em baixas concentrações (VIEIRA e VOLESKY, 2000; HUAMÁN-PINO, 2005). Dentre os materiais biossorbentes, pode ser destacada a utilização de microrganismos como bactérias (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008), fungos filamentosos (PALLU, 2006), leveduras (FERREIRA *et al.*, 2007), algas (ROMERA *et al.*, 2007). Outros trabalhos relataram a utilização de banana (BONIOLO, 2008), casca de coco verde (HUAMÁN-PINO, 2005), serragem e bagaço da cana-de-açúcar (ALBERTINI, CARMO e PRADO FILHO, 2007) e biomassa de samambaias (HO, 2003).

Além das biomassas acima citadas, alguns autores utilizaram produtos do metabolismo microbiano na biossorção, como o biogás (NAMASIVAYAM e YAMUNA, 1995), biopolímeros como exopolissacarídeos (ACOSTA *et al.*, 2005), entre outros.

O que torna os estudos de biossorção ainda mais atrativos é que, quando empregados, podem ser um importante componente no tratamento de efluentes líquidos e no desenvolvimento de bioprocessos flexíveis, com a possibilidade de reutilização de biomassa industrial (PALLU, 2006).

A biossorção depende de fatores como concentração do íon e do biossorvente na solução, tipo de metal e de material biossorvente, tempo de biossorção, temperatura, pH, volume, presença de outras substâncias e outros ligantes, (FERREIRA *et al.*, 2007).

Estudos recentes de biossorção tem utilizado espectrofotometria de absorção atômica na detecção da quantidade de metal residual na solução (IQBAL, SCHIEWERB e CAMERON, 2009; BABARINDE, BABALOLA e SANNI, 2006; COPELLO *et al.*, 2008). A quantidade de metal biossorvido é obtida por meio da diferença entre a concentração de metal contido na solução antes do contato com o biossorvente e após o contato, ou seja, de forma indireta (PALLU, 2006). A Figura 1 apresenta um esquema de um processo de biossorção empregando biomassa como material biossorvente.

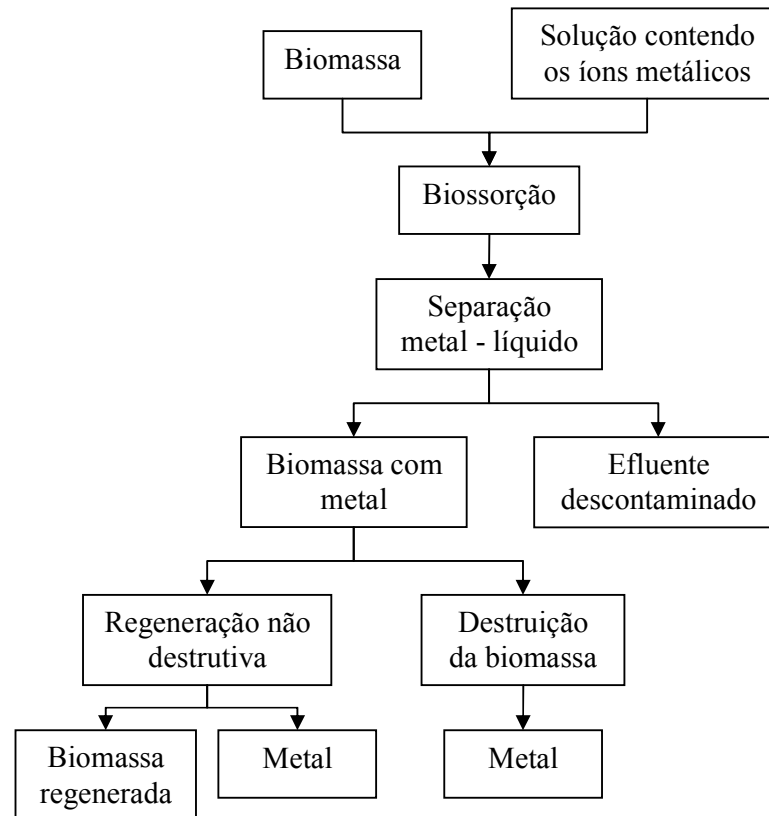


Figura 1 – Esquema de um processo de biossorção de metal pesado por meio de biomassa.

Para a implementação de uma tecnologia de biossorção, diversos requisitos devem ser estabelecidos para que o processo apresente competitividade técnica e econômica. A biomassa deve ter capacidade de acumulação elevada, na ordem de 70 a 100 mg de metal por grama de biossorvente; a absorção e a adsorção devem ser rápidas e eficientes; o material biológico deve apresentar baixo custo, ser reutilizável, ser adaptável a diferentes configurações de reatores e a separação do metal retido deve ser fácil e de baixo custo (PALLU, 2006).

2.4. Biomassa fúngica como biossorvente

As pesquisas sobre o desenvolvimento de novas tecnologias no tratamento de águas contaminadas por íons metálicos tem voltado a atenção para a capacidade de biomassas de microrganismos como as bactérias, leveduras, algas, fungos ou as bactérias filamentosas se ligarem a metais (LOUKIDOU *et al.*, 2003).

Além dessa capacidade de ligação, essa atenção especial justifica-se também pela grande diversidade microbiana. Estima-se existir cerca de dois milhões de microrganismos na biosfera (ZILLI *et al.*, 2003). Dentre esses, 1,5 milhão seriam espécies de fungos e apenas 4.700 foram descritas (PALLU, 2006).

Os primeiros trabalhos sobre ligação de metais com biomassas surgiram a partir do interesse dos efeitos de espécies metálicas sobre as atividades metabólicas de culturas de fungos, envolvendo a produção de produtos químicos ou produtos farmacêuticos, em processos de fermentação em larga escala (VOLESKY, 1990). Segundo esse autor, esses estudos mostravam-se importantes já que a presença ou a ausência de certos metais no caldo de fermentação poderia afetar a atividade de enzimas envolvidas em reações metabólicas chave. O comprometimento dessas reações poderia resultar no acúmulo de produtos metabólicos de interesse industrial no meio intracelular.

Estudos avaliando a tolerância de algumas culturas de fungos a metais pesados revelaram não só uma elevada resistência de algumas cepas, mas também a acumulação de metais na biomassa. Essa descoberta desenvolveu uma nova área de estudo em torno de biossorventes passivos (VOLESKY, 1990). A captura dos íons metálicos pela biomassa é um processo passivo executado por meio de interações físico-químicas entre os íons e os grupos funcionais presentes na superfície da biomassa (BONIOLO, 2008).

A utilização de biomassa inativa (morta) para a biossorção de metais pesados é bastante favorável, pois elimina o problema da toxicidade e outros fatores que influenciam no crescimento do microrganismo (VOLESKY, MAY e HOLAN, 1993). Além disso, os processos não estão governados por limitações biológicas, apresentam baixo custo, são rápidos, eficientes, os metais são facilmente liberados e recuperados (CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2000).

A compreensão da capacidade das biomassas fúngicas de se ligarem a metais deve ser pautada na composição química da parede celular. De um modo geral, os grupos eletronegativos presentes na parede celular dos fungos são os principais grupos químicos que participam do processo de biossorção. Esses grupos estão presentes principalmente em polímeros protéicos, lipídeos, carboidratos como quitina, quitosana, α -glucanas, β -glucanas, mananas, glicoproteínas, D-galactosamina, poliuronídeos e pigmentos como a melanina (ALEXOPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996; VOLESKY, 1990). Os principais grupos químicos são as sulfidrilas, hidroxilas, acetamidas, carboxilas, fosfatos e aminas.

Estudos recentes tem utilizado biomassa fúngica como biossorvente de metais pesados (IQBAL, SCHIEWERB e CAMERO, 2009; BHAINSA e D'SOUZA, 2008; PAKSHIRAJAN e SWAMINATHAN, 2009).

Pakshirajan e Swaminathan (2009) obtiveram a remoção de 43% do cádmio inicial com células ativas do fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Essa eficiência de remoção foi alcançada a partir de uma concentração inicial de 11 mgL^{-1} de cádmio. Chen e colaboradores (2008) relataram uma eficiência de remoção de 92,5% do cádmio inicial, a partir da concentração de 20 gL^{-1} de biomassa inativa do fungo *Lentinus edodes* e concentração inicial de cádmio de 20 mgL^{-1} .

Amini e colaboradores (2008) atingiram a eficiência de remoção de 82,2% do cádmio inicial utilizando biomassa do fungo *Aspergillus niger*. Segundo esses autores, os grupos funcionais que desempenham o papel de sítios ativos responsáveis pela biossorção estão na parede celular do fungo. Esses grupos funcionais são a carboxila, fosfato, sulfato, aminoácidos, amida e grupos hidroxila.

Breierová e colaboradores (2002) avaliaram a toxicidade e a absorção de cádmio em oito espécies de leveduras. Os resultados desse estudo demonstraram que a cepa de *Hansenula anomala* foi capaz de remover 90% do cádmio inicial. De acordo com esses autores essa remoção pode ser atribuída às glicoproteínas extracelulares.

Amini e colaboradores (2008) obtiveram a remoção de 96,21% do chumbo inicial a partir de $3,74 \text{ gL}^{-1}$ de células inativas de *Aspergillus niger* pré-tratadas com hidróxido de sódio e concentração inicial de chumbo de $19,28 \text{ mgL}^{-1}$. Anayurt, Sari e Tuzen (2009) relataram uma eficiência de remoção de 95% do chumbo inicial, a partir de biomassa inativa do fungo *Lactarius scrobiculatus* pré-tratada com ácido clorídrico e nítrico a 1 M.

Muraleedharan e colaboradores (1995) comparando estudos de biossorção de cobre a partir de biomassas fúngicas, concluíram que o produto comercial Filtrasorb 400 foi superado pelas diversas biomassas: em quatro vezes por biomassa de *Aspergillus niger* ou de *Cladosporium resinae*, em cinco vezes pela biomassa de *Penicillium italicum*, em 8,3 vezes pela biomassa de *Rhizopus arrhizus* e em 12,7 vezes pela biomassa de *Ganoderma lucidum*.

2.5. Polímeros extracelulares como biossorventes

As substâncias poliméricas extracelulares (exo-biopolímeros) de origem microbiana podem ser uma mistura complexa de biopolímeros compreendendo polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, ácidos urônicos, substâncias húmicas, lipídios, entre outros (PAL e PAUL, 2008). Esses exo-biopolímeros podem ser produzidos por diversos microrganismos, principalmente os fungos (PARK *et al.*, 2002), as bactérias (PAL e PAUL, 2008) e as algas (MISHRA e JHA, 2009).

Esses materiais biológicos podem ser encontrados nos microrganismos em duas formas diferentes: bem organizados na forma de cápsulas ou em forma difusa como muco celular ou camada limosa, aumentando substancialmente a viscosidade do caldo durante a fermentação (MADINGAN, 2004). Funcionalmente os exo-biopolímeros ajudam as células microbianas na agregação, aderência ao substrato, formação de flocos, proteção contra dessecação e resistência à materiais nocivos exógenos (PAL e PAUL, 2008). Kay e colaboradores (1993) relataram que estes biopolímeros são, na sua maioria, compostos atóxicos, biodegradáveis, produzidos extracelularmente por microrganismos não patogênicos a partir de fermentações em batelada, com eficiência próxima a 50% de conversão do substrato.

O conhecimento de técnicas avançadas de controle genético e das rotas biossintéticas efetuadas pelos microrganismos pode levar ao desenvolvimento de novos materiais poliméricos, implementando assim a indústria dos biopolímeros (ARGOLO, 2002). Além disso, a implementação dessa indústria pode ser justificada pela grande diversidade, rápido crescimento e versatilidade nutricional microbiana. Por esses motivos há o crescente interesse pelo isolamento e identificação dos exo-

biopolímeros microbianos, com enfoque em suas aplicações, pois esses seres vivos se destacam como fontes promissoras (ARGOLO, 2002).

Devido à ampla diversidade em estrutura e propriedades físicas, os exo-biopolímeros possuem muitas aplicações em indústrias de alimentos, farmacêuticas, petrolíferas, de cosméticos, têxteis, de papéis, de tintas, de produtos agrícolas, entre outras (SOUZA e GARCIA-CRUZ, 2004; CORRADI DA SILVA *et al.*, 2006). Segundo Souza e Garcia-Cruz (2004) algumas dessas aplicações, dependendo de sua estrutura química, incluem seu uso como emulsificantes, estabilizantes, ligantes, agentes geleificantes, coagulantes, lubrificantes, formadores de filme, espessantes e agentes suspensores.

Para obtenção dos exo-biopolímeros é indispensável o estabelecimento de um meio de cultura adequado. Segundo Barbosa e colaboradores (2004) os fatores culturais que interferem na produção de exo-biopolímeros são: fonte de carbono, nitrogênio orgânico e inorgânico, aeração, agitação, microelementos e adição de antiespumantes. Para Souza e Garcia-Cruz (2004) o microrganismo produtor, a composição do meio de cultivo, o pH e a temperatura de incubação também apresentam grande importância. Além desses, estudos desenvolvidos com cepas selvagens devem levar em conta o seu meio ambiente natural para adequar, em laboratório, o meio de cultivo em termos de características nutricionais.

Os exo-biopolímeros microbianos apresentam importância na área ambiental, podendo ser empregados na remoção de metais pesados ou radioativos de ambientes poluídos (GEDDIE e SUTHERLAND, 1993). Esses materiais biológicos podem atuar como agentes de bioissorção por meio da acumulação de nutrientes a partir do meio ambiente (PAL e PAUL, 2008; ACOSTA *et al.*, 2005; MORILLO *et al.*, 2006; KIRAN e KAUSHIK, 2008).

Acosta e colaboradores (2005) reportaram 1,60 mg como a quantidade máxima de cobre captado por grama de exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Paenibacillus polymyxa*. Morillo e colaboradores (2006) relataram a remoção de 230 mg de chumbo por grama do exo-biopolímero produzido pelo fungo *Paenibacillus jamilae*. Kiran e Kaushik (2008) alcançaram a eficiência de remoção de 157 mg de cromo por grama do exo-biopolímeros obtido a partir da cianobactéria *Lyngbya putealis* HH-15.

Loaec, Olier e Guezennec (1998) avaliaram a bioissorção de exo-biopolímeros obtidos de bactérias associadas a condições hidrotermais, em mar profundo. Esses materiais biológicos foram capazes de remover 316 mg, 154 mg e 77 mg de chumbo,

cádmio e zinco, respectivamente. Segundo esses autores, as fortes propriedades de quelação entre os polímeros e os três metais selecionados fazem desse biossorvente uma possível alternativa para o tratamento de águas residuais, ao invés da utilização de métodos convencionais e avançados.

Estudos envolvendo sistemas de biossorção são usualmente baseados em dois tipos de investigação, sendo o primeiro a biossorção de metais em quantidades determinadas e o segundo a determinação de biossorção em sistemas contínuos (VOLESKY e HOLAN, 1995; PALLU, 2006). Os objetivos do presente trabalho consideraram o primeiro tipo de investigação.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

Avaliar a produção de polímeros extracelulares (exo-biopolímeros) por três Ascomicetos e testar o potencial desse exo-biopolímero e da biomassa produzida na bioissorção de cádmio e chumbo.

3.2. Específicos

- Avaliar os parâmetros de crescimento e produção de exo-biopolímeros por três Ascomicetos a partir do meio mínimo de sais de Vogel;
- Avaliar a melhor produção de exo-biopolímero pelos três Ascomicetos por meio da substituição da fonte de nitrogênio do meio mínimo de sais de Vogel (nitrato de amônio) por uréia, glutamato de sódio, nitrato de sódio, sulfato de amônio e fosfato de amônio;
- Selecionar o fungo que apresentar a melhor produção de exo-biopolímero e a partir deste, avaliar por meio de um planejamento experimental o efeito do tempo, da temperatura e concentração inicial de glicose na produção de biomassa seca e exo-biopolímero;
 - Avaliar o potencial da biomassa seca na bioissorção de cádmio e chumbo;
 - Avaliar o potencial do exo-biopolímero na bioissorção de cádmio e chumbo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Foram utilizados três Ascomicetos endofíticos: *Colletotrichum* sp. (Figura 2A), *Guignardia* sp. (Figura 2B) e *Phomopsis* sp. (Figura 2C). Esses fungos foram isolados de plantas da Amazônia e são pertencentes à coleção da professora Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza, da Universidade do Estado do Amazonas, Laboratório de Bioensaios e de Genética.

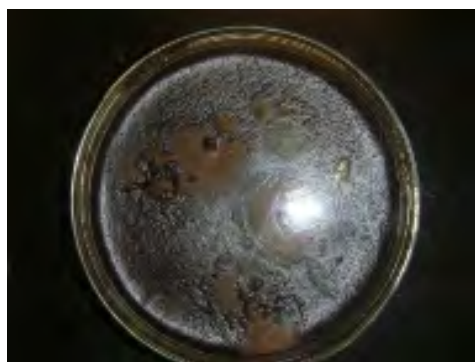
**A****B****C**

Figura 2 – Crescimento micelial dos fungos *Colletotrichum* sp. (2A), *Guignardia* sp. (2B) e *Phomopsis* sp. (2C) em placas de Petri, meio de VGA e em estufa a 30 °C.

4.2. Manutenção das culturas

Todos os microrganismos foram mantidos em tubos de ensaio (tubos inclinados) contendo 2,5 mL de meio de cultura. Esse meio foi produzido a partir de meio mínimo de sais de Vogel (VOGEL, 1956) 2% (v/v), ágar 2% (p/v) e glicose 1% (p/v), sendo codificado como meio VGA. As culturas permaneceram armazenadas em incubadora de BOD a 28 °C e foram realizados repiques trimestrais. A composição do meio mínimo de sais de Vogel encontra-se detalhada no Anexo. As culturas originais foram mantidas em água destilada, segundo método proposto por Castellani (1967).

4.3. Obtenção do exo-biopolímero e da biomassa

4.3.1. Avaliação do crescimento

Foram realizadas curvas de crescimento com intervalos de 240 horas (10 dias), variando o tempo de interrupção dos cultivos, em períodos regulares de 24 horas, sendo que a primeira interrupção foi feita a partir das primeiras 48 horas. Concomitante à produção de biomassa foram medidos os açúcares redutores e totais, proteínas extracelulares, a variação do pH e curva de produção dos exo-biopolímeros, conforme descritos no item 4.5. Todo o experimento foi realizado a 28 °C, 150 rpm, em duplicata e com controle.

4.3.2. Variação das fontes de nitrogênio

A padronização dos meios de cultura utilizados na produção dos exo-biopolímeros e das biomassas foi feita por meio da substituição da fonte de nitrogênio presente no meio mínimo de sais de Vogel (nitrato de amônio) pelas fontes de nitrogênio definidas inorgânicas nitrato de sódio (NaNO_3), sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ e fosfato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) e da fontes definidas orgânicas glutamato de sódio e uréia. As concentrações utilizadas estão descritas na Tabela 3. Todas as concentrações apresentam a mesma quantidade de nitrogênio. Após a seleção da fonte de nitrogênio mais eficaz na produção de exo-biopolímero e biomassa, foi realizada outra curva de crescimento.

Tabela 3 – Fontes de nitrogênio avaliadas e as respectivas concentrações empregadas nos experimentos de variação das fontes de nitrogênio

Fonte de nitrogênio	Concentrações*
Uréia	75 gL ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	165 gL ⁻¹
glutamato de sódio	317 gL ⁻¹
NaNO ₃	212,5 gL ⁻¹
NH ₄ H ₂ PO ₄	287,5 gL ⁻¹
NH ₄ NO ₃	100 gL ⁻¹

* As concentrações apresentam as mesmas quantidade de nitrogênio

4.3.3. Pré-inóculo

Porções das hifas dos fungos foram transferidas dos tubos inclinados para placas de Petri (Figuras 2A, 2B e 2C) contendo meio de VGA previamente esterilizados. Em seguida, essas placas foram incubadas de seis a sete dias em estufa a 30 °C. Após o período de incubação, porções das hifas dos fungos foram transferidas das placas de Petri para 50 mL de meio de cultura líquido em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, estéreis. Os meios de cultura líquidos continham meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (v/v), obtido conforme item 4.3.2 e glicose 1% (p/v). O pré-inóculo foi mantido sob agitação constante em shaker orbital rotatório de 4-5 dias, a 28 °C ± 2°C e 150 rpm.

Após esse período, o pré inóculo foi interrompido por meio de centrifugação (4 °C) a 7077g durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e a biomassa homogeneizada. Em seguida, a biomassa foi ajustada com uma solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,9% - p/v) até atingir uma Densidade Ótica de 0,5 a 400 nm (DO_{λ400}) em espectrofotômetro SP 1105 (SF 325 nm). Essa DO_{λ400} foi correlacionada com concentração inicial de células utilizadas como inóculo do cultivo.

4.3.4. Fermentação submersa

As células foram cultivadas em um meio sintético definido (meio mínimo de sais de Vogel modificado), contendo glicose 6% (p/v) como única fonte de carbono e energia. Para o cultivo foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 45 mL do meio sintético e 5 mL de solução de células, preparada conforme item 4.3.3.

Os cultivos foram agitados a 150 rpm em shaker orbital rotatório, com temperatura de $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

4.3.5. Interrupção dos cultivos

Os cultivos foram interrompidos por meio de centrifugação (4 °C) a $7077g$ durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados com gaze (tecido de algodão) para a remoção da biomassa residual e armazenados para posteriores determinações analíticas. A biomassa separada foi encaminhada para determinação gravimétrica em estufa a 60 °C . Todos os métodos de determinações analíticas quantitativas estão descritos no item 4.5.

4.4. Delineamento experimental

Para o fungo que apresentou a maior produção de exo-biopolímero e biomassa, foi realizado, com auxílio do programa STATISTICA 7.0, um planejamento experimental completo do tipo $3^{(3-0)}$ com 27 corridas e em duplicata, de acordo com o método proposto por Box e colaboradores (1978) e que está apresentado na Tabela 4. As variáveis X_1 , X_2 e X_3 correspondem ao tempo (horas), à temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e à concentração inicial de glicose (gL^{-1}), respectivamente. O delineamento foi codificado de acordo com a Tabela 5.

A fonte de nitrogênio utilizada nesse planejamento foi a melhor fonte estabelecida no item 4.3.2. Os procedimentos de quantificação das biomassas e exo-biopolímeros foram os mesmos descritos nos itens 4.5.1 e 4.5.2., respectivamente.

4.5. Determinações quantitativas analíticas

4.5.1. Determinação quantitativa da biomassa microbiana

As biomassas foram determinadas por gravimetria, após secagem em estufa a 60 °C até o atingir o peso constante.

4.5.2. Determinação do exo-biopolímero

Os sobrenadantes dos cultivos receberam etanol 95% (v/v) previamente resfriado, na proporção 3:1 (três volumes de etanol para um volume do sobrenadante), foi agitado vigorosamente e deixado *overnight* a 4 °C. Em seguida, a mistura resultante foi centrifugada a 7077g durante 15 minutos e filtrada com papel de filtro com poros de 0,45 µm de diâmetro, previamente seco em estufa. A quantidade de exo-biopolímero produzido foi determinada por gravimetria, após secagem em estufa a 60 °C até o atingir o peso constante.

Tabela 4 – Delineamento experimental $3^{(3-0)}$ com 27 experimentos em duplicata

Corrida	X_1	X_2	X_3
01	-1	-1	-1
02	-1	-1	0
03	-1	-1	1
04	-1	0	-1
05	-1	0	0
06	-1	0	1
07	-1	1	-1
08	-1	1	0
09	-1	1	1
10	0	-1	-1
11	0	-1	0
12	0	-1	1
13	0	0	-1
14	0	0	0
15	0	0	1
16	0	1	-1
17	0	1	0
18	0	1	1
19	1	-1	-1
20	1	-1	0
21	1	-1	1
22	1	0	-1
23	1	0	0
24	1	0	1
25	1	1	-1
26	1	1	0
27	1	1	1
28	-1	-1	-1
29	-1	-1	0
30	-1	-1	1
31	-1	0	-1
32	-1	0	0
33	-1	0	1
34	-1	1	-1
35	-1	1	0
36	-1	1	1
37	0	-1	-1
38	0	-1	0
39	0	-1	1
40	0	0	-1
41	0	0	0
42	0	0	1
43	0	1	-1
44	0	1	0
45	0	1	1
46	1	-1	-1
47	1	-1	0
48	1	-1	1
49	1	0	-1
50	1	0	0
51	1	0	1
52	1	1	-1
53	1	1	0
54	1	1	1

Tabela 5 – Variáveis codificadas no delineamento experimental

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
X_1	168	192	216
X_2	19	27	35
X_3	20	50	80

X_1 Tempo de cultivo (h); X_2 Temperatura de cultivo ($^{\circ}\text{C}$); X_3 Concentração inicial de glicose (gL^{-1})

4.5.3. Determinação do pH e volume.

Os volumes dos sobrenadantes dos cultivos foram determinados por meio de uma proveta de 100 mL. O pH foi determinado, diretamente do meio de cultura, por meio de um pHmetro modelo Digimed DM20, devidamente calibrado.

4.5.4. Determinação dos açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método do fenol sulfúrico, descrito por Dubois e colaboradores (1956). Para isso, 500 μ L dos sobrenadantes das amostras (ou suas respectivas diluições) foram transferidos para tubos de ensaio de 20 mL. Em seguida foram adicionados 500 μ L de fenol 5% (p/v) e 2,5 mL ácido sulfúrico. Foi utilizada uma solução de glicose 0,01% (p/v) como padrão para elaboração da curva de calibração (Apêndice 1). A leitura foi realizada em espectrofotômetro SP 1105 (SF 325 nm) em $\lambda = 490$ nm.

4.5.5. Determinação dos açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados segundo o método de Somogyi e Nelson, pela redução de átomos de cobre em meio alcalino (NELSON, 1944 e SOMOGYI, 1945). Para isso, 500 μ L dos sobrenadantes das amostras (ou suas respectivas diluições) foram transferidos para tubos de ensaio de 20 mL. Em seguida foram adicionados 500 μ L de reativo de Somogyi e fervido durante 10 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 500 μ L do reativo de Nelson e 3,5 mL de água deionizada. Foi utilizada uma solução de glicose 0,01% (p/v) como padrão para elaboração da curva de calibração (Apêndice 2). A leitura foi realizada em espectrofotômetro SP 1105 (SF 325 nm) em $\lambda = 540$ nm.

4.5.6. Determinação das proteínas extracelulares

A dosagem de proteínas extracelulares foi realizada segundo o método proposto por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão para elaboração da curva de calibração (Apêndice 3). Para isto, foram coletadas alíquotas de

1 mL do sobrenadante de cada amostra, e transferidas para tubos de ensaio de 7 mL. Em seguida foram adicionados 100 μ L do reagente Bradford (10 mg de Coomassie Brilliant Blue – G250, 5 mL de etanol 95% (v/v), 10 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) 85% (p/v) e completado para 100 mL com água deionizada). A leitura foi realizada em espectrofotômetro SP 1105 (SF 325 nm) em $\lambda = 595$ nm.

4.6. Avaliação da bioissorção

A partir dos testes anteriores foi selecionado o fungo que apresentou maior produção de exo-biopolímero. Tanto o exo-biopolímero quanto a biomassa foram avaliados quanto aos seus potenciais de bioissorção dos íons metálicos chumbo e cádmio, ambos no estado de oxidação +2.

4.6.1. Preparação dos bioissorventes

4.6.1.1. Preparação do exo-biopolímero

O exo-biopolímero avaliado foi obtido como descrito nos itens 4.3 e 4.5.2. No entanto, após ser filtrado em papel de filtro, o exo-biopolímero foi liofilizado.

4.6.1.2. Preparação da Biomassa seca (inativa)

A biomassa seca foi obtida por meio de secagem em estufa a 60 °C durante seis dias e em seguida foi triturada. Para verificação da morte celular foram realizadas inoculações em meio sólido.

4.6.2. Preparação das soluções de chumbo e cádmio

Foram avaliadas soluções de dois diferentes íons metálicos: chumbo e cádmio, que foram obtidos por meio da dissolução do nitrato de chumbo [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$] e do cloreto de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$) em água deionizada.

4.6.3. Testes de biossorção

As unidades experimentais dos testes de biossorção foram frascos de Erlenmeyer de 250 mL, dentro dos quais foram adicionados 50 mL de solução dos íons metálicos (chumbo ou cádmio) e um grama dos biossorbentes (exo-biopolímero ou biomassa seca). Os experimentos foram executados em shaker orbital rotatório (equilíbrio dinâmico), com rotação de 200 rpm a 30 °C em duplicata.

4.6.3.1. Estudo cinético da biossorção

A cinética do equilíbrio da biossorção foi avaliada pela interrupção dos testes de biossorção em diferentes intervalos de tempo: 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48 horas. A concentração inicial dos íons metálicos empregada nos testes de biossorção foi de 100 mgL⁻¹ e foram quantificados os pH iniciais e finais.

4.6.3.2. Efeito da variação do pH inicial na biossorção

Foram avaliados três valores de pH inicial (3, 6 e 9). O tempo de biossorção adotado foi obtido a partir do estudo da cinética do equilíbrio, descrito no item 4.6.3.1. A concentração inicial dos íons metálicos foi de 100 mgL⁻¹. O pH das amostras foi ajustado com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M e determinado por meio de um pHmetro modelo Digimed DM20, devidamente calibrado.

4.6.3.3. Efeito da concentração inicial de metal na biossorção

Foram avaliadas seis concentrações iniciais de chumbo e cádmio: 150, 125, 100, 75, 50 e 25 mgL⁻¹. As concentrações de chumbo (Pb⁺²) foram obtidas dissolvendo-se 23,97; 19,98; 15,98; 11,98; 7,99 e 3,99 mg de nitrato de chumbo [Pb(NO₃)₂] em 100 mL de água deionizada. As concentrações de cádmio (Cd⁺²) foram obtidas dissolvendo-se 30,46; 25,39; 20,31; 15,23; 10,15 e 5,08 mg de cloreto de cádmio [CdCl₂ 2,5 H₂O] em 100 mL de água deionizada. O tempo de biossorção adotado foi obtido com base no estudo da cinética do equilíbrio, descrito no item 4.6.3.1.

4.6.4. Determinação da massa de íon bioissorvido

As amostras dos experimentos de bioissorção foram centrifugadas a 7077 g durante 10 minutos. Em seguida foram colhidas alíquotas de 5 mL de cada amostra. Essas alíquotas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro de absorção atômica, em $\lambda = 228,8$ nm de fenda espectral 0,5 nm onde o acetileno foi o gás de arraste. As leituras foram realizadas em triplicata.

As concentração final (Cf) dos íons metálicos em cada amostra foram determinadas por meio da substituição dos valores de absorbância. A partir das concentrações finais (Cf) obtidas foram determinadas as quantidades de íons bioissorvidos, presumindo-se que a única fonte de remoção dos íons metálicos da solução foram os materiais biológicos utilizados (exo-biopolímero e biomassa seca). Sendo assim, a quantidade de metais bioissorvidos (Cb) foi obtida por meio da diferença entre a concentração inicial (Ci) e Cf após cada intervalo determinado, conforme equação abaixo:

$$C_b = C_i - C_f,$$

Onde:

C_b = Concentrações de metais bioissorvidos (mgL⁻¹);

C_i = Concentração inicial de metais na solução (mgL⁻¹);

C_f = Concentração final (mgL⁻¹);

A capacidade de bioissorção (q) (expresso em mgg⁻¹), ou seja, a quantidade de metal (chumbo ou cádmio) imobilizado por unidade de bioissorvente (biomassa seca e exo-biopolímero) foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$q = \frac{(C_i - C_f) V}{M}$$

Onde:

V = Volume do meio (L);

M = Quantidade de bioissorvente utilizado na bioissorção (g);

4.6.5. Destino do material contaminado

O material contaminado foi estocado em um recipiente de vidro com tampa e submetido a posterior secagem em estufa de circulação de ar forçada a 50 °C até a evaporação total de líquido. Em seguida o recipiente foi encaminhado para um descarte apropriado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do crescimento

A produção de biomassa seca e exo-biopolímero pelos fungos *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e *Phomopsis* sp. e o perfil das variáveis pH final, açúcares totais, açúcares redutores e proteínas extracelulares estão apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8, respectivamente. Todos os cultivos foram realizados em 240 horas, a 28 °C, 150 rpm, utilizando glicose 6% (p/v) como única fonte de carbono e meio mínimo de sais de Vogel.

Tabela 6 – Parâmetros de crescimento do fungo *Colletotrichum* sp. durante o período de cultivo de 240 horas a 28 °C e 150 rpm

Tempo (h)	Biomassa seca (gL ⁻¹)	EPB (gL ⁻¹)	pH inicial	pH final	Açúcares totais (gL ⁻¹)	Açúcares redutores (gL ⁻¹)	Proteínas extracelulares (gL ⁻¹)
48	1,63 ± 0,01	0,75 ± 0	5,74	5,43	5,07 ± 0,45	5,22 ± 0,22	0,01 ± 0
72	1,55 ± 0,12	0,95 ± 0	5,79	5,57	4,82 ± 0,03	4,57 ± 0,13	0,04 ± 0
96	1,71 ± 0,02	1,34 ± 0,01	5,71	3,86	3,71 ± 0,11	3,09 ± 0,01	0,10 ± 0,05
120	4,87 ± 0,08	1,15 ± 0,01	5,74	3,21	2,87 ± 0	1,68 ± 0,23	0,19 ± 0,04
144	6,58 ± 0,11	2,50 ± 0,04	5,78	3,02	2,88 ± 0,01	1,15 ± 0,17	0,27 ± 0,12
168	10,56 ± 0	1,67 ± 0,02	5,77	3,11	1,66 ± 0,30	0,87 ± 0,09	0,31 ± 0,05
192	11,11 ± 0,01	1,53 ± 0,03	5,82	3,61	1,79 ± 0,03	0,62 ± 0,04	0,38 ± 0,11
216	16,38 ± 0,13	1,59 ± 0,01	5,81	4,18	1,21 ± 0,21	0,33 ± 0,08	0,51 ± 0,04
240	18,24 ± 0,10	1,62 ± 0,01	5,85	4,18	1,32 ± 0,03	0,42 ± 0,06	0,49 ± 0

± Desvio padrão. Ensaios realizados em duplicata. EBP: exo-biopolímero.

As maiores produções de biomassa seca e exo-biopolímero pelo fungo *Colletotrichum* sp. foram obtidas com 240 e 144 horas de cultivo, respectivamente (Tabela 6). Durante o cultivo, houve aumento na acidez do meio, sendo que o menor pH final (3,02) foi atingido no período no qual se obteve a maior produção de exo-biopolímero. Wu e colaboradores (2008) também relataram essa variação no pH durante o cultivo do fungo *Pleurotus citrinopileatus*. A elevação da acidez até 192 horas pode ser resultado da liberação de ácidos orgânicos no meio de cultivo (SHIH, PAN e HSIEH, 2006). Após 144 horas houve redução da acidez do meio de cultivo. Segundo Fang e Zhong (2002) a redução dessa acidez após determinado período de cultivo pode

ser consequência da utilização desses ácidos orgânicos como substrato energético, consequência da redução da concentração de glicose.

Selbmann e colaboradores (2003) também obtiveram os valores máximos de produção de exo-biopolímeros em meios com pH final fortemente ácidos. Segundo esses autores, os fungos *Sclerotium glucanicum* NRRL 3006, *Sclerotium sclerotiorum* DABAC-P4 e *Botrytis cinerea* DABAC-P3 produziram 11,20, 1,61 e 5,90 gL⁻¹ de exo-biopolímero com pH final 3,79, 2,50 e 4,35, respectivamente, em períodos entre 48 e 120 horas.

Após 144 horas houve redução da concentração do exo-biopolímero presente no caldo de cultivo, sendo que essa redução atingiu, aproximadamente, 1 gL⁻¹ em 192 horas. Da mesma forma, essa redução foi observada em outros cultivos, apresentados nas Tabelas 7, 8, 13 e 14. Tait e colaboradores (1986) também reportaram a redução da concentração de exo-biopolímeros durante a fase de crescimento estacionário de fungos. Segundo esses autores os microrganismos podem utilizar os produtos da hidrólise dos biopolímeros como fontes de carbono e energia.

Apesar da baixa produção de biomassa seca no período onde houve o pico de produção de exo-biopolímero, adotou-se 144 horas para realização da etapa subsequente, ou seja, variação das fontes de nitrogênio.

Tabela 7 – Parâmetros de crescimento do fungo *Guignardia* sp. durante o período de cultivo de 240 horas a 28 °C e 150 rpm

Tempo (h)	Biomassa seca (gL ⁻¹)	EBP (gL ⁻¹)	pH inicial	pH final	Açúcares totais (gL ⁻¹)	Açúcares redutores (gL ⁻¹)	Proteínas extracelulares (gL ⁻¹)
48	13,18 ± 0,09	0,45 ± 0,03	5,55	4,89	4,15 ± 0,07	4,08 ± 0,09	0,07 ± 0,04
72	18,21 ± 0,02	1,07 ± 0	5,58	5,02	3,79 ± 0,22	4,03 ± 0,55	0,03 ± 0,01
96	18,33 ± 0,06	1,17 ± 0,01	5,28	4,81	3,55 ± 0,16	3,09 ± 0,13	0,04 ± 0
120	19,49 ± 0,01	1,02 ± 0	5,61	4,45	3,15 ± 0,31	2,72 ± 0,04	0,10 ± 0,01
144	18,31 ± 0,05	1,23 ± 0	5,63	5,00	1,08 ± 0,06	0,93 ± 0,28	0,22 ± 0,04
168	19,67 ± 0,04	1,50 ± 0,01	5,61	5,11	0,79 ± 0,19	0,34 ± 0,15	0,45 ± 0,08
192	22,00 ± 0,03	0,91 ± 0,01	5,61	5,57	0,36 ± 0,08	0,41 ± 0,05	0,31 ± 0
216	20,48 ± 0,12	1,27 ± 0,04	5,61	5,72	0,29 ± 0,04	0,29 ± 0,27	0,29 ± 0,02
240	20,71 ± 0,14	1,25 ± 0,01	5,72	6,05	0,33 ± 0,21	0,23 ± 0,08	0,34 ± 0,04

± Desvio padrão. Ensaios realizados em duplicata. EBP: exo-biopolímero.

O fungo *Guignardia* sp. apresentou a maior produção de biomassa seca e exo-biopolímero em 192 e 168 horas de cultivo, respectivamente (Tabela 7). Adotou-se

168 horas para a execução da etapa subsequente. Tal como o fungo *Colletotrichum* sp., durante o cultivo houve pequena elevação da acidez do meio de cultivo seguida de redução, atingindo o pH final 6,05 em 240 horas. O pH do meio de cultivo é um dos parâmetros ambientais mais críticos que afetam o crescimento e biossíntese de exo-biopolímeros em culturas submersas (SHU e LUNG, 2004).

Tabela 8 – Parâmetros de crescimento do fungo *Phomopsis* sp. durante o período de cultivo de 240 horas a 28 °C e 150 rpm

Tempo (h)	Biomassa seca (gL ⁻¹)	EBP (gL ⁻¹)	pH inicial	pH final	Açúcares totais (gL ⁻¹)	Açúcares redutores (gL ⁻¹)	Proteínas extracelulares (gL ⁻¹)
48	0,80 ± 0,03	0	5,77	5,68	6,11 ± 0,61	5,36 ± 0,17	0,04 ± 0
72	1,85 ± 0,01	0	5,76	5,30	4,85 ± 0,13	4,36 ± 0,08	0,07 ± 0,02
96	5,45 ± 0,14	0,26 ± 0	5,72	4,13	3,74 ± 0,04	3,59 ± 0,21	0,21 ± 0,03
120	11,16 ± 0,25	0,43 ± 0,01	5,69	4,63	2,45 ± 0,28	2,18 ± 0,09	0,19 ± 0,02
144	19,35 ± 0,18	0,32 ± 0	5,85	5,11	1,79 ± 0,01	1,50 ± 0,05	0,24 ± 0,01
168	30,59 ± 0,02	1,57 ± 0,04	5,76	4,09	1,47 ± 0,23	1,01 ± 0,11	0,29 ± 0,01
192	29,32 ± 0,04	1,36 ± 0,02	5,8	5,34	1,25 ± 0,14	0,81 ± 0,31	0,34 ± 0,05
216	28,21 ± 0,20	1,25 ± 0,04	5,73	4,0	1,02 ± 0,06	0,32 ± 0,02	0,27 ± 0,01
240	28,41 ± 0,01	0,95 ± 0,04	5,73	4,56	0,88 ± 0,09	0,18 ± 0,04	0,27 ± 0,8

± Desvio padrão. Ensaios realizados em duplicata. EBP: exo-biopolímero.

A maior produção de biomassa seca e exo-biopolímero pelo fungo *Phomopsis* sp. ocorreu em 168 horas de cultivo (Tabela 8). Esse foi o período de cultivo adotado para a etapa subsequente.

5.2. Avaliação dos efeitos das fontes de nitrogênio sobre a produção de exo-biopolímero e biomassa

Conforme resultados obtidos no item anterior, foi estabelecido que os melhores intervalos de produção de biomassa seca e exo-biopolímero, nas condições de cultivo previamente descritas para os fungos *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e *Phomopsis* sp., foram de 144, 168 e 168 horas, respectivamente.

A partir desses períodos foram avaliadas as produções de biomassa seca e exo-biopolímeros e o perfil das variáveis pH final, açúcares totais, açúcares redutores e proteínas extracelulares, para os três fungos, variando as fontes de nitrogênio presentes

no meio mínimo de sais de Vogel. Foram avaliadas duas fontes de nitrogênio orgânicas (uréia e glutamato de sódio) e as fontes inorgânicas nitrato de sódio, sulfato de amônio e fosfato de amônio.

As variáveis estudadas estão apresentadas nas Tabelas 9, 10 e 11, para os fungos *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e *Phomopsis* sp., respectivamente. Todos os cultivos foram realizados a 28 °C, 150 rpm, utilizando glicose 6 % (p/v) como única fonte de carbono e meio mínimo de sais de Vogel modificado.

Tabela 9 – Parâmetros de crescimento do fungo *Colletotrichum* sp. utilizando diferentes fontes de nitrogênio em 144 horas de cultivo a 28 °C e 150 rpm

Fonte de Nitrogênio	Biomassa seca (gL ⁻¹)	EBP (g ⁻¹)	pH inicial	pH final	Açúcares totais (g ⁻¹)	Açúcares redutores (g ⁻¹)	Proteínas extracelulares (g ⁻¹)
Sulfato de amônio	15,44 ± 0,61	0	5,79	3,26	3,02 ± 0,20	2,03 ± 0,15	0,41 ± 0
Fosfato de amônio	36,12 ± 0,11	0,82 ± 0	5,7	2,20	1,77 ± 0,15	1,23 ± 0,07	0,57 ± 0,08
Uréia	19,72 ± 0,13	6,09 ± 0,01	6,34	7,03	3,89 ± 0,08	1,02 ± 0,26	0,38 ± 0,02
Nitrato de sódio	23,96 ± 0,11	4,38 ± 0,07	5,86	7,68	2,57 ± 0,09	0,88 ± 0,01	0,47 ± 0
Glutamato de sódio	11,31 ± 0,03	5,57 ± 0,02	5,94	5,69	3,21 ± 0,08	1,23 ± 0,04	0,11 ± 0

± Desvio padrão. Ensaios realizados em duplicata. EBP: exo-biopolímero.

Segundo dados apresentados na Tabela 9 a maior produção de biomassa seca pelo fungo *Colletotrichum* sp. foi obtida no meio de cultivo onde havia o fosfato de amônio como única fonte de nitrogênio. No entanto, nesse mesmo meio, o fungo *Colletotrichum* sp. atingiu a segunda menor produção de exo-biopolímero (0,82 gL⁻¹), dentre os meios avaliados. Nos meios com fontes inorgânicas de nitrogênio, foram obtidas as menores produções de exo-biopolímeros (Tabela 9). O metabolismo biossintético de diversos microrganismos é dependente de compostos orgânicos como fontes nutricionais, como exemplo, determinados aminoácidos essenciais não podem ser sintetizados a partir de fontes inorgânicas de nitrogênio (WU et al., 2008).

Em contrapartida, nos meios de cultivo suplementados com fontes nitrogenadas orgânicas, foram obtidas as maiores produções de exo-biopolímero. Dentre as seis fontes estudadas (incluindo a fonte de nitrogênio presente no meio de sais de Vogel, ou seja, o nitrato de amônio, conforme Tabela 6), no meio suplementado com uréia houve a

maior produção de exo-biopolímero ($6,09 \text{ gL}^{-1}$) e produção de $19,72 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa seca pelo fungo *Colletotrichum* sp. (Tabela 9). Segundo Selbmann e colaboradores (2003) a uréia também foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção de polímero extracelular e biomassa pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 comparando-a com fontes inorgânicas. Esses autores reportaram a produção de $5,9$ e 17 gL^{-1} de biomassa seca e exo-biopolímero, respectivamente.

O pH final dos cultivos apresentaram-se levemente ácidos. Os meios que apresentaram o menor pH final, ou seja, suplementados com sulfato de amônio e fosfato de amônio, apresentaram as menores produções de exo-biopolímero, 0 e $0,82 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente. Segundo Bano e Rajarathnam (1988) as fontes de nitrogênio podem alterar o pH do meio. Para Bae e colaboradores (2000) o pH do meio pode afetar as funções da membrana celular, a morfologia e a estrutura celular, o transporte de vários nutrientes e os produtos biossintéticos.

A uréia foi a fonte de nitrogênio selecionada para o fungo *Colletotrichum* sp., para a execução das etapas subseqüentes.

Tabela 10 – Parâmetros de crescimento do fungo *Guignardia* sp. utilizando diferentes fontes de nitrogênio em 168 horas de cultivo a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 150 rpm

Fonte de Nitrogênio	Biomassa seca (gL^{-1})	EBP (gL^{-1})	pH inicial	pH final	Açúcares totais (gL^{-1})	Açúcares redutores (gL^{-1})	Proteínas extracelulares (gL^{-1})
Sulfato de amônio	$22,41 \pm 0,01$	$1,39 \pm 0,01$	5,78	5,81	$0,79 \pm 0,18$	$0,69 \pm 0,08$	$0,69 \pm 0,04$
Fosfato de amônio	$17,33 \pm 0,01$	$4,38 \pm 0,02$	5,64	4,93	$1,95 \pm 0,27$	$0,97 \pm 0,31$	$0,33 \pm 0,09$
Uréia	$19,53 \pm 0,01$	$4,80 \pm 0,02$	6,26	5,90	$2,03 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,01$
Nitrato de sódio	$17,47 \pm 0,01$	$1,69 \pm 0,01$	5,82	5,61	$1,01 \pm 0,27$	$0,68 \pm 0,22$	$0,27 \pm 0,02$
Glutamato de sódio	$21,18 \pm 0,01$	$1,67 \pm 0,01$	5,89	5,99	$0,94 \pm 0,21$	$0,31 \pm 0,11$	$0,48 \pm 0,04$

± Desvio padrão. Ensaios realizados em duplicata. EBP: exo-biopolímero.

O fungo *Guignardia* sp. obteve as maiores produções de biomassa seca ($22,41 \text{ gL}^{-1}$) e exo-biopolímero ($4,80 \text{ gL}^{-1}$) a partir do cultivo em meio contendo o sulfato de amônio e uréia, respectivamente, como a única fonte de nitrogênio (Tabela 10). No entanto, em meio com sulfato de amônio, o fungo *Guignardia* sp. obteve a menor produção de exo-biopolímero dentre as fontes avaliadas. Tem sido

descrito que polissacarídeos são produzidos somente sob condições de nitrogênio limitantes e que altos níveis de nitrogênio no meio de cultivo reprimem a formação de exo-biopolímeros. Este efeito tem sido observado em vários fungos produtores de β -glucanas. Entretanto, acredita-se que este tipo de regulação depende também da fonte de nitrogênio utilizada (BARBOSA *et al.*, 2004).

No meio onde havia uréia como única fonte de nitrogênio, a produção de biomassa seca foi de $19,53 \text{ gL}^{-1}$ (Tabela 10). Tal como o fungo *Colletotrichum* sp., a uréia foi selecionada para o fungo *Guignardia* sp. como a fonte de nitrogênio mais adequada para a produção de exo-biopolímero. O pH final dos cultivos apresentaram-se ácidos (Tabela 10).

Tabela 11 – Parâmetros de crescimento do fungo *Phomopsis* sp. utilizando diferentes fontes de nitrogênio em 168 horas de cultivo a 28°C e 150 rpm

Fonte de Nitrogênio	Biomassa seca (gL^{-1})	EBP (gL^{-1})	pH inicial	pH final	Açúcares totais (gL^{-1})	Açúcares redutores (gL^{-1})	Proteínas extracelulares (gL^{-1})
Sulfato de amônio	$18,64 \pm 0,19$	0	5,82	5,23	$1,14 \pm 0,23$	$0,51 \pm 0,09$	$0,33 \pm 0,06$
Fosfato de amônio	$19,84 \pm 0,05$	$1,80 \pm 0,01$	5,66	4,92	$1,46 \pm 0,07$	$0,65 \pm 0,14$	$0,47 \pm 0,02$
Uréia	$22,64 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,01$	6,41	5,53	$1,12 \pm 0,41$	$0,38 \pm 0,08$	$0,18 \pm 0,01$
Nitrato de sódio	$18,87 \pm 0,06$	$0,70 \pm 0,01$	5,86	4,37	$1,24 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,24$	$0,09 \pm 0,01$
Glutamato de sódio	$18,89 \pm 0,23$	$0,32 \pm 0$	6,02	5,01	$1,03 \pm 0,22$	$0,45 \pm 0,32$	$0,44 \pm 0,04$

\pm Desvio padrão. Ensaios realizados em duplicata. EBP: exo-biopolímero.

Para o fungo *Phomopsis* sp., a maior produção de biomassa seca ($22,64 \text{ gL}^{-1}$) se deu a partir de fermentação em meio suplementado com uréia (Tabela 11). Huang e colaboradores (2007) avaliaram a produção de biomassa pelo fungo *Hericiium erinaceus* em função da variação de fontes nitrogenadas inorgânicas, orgânicas complexas e definidas. Esses autores relataram que, dentre as fontes inorgânicas e quimicamente definidas, a maior produção de biomassa se deu com a utilização de um meio contendo uréia como única fonte de nitrogênio.

Houve uma pequena variação na produção de biomassa seca em função das fontes de nitrogênio avaliadas, considerando que a menor produção foi de $18,64 \text{ gL}^{-1}$, em meio suplementado com sulfato de amônio. Em meio com fosfato de amônio, houve

a maior produção de exo-biopolímero ($1,80 \text{ gL}^{-1}$) e biomassa seca ($19,84 \text{ gL}^{-1}$) (Tabela 11), sendo essa fonte de nitrogênio selecionada para a realização da etapa seguinte. Esses resultados podem ser explicados, segundo Seviour e Stasinopoulos (1992) pelo fato dos sais de amônio serem geralmente mais eficientes para a produção de biomassa e polímeros extracelulares, do que a maioria dos outros sais inorgânicos e fontes orgânicas de nitrogênio.

5.3. Avaliação do crescimento utilizando a melhor fonte de nitrogênio

Após a determinação das melhores fontes de nitrogênio (dentre as fontes avaliadas) para a produção de exo-biopolímeros pelos fungos *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e *Phomopsis* sp. foi realizada uma nova avaliação dos parâmetros de crescimento, apresentada nas Tabelas 12, 13 e 14, respectivamente. Essa avaliação consistiu em selecionar, dentre os três fungos avaliados, o que apresentou maior produção de exo-biopolímero. Todos os cultivos foram realizados a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm, utilizando glicose 6% (p/v) como única fonte de carbono e meio mínimo de sais de Vogel modificado.

Tabela 12 – Parâmetros do crescimento do fungo *Colletotrichum* sp. durante o período de cultivo de 240 horas utilizando uréia como fonte de nitrogênio a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm

Tempo (h)	Biomassa seca (gL^{-1})	EBP (gL^{-1})	pH inicial	pH final	Açúcares totais (gL^{-1})	Açúcares redutores (gL^{-1})	Proteínas extracelulares (gL^{-1})
48	$2,60 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,01$	6,76	6,70	$4,32 \pm 0,07$	$4,22 \pm 0,41$	0
72	$3,55 \pm 0,04$	$1,97 \pm 0,03$	6,56	6,86	$4,01 \pm 0,25$	$3,45 \pm 0,07$	$0,03 \pm 0,01$
96	$6,03 \pm 0,04$	$3,01 \pm 0,02$	6,74	6,89	$3,15 \pm 0,30$	$2,19 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,03$
120	$9,57 \pm 0,06$	$4,51 \pm 0,06$	6,53	7,15	$3,20 \pm 0,08$	$1,34 \pm 0,22$	$0,13 \pm 0,01$
144	$12,06 \pm 0,06$	$4,92 \pm 0,03$	6,32	7,19	$3,77 \pm 0,06$	$1,13 \pm 0,19$	$0,22 \pm 0,04$
168	$12,22 \pm 0,14$	$4,86 \pm 0,01$	6,75	7,17	$3,45 \pm 0,11$	$0,88 \pm 0,14$	$0,31 \pm 0,05$
192	$12,36 \pm 0,01$	$5,71 \pm 0,08$	6,73	7,14	$3,42 \pm 0,18$	$0,64 \pm 0,26$	$0,28 \pm 0$
216	$16,22 \pm 0,01$	$4,49 \pm 0,09$	6,46	7,27	$3,24 \pm 0,13$	$0,55 \pm 0,25$	$0,37 \pm 0,02$
240	$13,47 \pm 0,12$	$5,46 \pm 0,04$	6,55	7,22	$3,12 \pm 0,22$	$0,34 \pm 0,09$	$0,41 \pm 0,04$

± Desvio padrão. Ensaios realizados em duplicata. EBP: exo-biopolímero.

As maiores quantidades de biomassa seca ($16,22 \text{ gL}^{-1}$) e exo-biopolímero ($5,71 \text{ gL}^{-1}$) produzidos pelo fungo *Colletotrichum* sp. foram alcançados em 216 e

192 horas de cultivo, respectivamente (Tabela 12). Durante o cultivo, houve pequena alcalinização do meio, sendo que em 240 horas, o pH final foi 7,22. O exo-biopolímero produzido pelo fungo *Colletotrichum* sp. está apresentado na Figura 3A.

Tabela 13 – Parâmetros do crescimento do fungo *Guignardia* sp. durante o período de cultivo de 240 horas utilizando uréia como fonte de nitrogênio a 28 °C e 150 rpm

Tempo (h)	Biomassa Seca (gL ⁻¹)	EBP (gL ⁻¹)	pH inicial	pH final	Açúcares totais (gL ⁻¹)	Açúcares redutores (gL ⁻¹)	Proteínas extracelulares (gL ⁻¹)
48	03,53 ± 0,01	1,41 ± 0,02	6,31	5,80	3,91 ± 0,25	3,75 ± 0,24	0,03 ± 0
72	07,01 ± 0,07	1,93 ± 0,02	6,24	5,88	3,07 ± 0,16	2,18 ± 0,08	0,05 ± 0,05
96	10,38 ± 0,07	3,63 ± 0,05	6,18	5,83	2,75 ± 0,23	1,65 ± 0,16	0,16 ± 0,03
120	13,42 ± 0,02	4,34 ± 0,01	6,09	5,88	2,17 ± 0,09	1,02 ± 0,47	0,19 ± 0,01
144	13,92 ± 0,05	4,32 ± 0,06	6,22	5,87	3,02 ± 0,11	0,81 ± 0,19	0,47 ± 0,04
168	15,73 ± 0,01	4,27 ± 0,04	6,15	5,81	2,89 ± 0,77	0,66 ± 0,33	0,45 ± 0
192	15,68 ± 0,04	4,32 ± 0,02	6,27	5,84	2,77 ± 0,54	0,42 ± 0,21	0,47 ± 0
216	16,20 ± 0	4,08 ± 0,03	6,61	5,86	2,81 ± 0,18	0,54 ± 0,14	0,29 ± 0,01
240	15,32 ± 0,02	3,94 ± 0	6,31	5,92	2,74 ± 0,07	0,29 ± 0,06	0,44 ± 0,02

± Desvio padrão. Ensaios realizados em duplicata. EBP: exo-biopolímero.

O fungo *Guignardia* sp. obteve as produções de 13,42 e 4,34 gL⁻¹ de biomassa seca e exo-biopolímero (Figura 3B) em 120 horas de cultivo (Tabela 13). O pico de produção de biomassa seca foi alcançado em 216 horas (16,2 gL⁻¹). O pH final apresentou-se ácido (próximo ao pH 6) e com pequena variação durante o cultivo. Kim e colaboradores (2003) também obtiveram as maiores produções de biomassa (25,70 gL⁻¹) e exo-biopolímero (2,30 gL⁻¹) em meio com pH próximo de 6, em um estudo realizado com o Fungo *Cordyceps militaris* C738. O exo-biopolímero produzido pelo fungo *Guignardia* sp. está apresentado na Figura 3B.

Tabela 14 – Parâmetros do crescimento do fungo *Phomopsis* sp. durante o período de cultivo de 240 horas utilizando fosfato de amônio como fonte de nitrogênio, a 28 °C e 150 rpm

Tempo (h)	Biomassa seca (gL ⁻¹)	EBP (gL ⁻¹)	pH inicial	pH final	Açúcares totais (gL ⁻¹)	Açúcares redutores (gL ⁻¹)	Proteínas extracelulares (gL ⁻¹)
48	1,38 ± 0,02	0	5,75	5,78	4,85 ± 0,05	4,97 ± 0,13	0,12 ± 0,03
72	2,96 ± 0,02	0	5,81	5,43	4,51 ± 0,31	4,48 ± 0,07	0,09 ± 0
96	10,91 ± 0,05	0,39 ± 0,01	5,72	5,15	3,73 ± 0,28	3,35 ± 0,16	0,19 ± 0,03
120	13,47 ± 0,01	0,40 ± 0,01	5,79	4,63	2,15 ± 0,04	1,97 ± 0,26	0,27 ± 0,04
144	21,37 ± 0,06	0,82 ± 0,02	5,75	4,96	2,77 ± 0,14	1,05 ± 0,01	0,43 ± 0,04
168	23,13 ± 0,04	1,84 ± 0,01	5,76	4,87	1,48 ± 0,26	0,81 ± 0,45	0,33 ± 0,06
192	22,61 ± 0,02	1,59 ± 0,01	5,8	4,78	1,58 ± 0,08	0,72 ± 0,24	0,56 ± 0,05
216	22,39 ± 0,03	1,83 ± 0,01	5,73	4,65	1,45 ± 0,17	0,51 ± 0,20	0,39 ± 0,12
240	23,13 ± 0	1,64 ± 0,01	5,73	4,77	1,47 ± 0,11	0,13 ± 0,08	0,62 ± 0,09

± Desvio padrão. Ensaios realizados em duplicata. EBP: exo-biopolímero.

O fungo *Phomopsis* sp. obteve as maiores produções de biomassa seca (23,13 gL⁻¹) e exo-biopolímero (1,84 gL⁻¹) em 168 horas de cultivo (Tabela 14). Essa maior produção de exo-biopolímeros associada ao crescimento foi também reportada por Wu e colaboradores (2008) pesquisando o fungo *Pleurotus citrinopileatus*. Segundo esses autores, esse fungo após o período de 14 dias de incubação produziu 45,25 e 1,87 gL⁻¹ de biomassa e exo-biopolímeros, respectivamente.

Pode-se observar na Tabela 14 que, ao longo do cultivo, houve aumento na acidez do meio, sendo que em 240 horas, ou seja, no período de maior produção de biomassa, o pH final foi 4,77. Esses resultados foram semelhantes aos relatados por Kim e colaboradores (2005) estudando o fungo *Agrocybe cylindracea*. Nesse estudo, as maiores produções de biomassa foram alcançadas em meio com pH ácido (pH 4). Segundo Shu e Lung (2004) os melhores meios para a formação de exo-biopolímeros e crescimento celular apresentam-se ácidos, geralmente com pH na faixa de 5,0 a 7,0 e de 2,0 a 4,0, respectivamente. O exo-biopolímero produzido pelo fungo *Phomopsis* sp. está apresentado na Figura 3C.

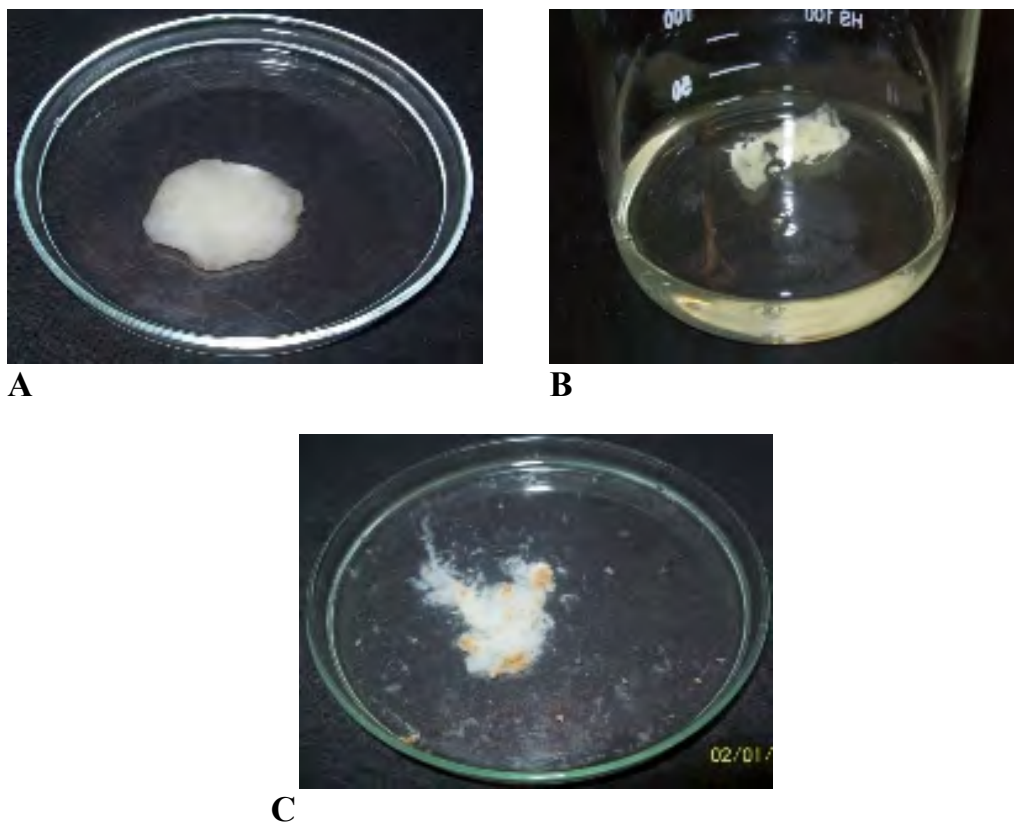


Figura 3 – Exo-biopolímeros produzidos pelos fungos *Colletotrichum* sp. (A), *Guignardia* sp. (B) e *Phomopsis* sp. (C) incubados em shaker a 28 °C e 150 rpm, em um meio de cultivo contendo glicose 6% (p/v) e meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (p/v).

Além das Tabelas 12, 13 e 14, a biomassa seca e exo-biopolímero produzido pelos três fungos estão apresentados, comparativamente, nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

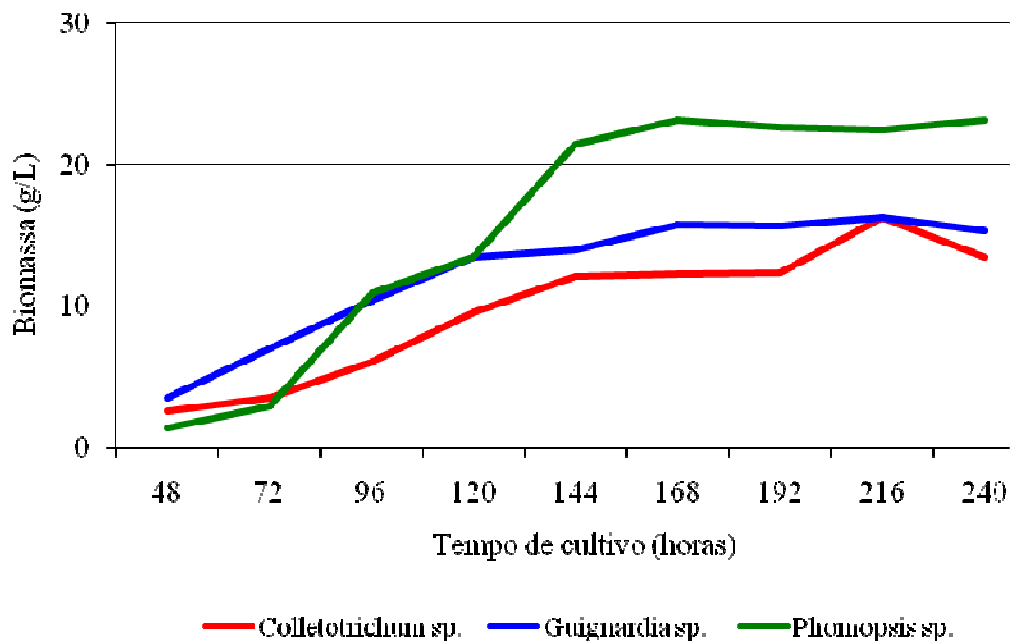


Figura 4 – Curvas de crescimento dos fungos *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e *Phomopsis* sp. durante o período de 240 horas, incubados em shaker a 28 °C e 150 rpm, em um meio de cultivo contendo glicose 6% (p/v) e meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (p/v).

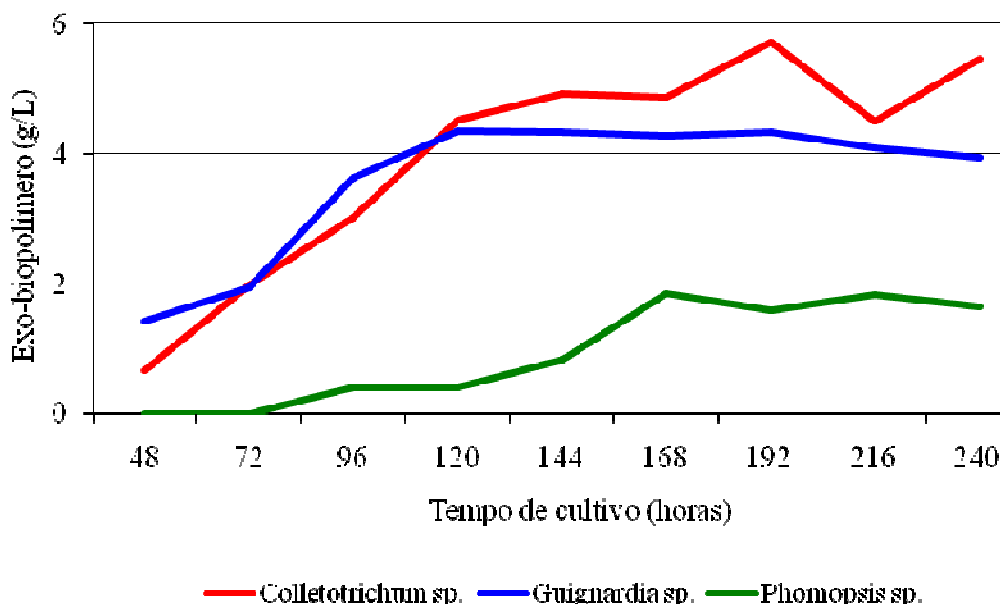


Figura 5 – Produção de exo-biopolímeros pelos fungos *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e *Phomopsis* sp. durante o período de 240 horas, incubados em shaker a 28 °C e 150 rpm, em um meio de cultivo contendo glicose 6% (p/v) e meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (p/v).

Dentre os três fungos estudados, o fungo *Phomopsis* sp. apresentou maior produção de biomassa seca (23,13 gL⁻¹ - Tabela 14) em 168 horas. No entanto, conforme Figura 5 o fungo *Colletotrichum* sp. apresentou maior produção de exo-biopolímero (5,71 gL⁻¹ – Tabela 12) em 192 horas de cultivo. Frente à baixa produtividade de exo-biopolímero apresentada pelo fungo *Phomopsis* sp. (Figura 5), o fungo *Colletotrichum* sp. foi utilizado para realização do seguinte delineamento experimental.

5.4. Delineamento experimental

Conforme apresentado no item 4.4., o planejamento fatorial 3⁽³⁻⁰⁾ resultou em 27 experimentos, realizados em duplicata. As condições experimentais e os resultados obtidos a partir da avaliação do efeito do tempo, da temperatura e da concentração inicial de glicose na produção de biomassa seca, exo-biopolímero e no pH final encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados do planejamento fatorial $3^{(3-0)}$ com 27 experimentos em duplicata a 150 rpm

Repetição	Tempo (horas)	Temperatura (°C)	Glicose (gL ⁻¹)	Biomassa seca (gL ⁻¹)	EBP (g ⁻¹)	pH final
1	168	19	20	2,50	1,67	6,58
1	168	19	50	4,32	1,84	6,71
1	168	19	80	3,33	1,58	6,72
1	168	27	20	3,54	1,98	6,77
1	168	27	50	4,47	2,43	6,75
1	168	27	80	6,84	2,50	7,01
1	168	35	20	3,05	2,29	6,68
1	168	35	50	5,29	2,18	6,78
1	168	35	80	4,02	1,84	6,23
1	192	19	20	3,95	1,84	6,90
1	192	19	50	3,85	2,31	6,88
1	192	19	80	5,95	2,23	7,01
1	192	27	20	5,28	2,50	6,57
1	192	27	50	10,83	2,63	6,91
1	192	27	80	7,06	2,60	6,82
1	192	35	20	4,35	2,37	6,99
1	192	35	50	6,22	2,65	7,01
1	192	35	80	5,37	2,40	6,89
1	216	19	20	6,92	2,82	7,11
1	216	19	50	12,40	4,21	7,18
1	216	19	80	11,18	3,25	7,21
1	216	27	20	11,19	3,51	7,24
1	216	27	50	23,68	5,79	7,13
1	216	27	80	17,00	3,59	7,22
1	216	35	20	9,68	5,00	7,18
1	216	35	50	16,22	4,44	7,09
1	216	35	80	11,68	4,50	7,21
2	168	19	20	2,97	2,02	6,67
2	168	19	50	4,51	2,31	6,88
2	168	19	80	3,59	2,11	6,69
2	168	27	20	3,33	2,14	6,69
2	168	27	50	6,58	3,82	6,72
2	168	27	80	4,43	2,43	6,88
2	168	35	20	2,70	1,62	6,57
2	168	35	50	3,82	2,78	6,83
2	168	35	80	3,14	2,19	6,81
2	192	19	20	4,21	1,58	6,68
2	192	19	50	6,32	3,33	6,78
2	192	19	80	4,47	2,11	6,97
2	192	27	20	4,22	2,43	6,89
2	192	27	50	8,89	3,63	6,24
2	192	27	80	5,35	3,33	6,69
2	192	35	20	5,68	2,27	7,04
2	192	35	50	8,01	3,51	7,07
2	192	35	80	5,35	3,06	6,97
2	216	19	20	6,67	2,31	7,26
2	216	19	50	18,16	3,95	7,15
2	216	19	80	13,84	4,47	7,09
2	216	27	20	13,68	5,10	7,16
2	216	27	50	28,29	6,11	7,28
2	216	27	80	17,44	4,71	7,29
2	216	35	20	14,46	5,02	7,15
2	216	35	50	17,78	5,28	7,17
2	216	35	80	15,23	5,13	7,26

EBP: exo-biopolímero.

Os graus de significância das interações entre os fatores estudados foram confirmados por meio dos valores do p do teste estatístico, apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Significância (p) das interações lineares (L) e quadráticas (Q) entre as variáveis dependentes e independentes

Variáveis	p Biomassa seca	p EBP	p pH final
(1) Tempo (h) (L)	0	0	0
Tempo (h) (Q)	0	0,000054	0,014935
(2) Temperatura (°C) (L)	0,028491	0,000360	0,587941
Temperatura (°C) (Q)	0,000001	0,002491	0,549732
(3) Conc. Glicose(gL ⁻¹)(L)	0,000781	0,089837	0,324832
Conc. Glicose (gL ⁻¹)(Q)	0	0,000119	0,989125
1L por 2L	0,073959	0,010978	0,554370
1L por 2Q	0,000636	0,813730	0,449412
1Q por 2L	0,767763	0,379703	0,141363
1Q por 2Q	0,079107	0,589611	0,000456
1L por 3L	0,051452	0,714411	0,772614
1L por 3Q	0,000021	0,404895	0,240623
1Q por 3L	0,181963	0,558866	1,000000
1Q por 3Q	0,077761	0,828877	0,352871
2L por 3L	0,217983	0,263058	0,295108
2L por 3Q	0,975980	0,390374	0,588249
2Q por 3L	0,338854	0,815438	0,439595
2Q por 3Q	0,005472	0	0,095512

*Estatisticamente significativo para um intervalo de 94,45% de confiança. Residual = 2,792584

**Estatisticamente significativo para um intervalo de 87,11% de confiança. Residual = 0,2821442

***Estatisticamente significativo para um intervalo de 79,25% de confiança. Residual = 0,0196541

Fatores significativos para $p < 0,05$. EBP: exo-biopolímero.

Todas as variáveis independentes e suas interações apresentaram significância estatística, com exceção da interação do pH final com a temperatura e concentração inicial de glicose (Tabela 16). As interações entre as respostas concentração de biomassa seca, exo-biopolímero e pH final e as variáveis independentes descreveram um experimento com intervalo de 94, 87 e 79% de confiança, respectivamente, para $p < 0,05$.

As estimativas dos principais efeitos da interação das variáveis independentes (tempo, temperatura e concentração inicial de glicose) sobre a resposta biomassa seca, estão apresentadas nas Figuras 6 e 7.

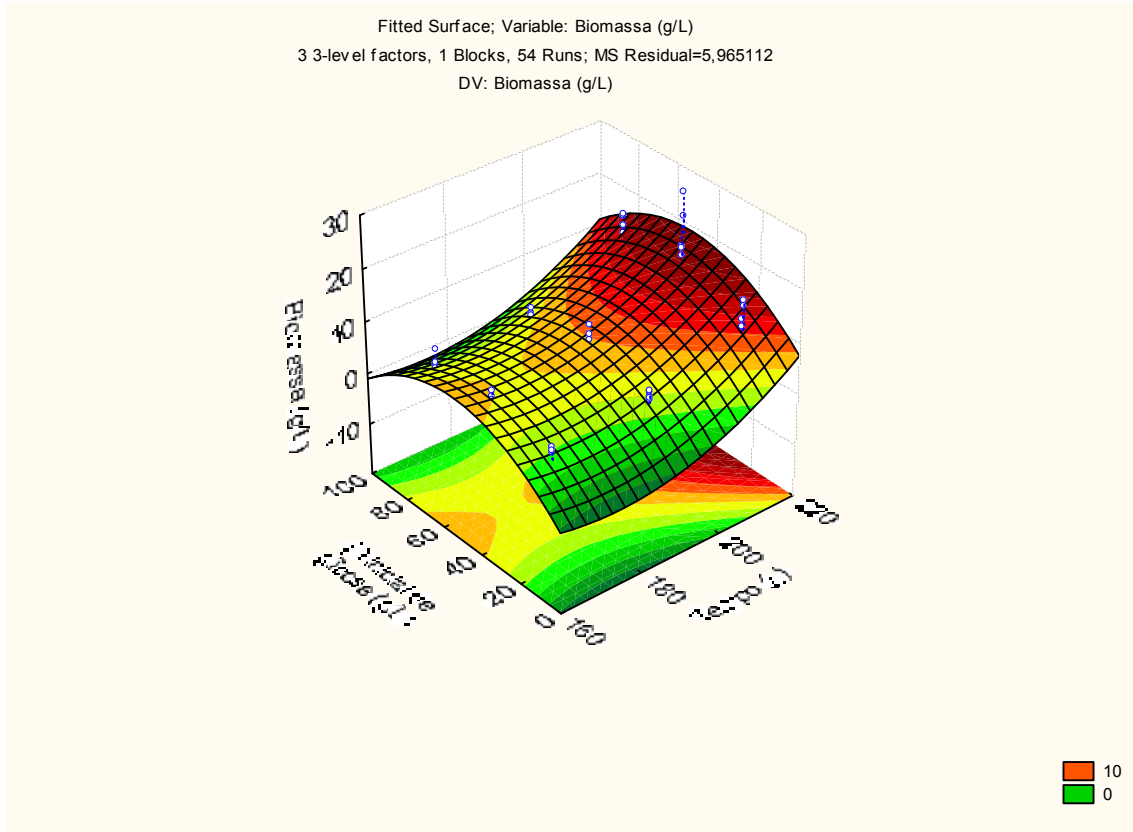


Figura 6 – Produção de biomassa seca em função da concentração inicial de glicose e o tempo de cultivo. Os experimentos foram realizados em shaker a 28 °C e 150 rpm, contendo glicose como única fonte de carbono e meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (p/v).

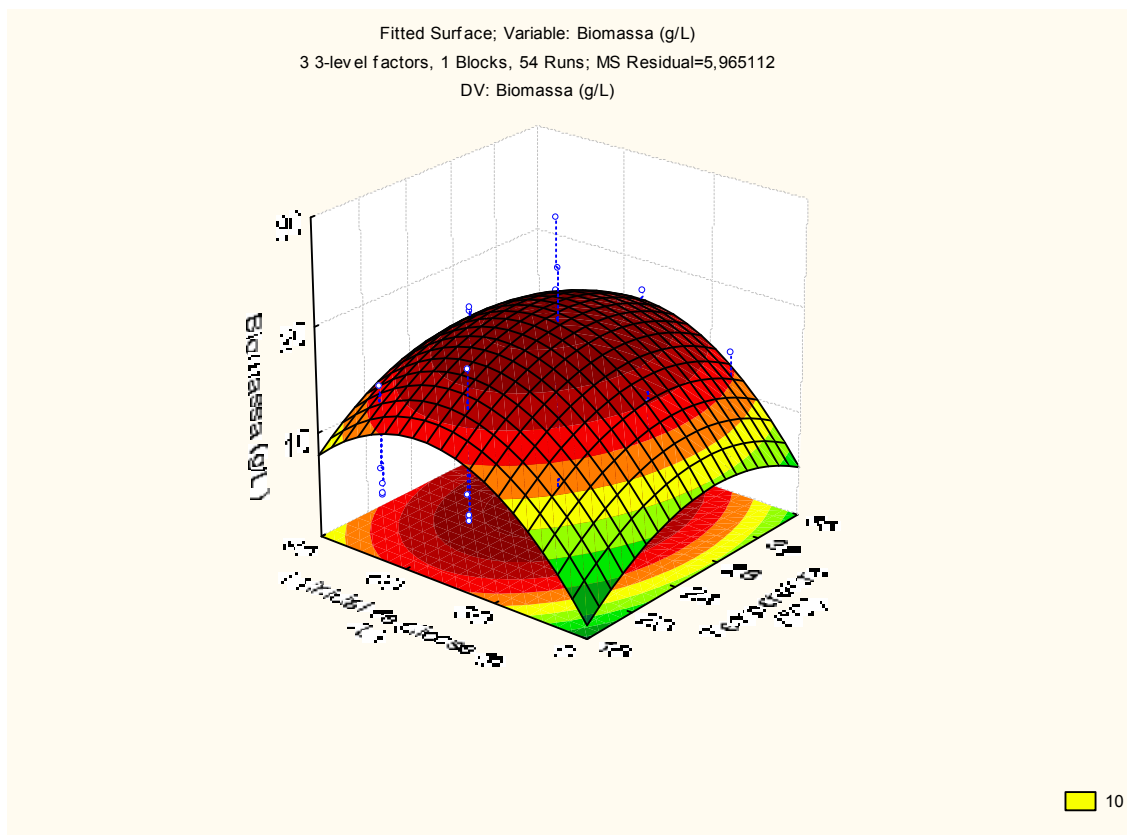


Figura 7 – Produção de biomassa seca em função da concentração inicial de glicose e a temperatura de cultivo. Os experimentos foram realizados em shaker a 28 °C e 150 rpm, contendo glicose como única fonte de carbono e meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (p/v).

A partir da análise dos gráficos de superfície de resposta (Figuras 6 e 7), verifica-se que a produção de biomassa seca é favorecida quando se utilizam temperaturas entre 24 e 32 °C e concentrações iniciais de glicose entre 35 e 75 gL⁻¹ em um intervalo superior a 200 horas de cultivo. Esses resultados podem ser confirmados observando-se a Tabela 15. Segundo essa tabela as menores produções de biomassa seca se deram em meio com concentração inicial de glicose de 20 gL⁻¹ e temperatura de 19 °C.

As Figuras 8 e 9 apresentam a superfície de resposta gerada a partir das interações entre a variável dependente produção de exo-biopolímero e as variáveis independentes concentração inicial de glicose, temperatura e tempo de cultivo.

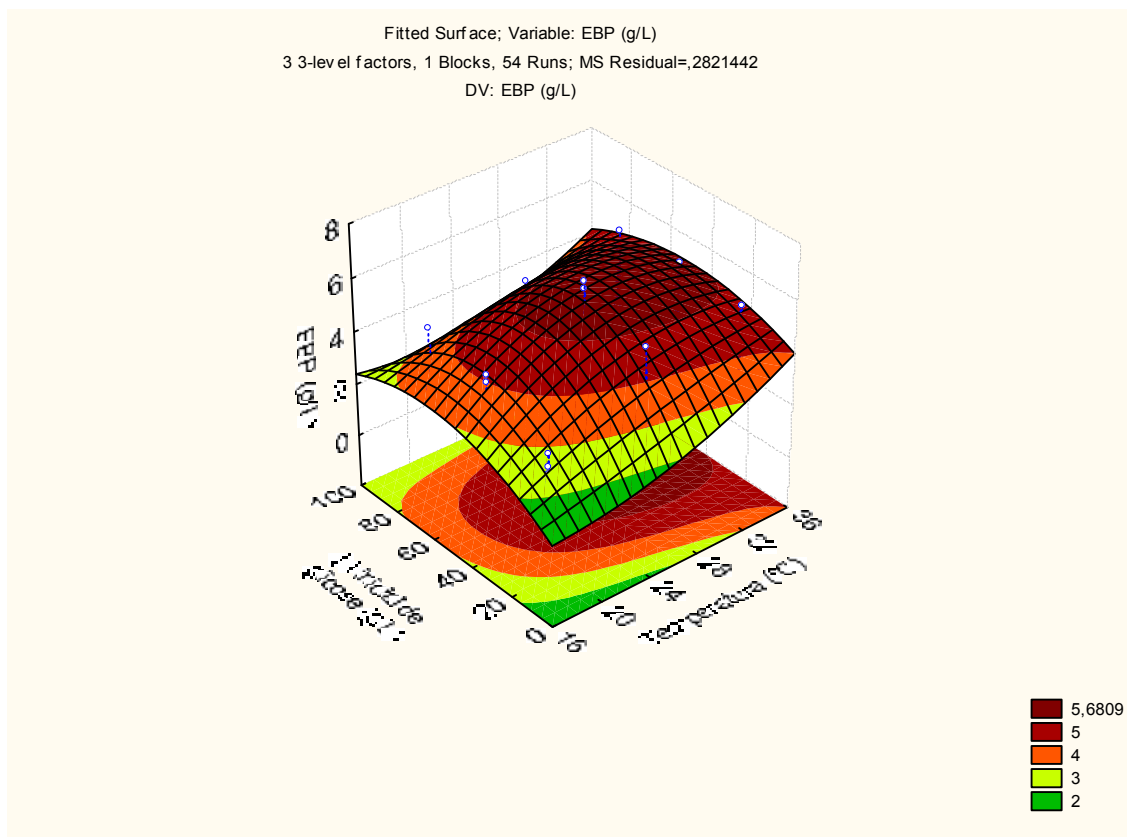


Figura 8 – Produção de exo-biopolímero em função da concentração inicial de glicose e a temperatura de cultivo. Os experimentos foram realizados em shaker a 28 °C e 150 rpm, contendo glicose como única fonte de carbono e meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (p/v).

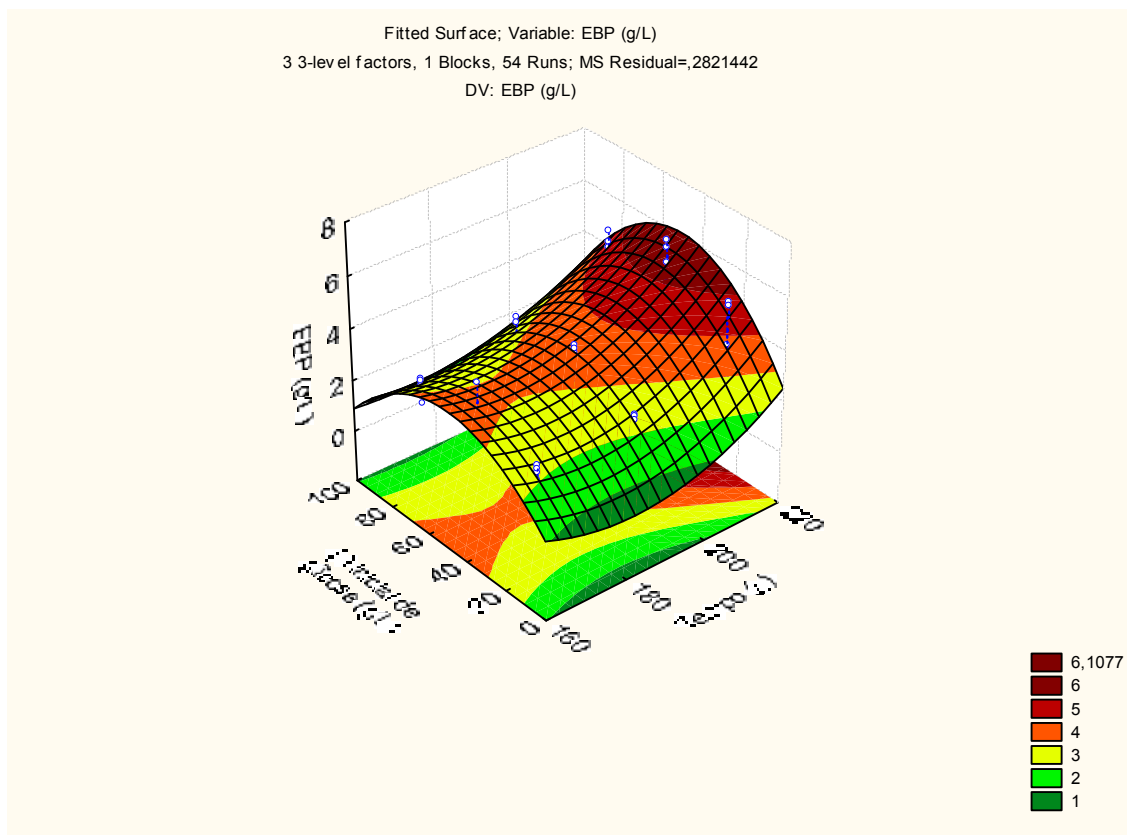


Figura 9 – Produção de exo-biopolímero em função da concentração inicial de glicose e tempo de cultivo. Os experimentos foram realizados em shaker a 28 °C e 150 rpm, contendo glicose como única fonte de carbono e meio mínimo de sais de Vogel modificado 2% (p/v).

Conforme Figura 8, a produção de exo-biopolímero foi favorecida quando a temperatura esteve entre 24 e 36 °C e concentração inicial de glicose entre 35 e 70 gL⁻¹. Nessas condições, o intervalo de cultivo superior a 210 horas mostrou mais adequado para a produção de exo-biopolímero (Figura 9). De forma semelhante à produção de biomassa seca, a Tabela 15 evidencia que as menores produções de exo-biopolímero se deram em meio com concentração inicial de glicose de 20 gL⁻¹ e temperatura de 19 °C.

Elevadas concentrações de glicose (superiores a 60 gL⁻¹) mostraram-se adequadas tanto para a produção de biomassa seca quanto de exo-biopolímero pelo fungo *Colletotrichum* SP (Figuras 6, 7, 8 e 9). Poucos trabalhos relataram a utilização de elevadas concentrações iniciais de glicose para obtenção desses materiais biológicos, pois a glicose pode apresentar efeito inibitório. No entanto, Zhu e Sun (2009) cultivando o fungo *Tremella fuciformis* em fermentação em batelada alimentada com 80 gL⁻¹ de

glicose, produziu 9,80 e 3,12 gL⁻¹ de biomassa seca e exo-biopolímero, respectivamente. Kim e colaboradores (2005) utilizaram 80 gL⁻¹ de maltose como fonte de carbono obtiveram uma produção de 11,64 gL⁻¹ de biomassa com o do fungo *Agrocybe cylindraceae*. Esses autores ainda obtiveram a produção de 3 gL⁻¹ de exo-biopolímeros utilizando 60 gL⁻¹ do mesmo substrato.

5.5. Testes de biossorção

5.5.1. Biossorção de cádmio pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp.

5.5.1.1. Estudo cinético da biossorção de cádmio pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp.

A quantidade de cádmio biossorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em função do tempo (48 horas) está apresentada na Figura 10. Todos os experimentos de biossorção foram executados em shaker, sob agitação de 200 rpm, temperatura de 30 °C em duplicata.

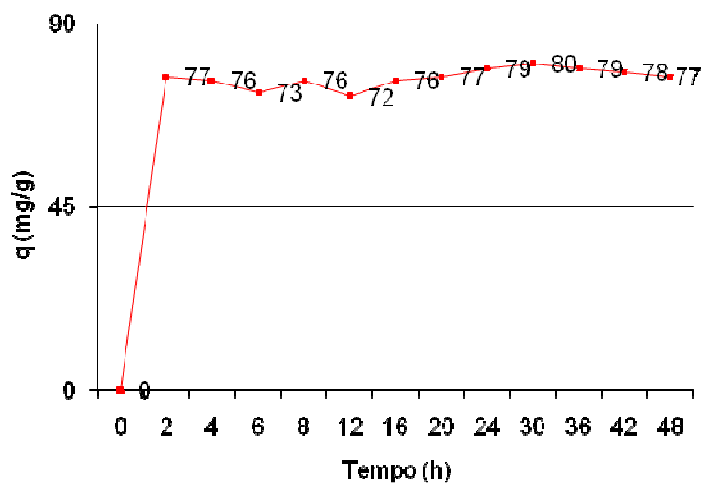


Figura 10 – Quantidade de cádmio biossorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.

O equilíbrio da biossorção do cádmio pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. foi alcançado após 2 horas (Figura 10). O tempo de equilíbrio da biossorção depende, segundo Mokaddem e colaboradores (2009) da viscosidade e da agitação do meio. A agitação permite que os íons estejam uniformemente distribuídos na solução, facilitando a biossorção.

O pH inicial e final variou de $6,7 \pm 0$ (tempo de 0 horas) a $6,8 \pm 0,1$ (tempo de 48 horas). Para execução das etapas subsequentes foi adotado o período de biossorção de 48 horas, ou seja, superior ao período de 2 horas encontrado no estudo cinético, considerando que, segundo Morillo-Perez e colaboradores (2008) ao variar a concentração inicial do metal na solução e o pH, poderá ocorrer alteração no tempo de equilíbrio.

5.5.1.2. Variação do pH inicial

A quantidade de cádmio biossorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em função de diferentes valores de pH durante o período de 48 horas (previamente estipulado como o período de equilíbrio) está apresentada na Figura 11.

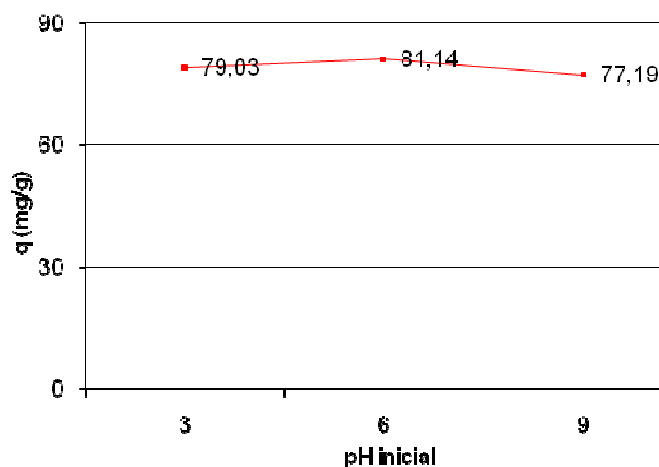


Figura 11 – Quantidade de cádmio biossorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em diferentes valores de pH, durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.

Conforme Figura 11, as quantidades de cádmio biossorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. foram relativamente semelhantes nos três meios, com diferentes valores de pH iniciais (3, 6 e 9). A maior eficiência de remoção do cádmio ($81,14 \text{ mgg}^{-1}$) se deu em meio com pH 6. Em meios com pH 3 e 9, houve a remoção de $79,03$ e $77,19 \text{ mgg}^{-1}$, respectivamente (Figura 11). Contrário aos resultados obtidos nesse estudo (Figura 11), tem sido reportado uma grande variação nas

quantidades de cádmio bioissorvido em função dessa faixa de pH (3, 6 e 9) (ZHOU *et al.*, 2009b; MOKADDEM *et al.*, 2009; VINOD *et al.*, 2009; MORILLO-PEREZ *et al.* 2008). Como exemplo, o trabalho relatado por Zhou e colaboradores (2009b), onde foi apresentado o comportamento do gráfico de quantidade de cádmio bioissorvido pelo exo-biopolímero da bactéria *Wangia profunda* SM-A87 (SM-A87) em função do pH. Segundo esse trabalho, em meio com pH 6, o exopolissacarídeo dessa bactéria bioissorveu 39,75 mg de cádmio por grama de bioissorvente. Em contrapartida, em meio com pH ácido (3) ou alcalino (9), esse exopolissacarídeo bioissorveu quantidades inferiores a 5 mgg⁻¹. No entanto, os dados apresentados na Figura 11 podem ser comparados com os resultados obtidos por Chen e colaboradores (2009). Esses autores reportaram pequena variação das quantidades de cádmio bioissorvido pela melanina da lula *Ommastrephes bartrami* na faixa de pH de 3 a 9. Segundo esse trabalho, as maiores variações (redução) nas quantidades de cádmio bioissorvido se deram em pH abaixo de 3 e superiores a 9.

5.5.1.3. Variação da concentração inicial de cádmio na solução

A quantidade de cádmio bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em função de diferentes concentrações iniciais de cádmio, em pH 6 e durante o período de 48 horas, está apresentada na Figura 12.

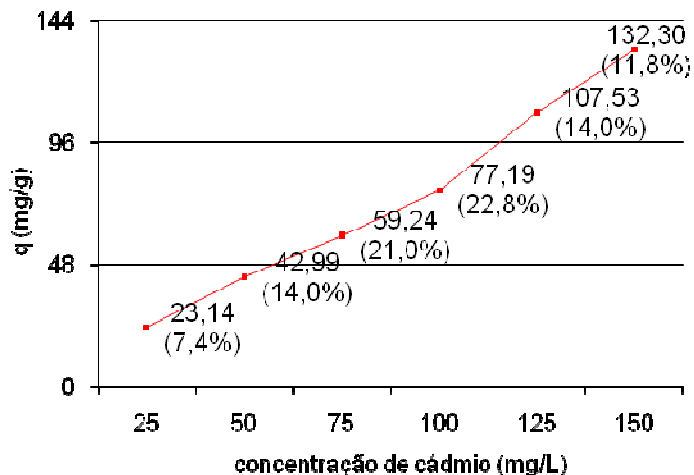


Figura 12 – Quantidade de cádmio bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em função de diferentes concentrações iniciais de cádmio, durante o período de 48 horas, em pH 6, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.

(%) Percentual de cádmio não bioissorvido

Conforme dados apresentados na Figura 12, com o aumento da concentração inicial de cádmio de 25 a 150 mgL⁻¹, houve tendência em aumentar a quantidade desse metal bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. Para Vimala e Nilanjana Das (2009) esse aumento é devido à maior disponibilidade do íon metálico para a bioissorção. Além disso, uma maior concentração inicial do metal prevê um aumento da força motriz necessária para superar a resistência de transferência de massa dos íons metálicos entre a fase aquosa e sólida, resultando em maior probabilidade de colisão entre os íons metálicos e os bioissorventes (TEWARI, VASUDEVAN e GUHA, 2005).

A maior quantidade de cádmio bioissorvido (132,30 mgg⁻¹) pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. se deu no meio com maior concentração inicial do metal (150 mgL⁻¹). O maior percentual de cádmio não bioissorvido (22,8%) foi observado no

meio com concentração inicial de 100 mgL⁻¹. Em contrapartida, o menor percentual de cádmio não bioissorvido (8%) foi obtido no meio com menor concentração inicial de metal (25 mgL⁻¹). A quantidade de cádmio bioissorvido nesse meio foi de 23,14 mgg⁻¹. A Tabela 17 apresenta diversos estudos que reportaram a elevada afinidade do cádmio com exo-biopolímeros microbianos.

Tabela 17 – Comparação entre quantidade de cádmio (Cd²⁺) bioissorvido pelos exo-biopolímeros microbianos reportados na literatura e o utilizado neste estudo

Microrganismo	Q (mgg ⁻¹)	pH	Referência
<i>Paenibacillus jamilae</i>	20,49	5,5	Morillo-Perez e colaboradores (2008)
<i>Paenibacillus jamilae</i>	65,00	--	Morillo e colaboradores (2006)
<i>Chryseomonas luteola</i> TEM05	60,00	6,0	Ozdemir, Ceyhan e Manav (2005)
<i>Alteromonas macleodii</i> subsp <i>fijiensis</i>	125,00	--	Loaec, Olier e Guezennec (1997)
Bacterias hidrotermais	154,00	7,0	Loaec, Olier e Guezennec (1998)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	520,09	7,5	Mokaddem e colaboradores (2009)
<i>Colletotrichum</i> sp.	132,30	6,0	Presente estudo

Q: quantidade de metal bioissorvido em mgg⁻¹

Segundo Morillo-Perez e colaboradores (2008) a comparação com resultados relatados em outros trabalhos pode apresentar grandes dificuldades devido a ampla variedade de organismos estudados (fungos, bactérias, algas), estado do microrganismo (ativo ou inativo), tipo de estrutura (biomassa, exo-biopolímero, cápsula, membrana celular, DNA), condições experimentais, concentrações iniciais de bioissorvente e metal, pH inicial. No entanto, essa comparação pode fornecer grandes indicações da qualidade do bioissorvente estudado, considerando que os trabalhos de bioissorção publicados na literatura geralmente fornecem resultados do processo otimizado e com as melhores condições de sorção dos bioissorventes.

5.5.2. Bioissorção de cádmio pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp.

5.5.2.1. Estudo cinético da bioissorção de cádmio pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp.

A quantidade de cádmio bioissorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. em função do tempo (48 horas) está apresentada na Figura 13.

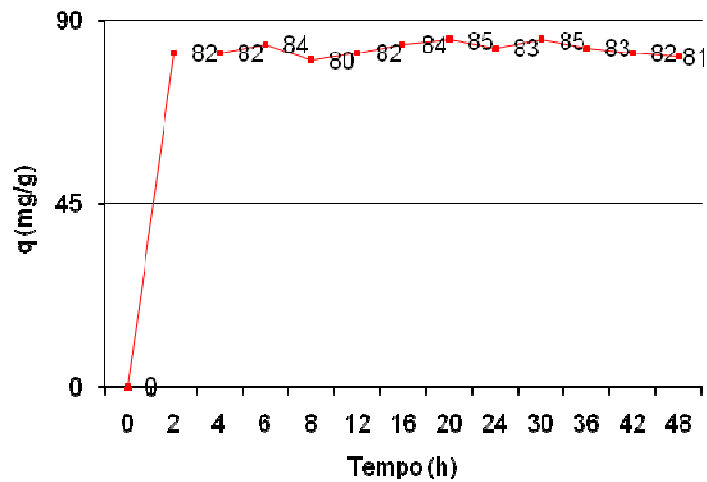


Figura 13 – Quantidade de cádmio bioissorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.

Na Figura 13 pode ser observado que o equilíbrio da bioissorção do cádmio pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. foi alcançado após 2 horas. O pH inicial e final variou de $6,8 \pm 0,2$ (tempo de 0 horas) a $6,7 \pm 0,1$ (tempo de 48 horas). Foi adotado o período de 48 horas para execução das etapas subseqüentes.

5.5.2.2. Variação do pH inicial

A quantidade de cádmio bioissorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. em diferentes valores de pH durante 48 horas está apresentada na Figura 14.

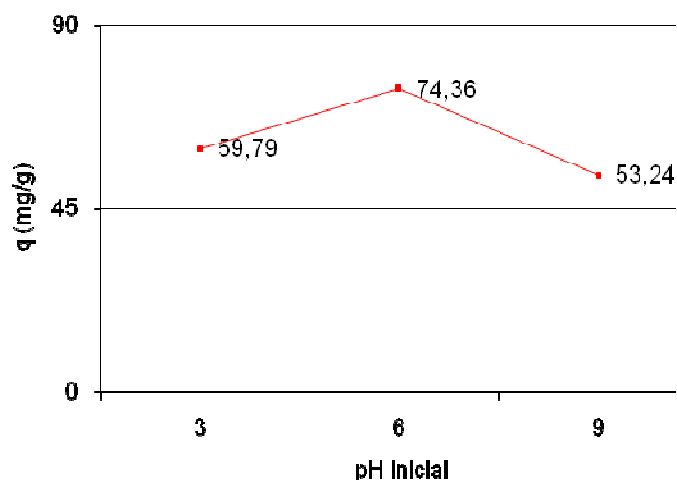


Figura 14 – Quantidade de cádmio bioabsorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. em diferentes valores de pH, durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.

Conforme apresentado na Figura 14 a biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. bioabsorveu maiores quantidades de cádmio no meio com pH 6 (74,36 mgg⁻¹). Em pH 3, houve a remoção de 59,79 mg de cádmio por grama de biomassa seca (Figura 14). Esses resultados foram semelhante aos obtidos por Xiao e colaboradores (2010) onde a bioabsorção de cádmio por biomassa mostrou-se fortemente dependente do pH inicial do meio. Esses autores relataram a eficiência de remoção do cádmio pela biomassa do fungo endofítico *Microsphaeropsis* sp. LSE10, em diferentes valores de pH. A partir do aumento do pH do meio de 3,5 para 5,5, esses autores obtiveram o aumento da capacidade de bioabsorção dessa biomassa seca de 8,6 mgg⁻¹ para 53,3 mgg⁻¹. Essa redução da eficiência de bioabsorção pareada com a redução do pH foi também verificada com as biomassas dos fungos *Pleurotus platypus*, *Agaricus bisporus* e *Calocybe indica*, relatada por Vimala e Nilanjana Das (2009). A redução da bioabsorção em meio com baixos valores de pH está relacionada com a competição dos íons hidrogênio pelos sítios de ligação presentes no bioabsorvente. Essa propriedade de sorção dos bioabsorventes depende dos sítios de ligação disponíveis com carga negativa. Esses sítios de ligação são fornecidos pelos grupos funcionais existentes na superfície do bioabsorventes (SAEED e IQBAL, 2003).

Portanto, a maior quantidade de cádmio bioabsorvido (em pH 6) (Figura 14) pode estar relacionado com a maior disponibilidade dos sítios de ligação que podem não estar disponíveis em pH ácidos devido à concorrência de íons Cd⁺² e H₃O⁺. Com a redução

da acidez da solução, ocorre a conseqüente desprotonação dos grupos funcionais ácidos, tais como carboxilas, fosfato e fosfodiéster. Essa desprotonação pode levar ao aumento da atração entre as cargas negativas presentes no biossorvente e íons metálicos com carga positiva (CHEN *et al.*, 2008).

Em meio com pH 9 foi observada a menor quantidade de cádmio biossorvido ($53,24 \text{ mgg}^{-1}$) (Figura 14). O aumento do pH pode levar a formação de complexos solúveis hidroxilados dos íons metálicos diminuindo a concorrência com os sítios ativos dos grupos funcionais do biossorvente, reduzindo a biossorção (VIMALA E NILANJANA DAS, 2009).

5.5.2.3. Variação da concentração inicial de cádmio na solução

A quantidade de cádmio biossorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. em função de diferentes concentrações iniciais de cádmio, em pH 6 e durante o período de 48 horas, está apresentada na Figura 15.

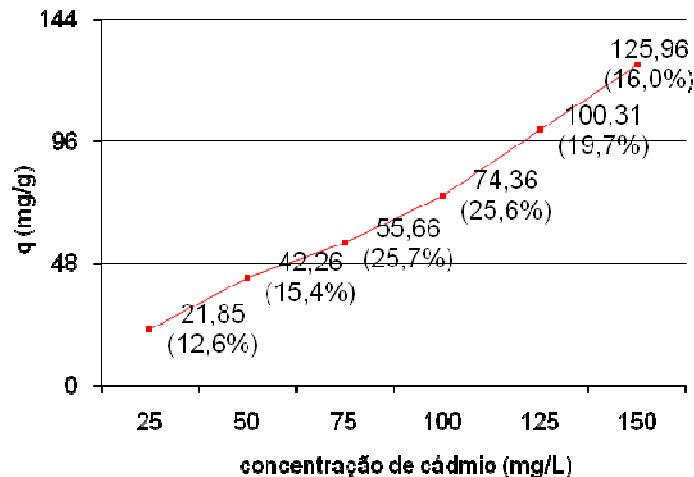


Figura 15 – Quantidade de cádmio biossorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. em função de diferentes concentrações iniciais de cádmio, durante o período de 48 horas, em pH 6, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.
(%) Percentual de cádmio não biossorvido

No meio cuja concentração inicial de cádmio foi de 150 mgL^{-1} , observou-se a maior biossorção desse metal ($125,96 \text{ mgg}^{-1}$) pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. Nesse meio houve o segundo menor percentual de cádmio não

biossorvido (16%). O menor percentual de cádmio não biossorvido (12,6%) foi observado nos ensaios com concentração inicial de cádmio 25 mgL⁻¹. Nessa concentração, essa biomassa seca foi capaz de reter 21,85 mgg⁻¹. A Tabela 18 apresenta a capacidade de ligação entre biomassa microbiana e cádmio reportada por outros autores.

Tabela 18 – Comparação entre quantidade de cádmio (Cd²⁺) biossorvido pela biomassa de microrganismos reportados na literatura e a utilizada neste estudo

Microrganismo	Q (mgg ⁻¹)	pH	Referência
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	53,10	5,5	Anayurt, Sari e Tuzen (2009)
<i>Pseudomonas veronii</i> 2E	54,00	5,0	Vullo e colaboradores (2008)
<i>Mucor rouxii</i> (NaOH pre-tratada)	20,30	6,0	Yan e Viraraghavan (2003)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	15,20	4,5	Li e colaboradores (2004)
<i>Ulva lactuca</i>	29,20	5,0	Sari e Tuzen (2008)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	23,00	6,0	Say, Denizli e Arica (2001)
<i>Microsphaeropsis</i> sp. LSE10	275,50	6,5	Xiao e colaboradores (2010)
<i>Amanita rubescens</i>	27,30	5,0	Sari e Tuzen (2009)
<i>Colletotrichum</i> sp.	125,96	6,0	Presente estudo

Q: quantidade de metal biossorvido em mgg⁻¹

5.5.3. Bioissorção de chumbo pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp.

5.5.4. Estudo cinético da bioissorção de chumbo pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp.

A quantidade de chumbo bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em função do tempo (48 horas) está apresentada na Figura 16.

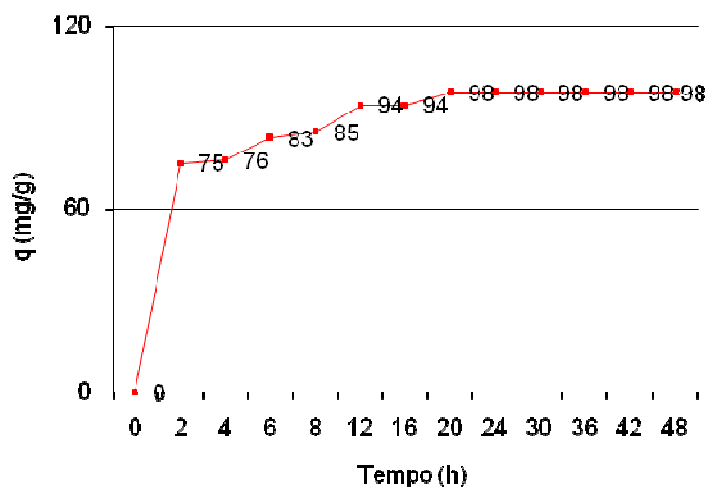


Figura 16 – Quantidade de chumbo bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.

O equilíbrio da bioissorção do chumbo pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. foi alcançado após o período de 20 horas (Figura 16). O pH inicial e final não apresentou variação, mantendo-se 6,7 nos períodos de 0 e 48 horas. Foi adotado o período de 48 horas para execução das etapas subsequentes.

5.5.4.1. Variação do pH inicial

A quantidade de chumbo bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em diferentes valores de pH durante 48 horas está apresentada na Figura 17.

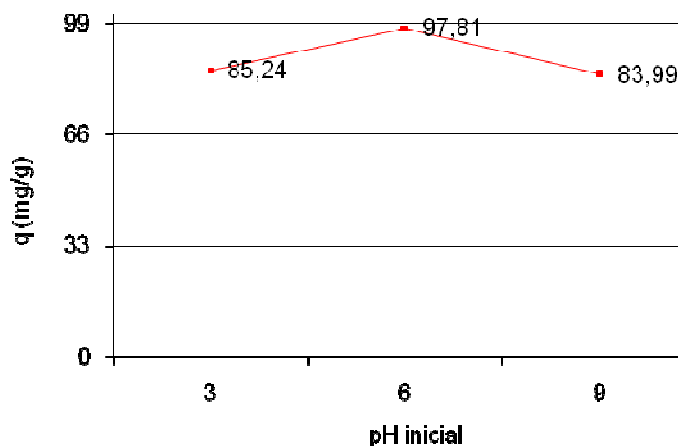


Figura 17 – Quantidade de chumbo bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em diferentes valores de pH, durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.

O exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. foi capaz de bioissorver maiores quantidades de chumbo em meio com pH 6 (97,81 mgg^{-1}). Em meio com pH 3, houve a remoção de 85,24 mg de chumbo por grama de exo-biopolímero (Figura 17). Morillo-Perez e colaboradores (2008) também reportaram maior bioissorção de chumbo por exo-biopolímero do fungo *Paenibacillus jamilae* em meio com pH 6 (213,66 mgg^{-1}), comparado com pH 3 (89,66 mgg^{-1}). Em meio com pH 9, houve a menor remoção de chumbo (83,99 mgg^{-1}) (Figura 17). Resultados semelhantes foram também obtidos por Moon e colaboradores (2006) estudando o polissacarídeo extracelular produzido pelo fungo *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. Segundo esses autores, esse polissacarídeo removeu 51,90 mgg^{-1} de chumbo em meio com pH 6 e quantidades inferiores a 15 mg de chumbo por grama de polissacarídeo em meios com pH 3 e 9.

5.5.4.2. Variação da concentração inicial de chumbo na solução

A quantidade de chumbo bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em função de diferentes concentrações iniciais de chumbo, em pH 6 e durante o período de 48 horas, está apresentada na Figura 18.

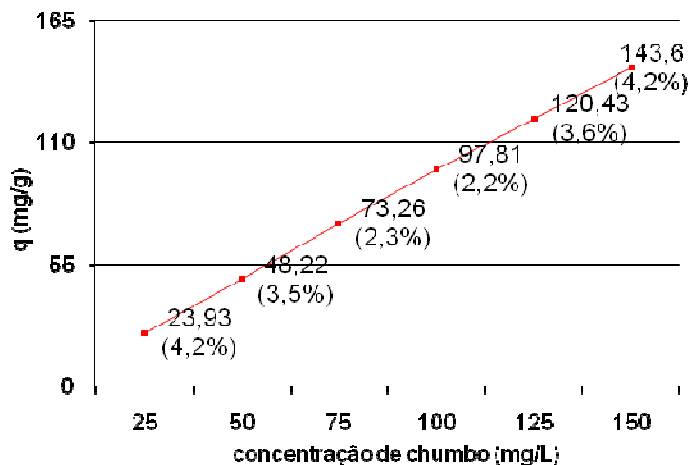


Figura 18 – Quantidade de chumbo bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em função de diferentes concentrações iniciais de chumbo, durante o período de 48 horas, em pH 6, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.

(%) Percentual de chumbo não bioissorvido

Conforme Figura 18 com o aumento da concentração inicial de chumbo houve aumento na quantidade de metal bioissorvido pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. Esses resultados podem ser comparados com os relatados por Moon e colaboradores (2006) estudando a bioissorção de chumbo pelo exopolissacarídeo do fungo *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. Segundo esses autores na solução com concentração inicial de chumbo de 25 mgL⁻¹ foi bioissorvido 30 mgg⁻¹ de chumbo. No entanto com o aumento na concentração inicial de metal para 400 mgL⁻¹ houve aumento na quantidade de chumbo bioissorvido para 120 mgg⁻¹.

A maior quantidade de chumbo bioissorvido (143,63 mgg⁻¹) pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. foi no meio contendo uma concentração inicial de 150 mgL⁻¹ (Figura 18). Todos os ensaios apresentaram percentuais de chumbo não bioissorvido relativamente baixos, inferiores a 4,2%. O menor percentual de metal

não bioissorvido (2,2%) e a conseqüente maior eficiência de remoção de chumbo da solução foi observada nos ensaios com concentração inicial de 100 mgL⁻¹ de chumbo. Diversos trabalhos mostraram a elevada afinidade do chumbo com exo-biopolímeros microbianos (Tabela 17).

Tabela 19 – Comparação entre a quantidade de chumbo (Pb⁺²) bioissorvido pelos exo-biopolímeros microbianos reportados na literatura e o utilizado neste estudo

Microrganismo	Q (m ^g g ⁻¹)	pH	Referência
<i>Paenibacillus jamilae</i>	303,33	5,5	Morillo-Perez e colaboradores (2008)
<i>Paenibacillus jamilae</i>	230,00	--	Morillo e colaboradores (2006)
<i>Pseudoaeromonas sp. SM9913</i>	243,30	4,0-5,5	Zhou e colaboradores (2009a)
<i>Ensifer meliloti</i> MS-125	110,00	6	Lakzian e colaboradores (2008)
<i>Alteromonas macleodii</i> subsp <i>fijiensis</i>	316,00	--	Loaec, Olier e Guezennec (1997)
Bactérias hidrotermais	316,00	7	Loaec, Olier e Guezennec (1998)
<i>Pestalotiopsis sp.</i> KCTC 8637P	120,00	6,2	Moon e colaboradores (2006)
<i>Colletotrichum sp.</i>	143,63	6,0	Presente estudo

Q: quantidade de metal bioissorvido em m^gg⁻¹

5.5.5. Bioissorção de chumbo pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp.

5.5.5.1. Estudo cinético da bioissorção de chumbo pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp.

A quantidade de chumbo bioissorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. em função do tempo (48 horas) está apresentada na Figura 19.

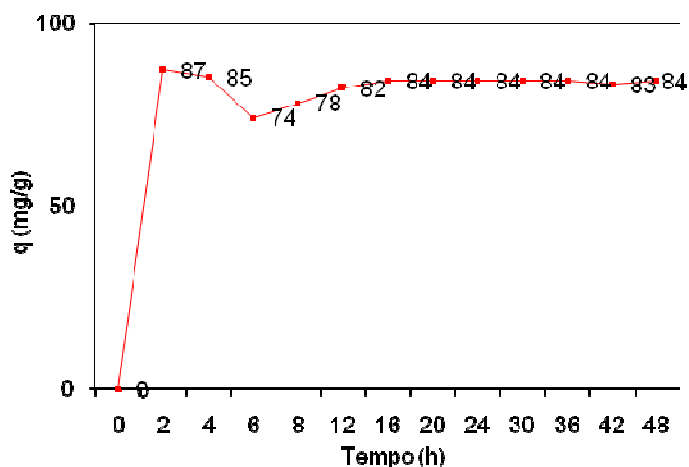


Figura 19 – Quantidade de chumbo bioissorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.

O equilíbrio da bioissorção do chumbo pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. foi alcançado após 16 horas (Figura 19). O pH inicial e final não apresentou variação, mantendo-se 6,8 nos períodos de 0 e 48 horas. Foi adotado o período de 48 horas para execução das etapas subseqüentes.

5.5.5.2. Variação do pH inicial

A quantidade de chumbo bioissorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. em diferentes valores de pH durante 48 horas está apresentada na Figura 20.

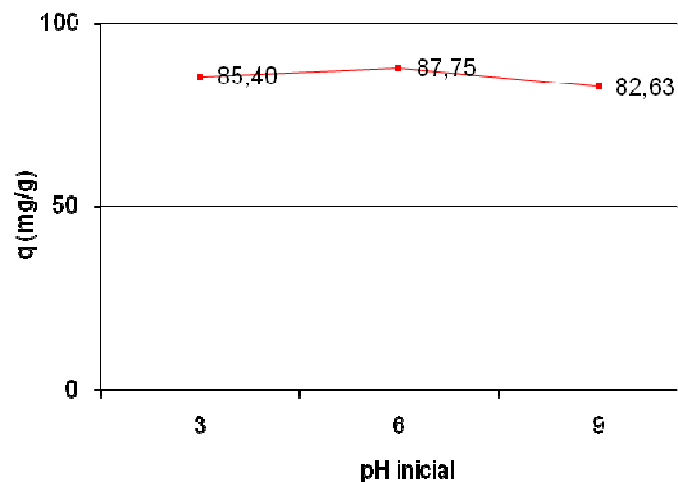


Figura 20 – Quantidade de chumbo bioissorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. em diferentes valores de pH, durante o período de 48 horas, sob agitação de 200 rpm e incubação a 30 °C.

Tal como os demais bioissorventes, a biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. bioissorveu as maiores quantidades de chumbo no meio com pH 6 (87,75 mgg^{-1}) (Figura 20). Em meio com pH 9 houve a menor remoção de chumbo (82,63 mgg^{-1}). Em pH 3, o exo-biopolímero reteve 85,40 mgg^{-1} de chumbo (Figura 20).

5.5.5.3. Variação da concentração inicial de chumbo na solução

A quantidade de chumbo bioissorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. em função de diferentes concentrações iniciais de chumbo, em pH 6 e durante o período de 48 horas, está apresentada na Figura 21.

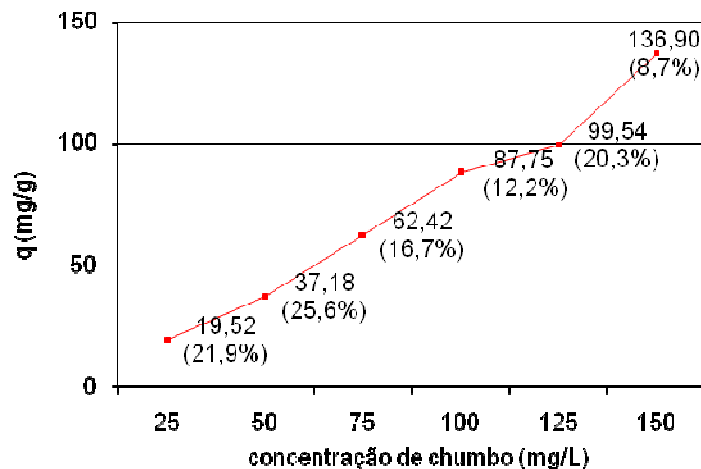


Figura 21 – Quantidade de chumbo bioissorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. em função de diferentes concentrações iniciais de chumbo, durante o período de 48 horas, em pH 6, sob agitação de 200 rpm incubação a 30 °C.

(%) percentual de chumbo não bioissorvido

A maior quantidade de chumbo bioissorvido pela biomassa seca do fungo *Colletotrichum* sp. ($136,90 \text{ mg g}^{-1}$) foi no meio com concentração inicial de 150 mg L^{-1} . Nessa concentração inicial foi também verificado o menor percentual de metal não bioissorvido (8,7%). O maior percentual de chumbo não bioissorvido (25,6%) foi observado nos ensaios com concentração inicial de 50 mg L^{-1} de chumbo. Nesse meio, essa biomassa seca foi capaz de reter $37,18 \text{ mg g}^{-1}$ de chumbo. Vários estudos apresentam a capacidade de ligação entre biomassa microbiana e chumbo.

Tabela 20 – Comparação entre quantidade de chumbo (Pb^{+2}) bioissorvido pela biomassa seca de diferentes microrganismos reportados na literatura e a utilizada neste estudo

Microrganismo	Q (mgg^{-1})	pH	Referência
<i>Ensifer meliloti</i> MS-125	36,00	6,0	Lakzian e colaboradores (2008)
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	56,20	5,5	Anayurt, Sari e Tuzen (2009)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	152,60	5,0	Li e colaboradores (2008)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	163,30	5,0	Hasan, Srivastava e Talat (2009)
<i>Gossypium hirsutum</i>	45,01	5,0	Riaz e colaboradores (2009)
<i>Cephalosporium aphidicola</i>	3,90	5,0	Tunali e colaboradores (2006)
<i>Aspergillus flavus</i>	13,50	5,0	Akar e Tunali (2006)
<i>Amanita rubescens</i>	38,40	5,0	Sari e Tuzen (2009)
<i>Colletotrichum</i> sp.	136,90	6,0	Presente estudo

Q: quantidade de metal bioissorvido em mgg^{-1}

6. CONCLUSÕES

Dos três Ascomicetos estudados (*Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e *Phomopsis* sp.), a maior produção de exo-biopolímero ($5,71 \text{ gL}^{-1}$) foi obtida com o fungo *Colletotrichum* sp. No delineamento experimental, esse fungo produziu $6,11 \text{ gL}^{-1}$ em meio mínimo de sais de Vogel modificado com uréia como única fonte de nitrogênio, adicionado de glicose 5% em 216 horas de cultivo. Nos experimentos de bioissorção, quando comparados com as biomassas, os exo-biopolímeros do fungo *Colletotrichum* sp. demonstraram capacidade superior de bioissorver os íons chumbo ($143,63 \text{ mgg}^{-1}$) e cádmio ($132,30 \text{ mgg}^{-1}$), ambos em solução aquosa com concentração inicial 150 mgL^{-1} e pH 6. No entanto, as biomassas também apresentaram capacidade de bioissorção relativamente altas, quando comparadas com outros resultados reportados na literatura. A capacidade da biomassa do fungo *Colletotrichum* sp. de bioissorver os íons de cádmio e chumbo foram $125,96$ e $136,90 \text{ mgg}^{-1}$, respectivamente, ambos em solução aquosa com concentração inicial 150 mgL^{-1} e pH 6.

As eficiência de remoção dos íons metálicos pelos exo-biopolímeros foi de 98,0% nas soluções de chumbo (com concentração inicial 100 mgL^{-1}) e 92,6% nas soluções de cádmio (com concentração inicial 25 mgL^{-1}), ambos em pH 6. As eficiência de remoção dos íons metálicos pelas biomassas foi de 87,4% nas soluções de chumbo (com concentração inicial 25 mgL^{-1}) e 91,3% nas soluções de cádmio (com concentração inicial 150 mgL^{-1}), ambos em pH 6, mostrando-se tanto a biomassa quanto os exo-biopolímeros materiais biológicos promissores no campo da bioissorção.

7. PERSPECTIVAS

É necessário avaliar a biossorção de chumbo e cádmio pelo exo-biopolímero do fungo *Colletotrichum* sp. em meio com outras substâncias, dentre elas metais, para verificar sua capacidade seletiva. Além disso, devem ser desenvolvidas pesquisas visando a avaliação da capacidade de dessorção e recuperação de metais. Por fim, a otimização das condições de fermentação em um biorreator para alcançar a demanda de produção de exo-biopolímero em larga-escala poderia viabilizar a produção comercial desse material biológico e sua utilização como biossorvente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, M. P.; VALDMAN, E.; LEITE, S. G. F.; BATTAGLINI, F. e RUZAL, S. M. Biosorption of copper by *Paenibacillus polymyxa* cells and their exopolysaccharide. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, n. 6-7, p. 1157-1163, 2005.

ADAMIS, P. D. B.; PANEK, A. D.; LEITE, S. G. F. e ELEUTHERIO, E. C. A. Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 55-60, 2003.

AHLUWALIA, S. S. e GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 12, p. 2243-2257, 2007.

AKAR, T. e TUNALI, S. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb (II) and Cu (II) ions from an aqueous solution, *Bioresource Technology*. v. 97, n. 15, p. 1780–1787, 2006.

ÅKESSON, A.; BJELLERUP, P.; LUNDH, T.; LIDFELDT, J.; NERBRAND, C.; SAMSIOE, G.; SKERFVING, S. e MARIE VAHTER. Cadmium-Induced Effects on Bone in a Population-Based Study of Women. *Environmental Health Perspectives*, v. 114, n.6, p. 830-834, 2006.

ALBERTINI, S.; CARMO, L. F. e PRADO FILHO, L. G. Utilização de serragem e bagaço de cana-de-açúcar para adsorção de cádmio. Use of sawdust and pulp from cane as adsorbents of cadmium. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 113-118, 2007.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. e BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4. ed. New York: John Wiley and Sons, 1996, 880 p.

AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C. e GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. *Química Nova*, v. 25, n. 6b, p. 1145-1154, 2002

AMINI, M.; YOUNESI, H.; BAHRAMIFAR, N.; LORESTANI, A. A. Z.; GHORBANI, F.; DANESHI, A. e SHARIFZADEH, M. Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*. v. 154, n. 1-3, p. 694-702, 2008.

ANAYURT, R. A.; SARI, A. e TUZEN. M. Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies on biosorption of Pb (II) and Cd (II) from aqueous solution by macrofungus (*Lactarius scrobiculatus*) biomass. *Chemical Engineering Journal*. v. 151, n. 1-3, p. 255-261, 2009.

ARGOLO, E. J. Avaliação da capacidade biodegradadora de fungos em filmes poliméricos. 2002, 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química),

Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

ATSDR, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Draft toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, 2008, 450 p. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.html>>. Acesso em 15 jul. 2009.

ATSDR, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Lead. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, 2007, 528 p. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.html>>. Acesso em 15 jul. 2009.

BABARINDE, N. A. A.; BABALOLA, J. O. E SANNI, R. A. Biosorption of lead ions from aqueous solution by maize leaf. *International Journal of Physical Sciences*, v. 1, n. 1, p. 23-26, 2006.

BAE, J.T., SINHA, J., PARK, J.P., SONG, C.H. AND YUN, J.W. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 10, n. 4, p. 482-487, 2000.

BAILEY, S. E.; OLIN, T. J.; MARK BRICKA, R. e DEAN ADRIAN, D. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research*. v. 33, n. 11, p. 2469-2479, 1999.

BANO, Z. A. e RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, preservation, and role and human food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 27, n. 2, p. 87-158, 1988.

BARANDAS, A. P. M. G.; VALVERDE JÚNIOR, I. M.; AFONSO, J. C.; MANTOVANO, J. L. e CUNHA, J. W. S. D. Recuperação de cádmio de baterias níquel-cádmio via extração seletiva com tributilfosfato (TBP). *Química Nova*. São Paulo, v. 30, n. 3, p. 712-717, 2007.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; e CORRADI DA SILVA, M. L. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. *Semina. Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42, jan./jun. 2004.

BHAINSA, K. C. e D'SOUZA, S. F. Removal of copper ions by the filamentous fungus, *Rhizopus oryzae* from aqueous solution. *Bioresource Technology*. v. 99, n. 9, p. 3829-3835, 2008.

BONIOLO, M. R. Biossorção de urânio nas cascas de banana. 2008, 107 f. Dissertação (mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear), IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. and HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building*. John Wiley & Sons, Inc. 653 p. ISBN 0-471-09315-7, 1978.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254, 1976.

BREIEROVÁ, E.; VAJCIKAVÁ, I.; SASINKOVÁ, V. e STRATILOVÁ, E. Biosorption of cadmium ions by different yeast species. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen*, v. 57, n. 7-8, p. 634-639, 2002.

CALFA, B. A. e TOREM, M. L. Uso de Biomassas em Processo Combinado Biossorção/Flotação para Remoção de Metais Pesados. 2007, 69 f. Relatório de Atividades do Projeto de Iniciação Científica – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

CAMILOTTI, F.; MARQUES, M. O.; ANDRIOLI, I.; SILVA, A. R.; TASSO JUNIOR, L. C. e DE NOBILE F. O. Heavy metals accumulation in sugarcane after application in sewage sludge and vinasse. *Engenharia Agrícola*. v. 27, n. 1, p. 284-293, 2007.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 42, p. 131-143, 2000.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, p.181-184, 1967.

CAVALIERI-COSTA, R.; STAPE, C. A.; SUZUKI, I.; BERNABÉ, A. C.; MIRANDA, F. G.; CASTRO, W. H. e LAGE, L. A. Saturnismo causado por projétil de arma de fogo no quadril. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 29, n. 6, p. 374-378, 1994.

CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relação de áreas contaminadas no Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_08.pdf>. Acesso em 15 mar. 2008.

CHAOU, A.; MAZHOUDI, S.; GHORGBAL, M.H. e EL FERJANI, E. Cadmium and zinc inductions of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science, Amsterdam*, v. 127, n. 2, p. 139-147, 1997.

CHEN, G.; ZENG, G.; TANG, L.; DU, C.; JIANG, X. Y.; HUANG, G.; LIU, H. e SHEN, G. Cadmium removal from simulated wastewater to biomass byproduct of *Lentinus edodes*. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 15, p. 7034-7040, 2008.

CHEN, S.; XUE, C.; WANG, J.; FENG, H.; WANG, Y.; MA, Q. e DANG, D. Adsorption of Pb(II) and Cd(II) by Squid *Ommastrephes bartrami* Melanin. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, v. 2009, p. 1-7, 2009.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Brasília, DF, 2005. 23 p. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 13 mar. 2008.

COPELLO, G. J.; VARELA, F.; VIVOT, M. R. e DÍAZ, L. E. Immobilized chitosan as biosorbent for the removal of Cd (II), Cr (III) and Cr (VI) from aqueous solutions. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 14, p. 6538-6544, 2008.

CORDEIRO, R. e LIMA-FILHO, E. C. A inadequação dos valores dos limites de tolerância biológica para a prevenção da intoxicação profissional pelo chumbo no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 177-186, 1995.

CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; CARDOSO, M. S.; VASCONCELOS, A. F. D.; STELUTI, R. M.; GIESE, E. C. e BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações tecnológicas. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

COSTA, C. A.; RUBIO, J. ; SCHNEIDER, I. A. H. . Remoção de Metais Pesados por Sorção em Subproduto do Beneficiamento de Carvão. *Saneamento Ambiental*, v. 59, n. 04, p. 50-56, 1999.

CUNHA, L.; GOMES, A. S.; COUTINHO, F. M. B.; TEIXEIRA, V. G. Principais Rotas de Síntese de Resinas Complexantes de Mercúrio. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. São Carlos, v. 17, n. 2, p. 145-157, 2007.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 1, p. 350-356, 1956.

DUDKA, S. e MILLER, W. P. Accumulation os potentially toxic elements in plants and transfer to human food chain. *Journal of Environmental Science and Health – part B – Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, Nova York, v. 34, n. 4, p. 681-708, 1999.

ERICSON, J. E.; SMITH, D. R. e FLEGAL, R. A. Skeletal Concentrations of Lead, Cadmium, Zinc, and Silver in Ancient North American Pecos. *Indians Environmental Health Perspectives*, v. 93, p. 217-223, 1991.

EVERETT, C. J.; e FRITHSEN, I. L. Association of urinary cadmium and myocardial infarction, *Environment Resource*. v. 106, n. 2, p. 284-286, 2008.

FANG, Q. H. e ZHONG, J. J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*. v. 37, n. 7, p. 769-774, 2002.

FERREIRA, J.; SILVA, F. L. H.; ALSINA, O. L. S.; OLIVEIRA, L. S. C.; CAVALCANTI, E. B.; GOMES, W. C. Equilibrium and kinetic study of pb2+ biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1188-1193, 2007.

GADD, G.M. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist trust*. v. 124, n. 47, p. 25-60, 1993.

GEDDIE, J. L. e SUTHERLAND, I. W. Uptake of metal by bacterial polysaccharides. *Journal of Applied Bacteriology*. Oxford, v. 74, n. 4, p. 467-472, 1993.

GIOVANNINI, J. G.; TAVARES, G. A. e BENDASSOLLI, J. A. Avaliação das técnicas de precipitação química e encapsulamento no tratamento e destinação conjunta de resíduos líquidos contendo cromo e vidrarias de laboratório. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 676-679, 2008.

GLASS, T. A.; BANDEEN-ROCHE, K.; McATEE, M.; BOLLA, K.; TODD, A. C. e SCHWARTZ, B. S. Neighborhood Psychosocial Hazards and the Association of Cumulative Lead Dose With Cognitive Function in Older Adults. *American Journal of Epidemiology*, v 169, n. 6, p. 683-692; 2009.

GODT, J.; SCHEIDIG, F.; GROSSE-SIESTRUP, C.; ESCHE, V.; BRANDENBURG, P.; REICH, A. e GRONEBERG D. A. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. v. 1, n. 22, p. 1-6, 2006.

GORDON, J. N.; TAYLOR, A. e BENNETT, P. N. Lead poisoning: case studies. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 53, n. 5, p. 451-458, 2002.

GULSON, B.; KORSCH, M.; MATISONS, M.; DOUGLAS, C.; GILLAM, L. e McLAUGHLIN, V. Windblown Lead Carbonate as the Main Source of Lead in Blood of Children from a Seaside Community: An Example of Local Birds as “Canaries in the Mine”. *Environment Health Perspectives*, v. 117, n. 1, p. 148-154, 2009.

HASAN, S.H.; SRIVASTAVA, P. E TALAT, M. Biosorption of Pb(II) from water using biomass of *Aeromonas hydrophila*: Central composite design for optimization of process variables. *Journal of Hazardous Materials*. v. 168, n. 2-3, p. 1155-1162, 2009.

HO, Y. S. Removal of copper ions from aqueous solution by tree fern. *Water Research*, v. 37, n. 10, p. 2323-2330, 2003.

HUAMÁN-PINO, G. A. Biossorção de Metais Pesados Utilizando Pó da Casca de Coco Verde (*Cocos nucifera*). 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica) - Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia da PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2005.

HUANG, D.; CUI, F.; LI, Y; ZHANG, Z.; ZHAO, J.; HAN, X.; XIAO, X., QIAN, J. WU, Q e GUAN, G. Nutritional Requirements for the Mycelial Biomass and Exopolymer Production by *Hericium erinaceus* CZ-2. *Food Technology Biotechnology*, v. 45, n. 4, p 389-395, 2007.

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Cadmium and cadmium compounds. Determination of Noncancer Chronic Reference Exposure Levels. Lyon, p. A40-A46, 2000.

IQBAL, M.; SCHIEWERB, S. e CAMERON, R. Mechanistic elucidation and evaluation of biosorption of metal ions by grapefruit peel using FTIR spectroscopy, kinetics and isotherms modeling, cations displacement and EDX analysis. *Journal of Chemical, Technology and Biotechnology*. 2009. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/122383194/PDFSTART>> Acesso em 17 jul. 2009.

JÄRUP, L.; BERGLUND, M.; ELINDER, C. G.; NORDBERG, G. e VAHTER M. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. v. 24, p. 1-51, 1998.

JÄRUP, L. e AKESSON. A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 238, n. 3, p. 201-208, 2009.

JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. *British Medical Bulletin*, Oxford, v. 68, p. 167-182, 2003.

JOHANSEN, P.; PEDERSEN, H. S.; ASMUND, G. e RIGET, F. Lead shot from hunting as a source of lead in human blood. *Environmental Pollution*, v. 142, n. 1, p. 93-91, 2006.

JOSEPH, P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 1, n. 3, p. 272-279, 2009.

KAY, A; ISHINO, T; ARASHIDA, T.; HATANAKA, K.; AKAIKE, T.; MATSUZAKI, K.; KANEKO, Y. e MIMURA T. Biosynthesis of curdlan from culture media containing ¹³C-labeled glucose as carbon source. *Carbohydrate Research*, v. 240, p. 153-159, 1993.

KHOSHGOFTARMANESH, A. H. e CHANEY, R. L. Preceding Crop Affects Grain Cadmium and Zinc of Wheat Grown in Saline Soils of Central Iran *Journal of Environmental Quality*, v. 36, n. 4, p. 1132-1136, 2007.

KIM, S. W., HWANG, H. J., XU, C. P., SUNG, J. M., CHOI, J. W. e YUN, J. W. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharide by *Cordyceps militaris* C738. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, n. 1, p 120-126, 2003.

KIM, H. O.; LIM, J. M.; JOO, J. H.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W. e YUN, J. W. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 10, p.1175-1182, 2005.

KIRAN, B. e KAUSHIK, A. Chromium binding capacity of *Lyngbya putealis* exopolysaccharides. *Biochemical Engineering Journal*. v. 38, n. 1, p. 47-54, 2008.

KOBAYASHI, E.; SUWAZONO, Y.; DOCHI, M.; HONDA, R e KIDO, T. Influence of Consumption of Cadmium-Polluted Rice or Jinzu River Water on Occurrence of Renal Tubular Dysfunction and/or Itai-itai Disease. *Biological Trace Element Research*. v. 127, n. 3, p. 257-268, 2009.

LACERDA, L. D.; MOLISANI, M. M. Three decades of Cd and Zn contamination in Sepetiba Bay, SE Brazil: Evidence from the mangrove oyster *Crassostraea rhizophorae*. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, n. 8, p. 974-977, 2006.

LAKZIAN, A.; BERENJI, A. R.; KARIMI, E. e RAZAVI, S. Adsorption Capability of Lead, Nickel and Zinc by Exopolysaccharide and Dried Cell of *Ensifer meliloti*. *Asian Journal of Chemistry* v. 20, n. 8, p. 6075-6080, 2008.

LI, Q.; WU, S.; LIU, G.; LIAO, X.; DENG, X.; SUN, D.; HU, Y. e HUANG, Y. Simultaneous biosorption of cadmium (II) and lead (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*, *Separation and Purification Technology* v. 34, n. 1-3, p. 135-142, 2004.

LI, X.-M.; LIAO, D.-X.; XU, X.-Q.; YANG, Q.; ZENG, ZHENG G.-M. W.e GUO, L. Kinetic studies for the biosorption of lead and copper ions by *Penicillium simplicissimum* immobilized within loofa sponge. *Journal of Hazardous Materials*. v. 159, n. 2-3, p. 610-615, 2008.

LOAEC, M.; OLIER, R. e GUEZENNEC, J. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research*, v. 31, n. 5, p. 1171-1179, 1997.

LOAEC, M.; OLIER, R. e GUEZENNEC, J. Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydrate Polymers*, v. 35, n. 1-2, p. 65-70, 1998.

LOUKIDOU, M. X.; MATIS, K. A.; ZOUBOULIS, A. I. e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDOU, M.. Removal of As (V) from wastewaters by chemically modified fungal biomass. *Water Research*, v. 37, n. 18, p. 4544-4552, 2003.

LUIZ-SILVA, W.; MATOS, R. H. R.; KRISTOSCH, G. C.; MACHADO, W. Spatial and seasonal variability of trace-element concentrations in sediments from the Santos-Cubatão estuarine system, São Paulo, Brazil. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 256-263, 2006.

MADINGAN, M. T. *Microbiologia de Brock*. São Paulo, Prentice Hall, 2004. 608 p.

MANNINO, D. M.; HOLGUIN, F.; GREVES, H. M.; SAVAGE-BROWN, A.; STOCK A. L. e JONES, R. L. Urinary cadmium levels predict lower lung function in current and former smokers: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Thorax*, v. 59, n. 3, p. 194-198, 2004.

MARTÍNEZ-GARCÍA, M. J.; MORENO, J. M.; MORENO-CLAVEL, J.; VERGARA, N.; GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; GUILLAMÓN, A.; PORTÍ, M. e MORENO-GRAU, S. Heavy metals in human bones in different historical epochs *Science of The Total Environment*. *Science of the Total Environment*, v. 348, n. 1-3, p. 51-72, 2005.

MISHRA, A. e JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 13, p. 3382-3386, 2009.

MOKADDEM, H.; SADAOU, Z.; BOUKHELATA, N.; AZOUAOU, N. e KACI, K. Removal of Cadmium from aqueous solution by polysaccharide produced from *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Hazardous Materials*. v. 172, n. 2-3, p. 1150-1155, 2009.

MOON, S-H PARK, C-S KIM Y-J e PARK Y-I. Biosorption isotherms of Pb (II) and Zn (II) on Pestan, an extracellular polysaccharide, of *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 2, p. 312-316, 2006.

MOREIRA, F. R. e MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 251-260, 2004.

MORILLO, J. A.; AGUILERA, M.; RAMOS-CORMENZANA, A. e MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. Production of a Metal-Binding Exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* Using Two-Phase Olive-Mill Waste as Fermentation Substrate. *Current Microbiology*, v. 53, n. 3, p. 189-193, 2006.

MORILLO-PÉREZ, J. A.; GARCÍA-RIBERA, R.; QUESADA, T.; AGUILERA, M.; RAMOS-CORMENZANA, A. e OLIVA-SÁNCHEZ, M. M. Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 24, n. 11, p. 2699-2704, 2008.

MURALEEDHARAN, T. R.; IYENGAR, L. e VENKOBACHAR, C. Screening of Tropical Wood-Rotting Mushrooms for Copper Biosorption. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 9, p. 3507-3508, 1995.

MURATA, K.; IWATA, T.; DAKEISHI, M. e KARITA, K. Lead Toxicity: Does the Critical Level of Lead Resulting in Adverse Effects Differ between Adults and Children? *Journal of Occupational Health*. v. 51, n. 1, p. 1-12, 2009.

NAMASIVAYAM, C; YAMUNA, R.T. Adsorption of chromium (VI) by a low cost adsorbent: biogas residual slurry. *Chemosphere*, v. 30, n. 3, p. 561-578, 1995.

NELSON, N. A. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. *Journal Biological Chemistry*, v.135, n.1, p.5. 1944.

OZDEMIR, G.; CEYHAN, N. e MANAV, E. Utilization of an exopolysaccharide produced by *Chryseomonas luteola* TEM05 in alginate beads for adsorption of cadmium and cobalt ions, *Bioresource Technology*, v. 96, n. 15, p 1677-1682, 2005.

PAKSHIRAJAN, K. e SWAMINATHAN, T. Biosorption of Copper and Cadmium in Packed Bed Columns with Live Immobilized Fungal Biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 157, n. 2, p. 159-173, 2009.

PAL, A. e PAUL, A. K. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 1, p. 49-64, 2008.

PALLU, A. P. S. Biossorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus sp.* 2006, 69f. Dissertação (mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PARK, J. P.; KIM, Y. M.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; CHO, Y. J.; LEE, Y. S.; SONG, C. H. e YUN, J. W. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry*. v. 37, p. 1257-1262, 2002.

RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B. e VELLOSO, A. C. X. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília, v. 35, n. 7, p. 1289-1303, 2000.

RIAZ, M.; NADEEM, R.; HANIF, M. A.; ANSARI, T. M. e REHMAN, K.-U. Pb(II) biosorption from hazardous aqueous streams using *Gossypium hirsutum* (Cotton) waste biomass. *Journal of Hazardous Materials*. v. 161, n. 1, p. 88-94, 2009.

ROMERA, E.; GONZÁLEZ, F.; BALLESTER, A.; BLÁZQUEZ, M. L. e MUÑOZ, J. Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 17, p. 3344-3353, 2007.

SANTOS, G. C. G. e RODELLA, A. Efeito da adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico de B, Zn, Cu, Mn e Pb no cultivo de *Brassica juncea* *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 31, n. 4, p. 793-804, 2007.

SANTOS, I. N.; HORBE, A. M. C., SILVA, M. S. R.; MIRANDA, S. A. F. Influence of a sanitary dirt-fill and domestic effluents in the surface waters of the Tarumã River and its tributaries. *Acta Amazonica*. Manaus, v. 36, n. 2, p. 229-235, 2006.

SAEED e IQBAL. Bioremoval of cadmium from aqueous solution by black gram husk (*Cicer arietinum*). *Water Resource*. v. 37, n. 14, p. 3472-3480, 2003.

SARI, A. e TUZEN, M. Biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution using green alga (*Ulva lactuca*) biomass, *Journal of Hazardous Materials*. v. 152, n.1, p. 302-308, 2008.

- SARI, A e TUZEN, M. Kinetic and equilibrium studies of biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution by macrofungus (*Amanita rubescens*) biomass. *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, n. 2-3, p. 1004-1011, 2009.
- SAY, R.; DENIZLI, A. e ARICA, M. Y. Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Bioresource Technology*. v. 76, n. 1, p. 67-70, 2001.
- SELBMANN, L., STINGELE, F e PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 84, n.2, p.135-145, 2003.
- SEVIOUR, R. J.; STASINOPOULOS, S. J. A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 279-298, 1992.
- SHIH, I. L., PAN, K. e HSIEH, C. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*. v. 41, n. 5, p. 1129-1135, 2006.
- SHU, C. H. e LUNG, M. Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochemistry*. v. 39, n. 8, p. 931-937, 2004.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*., v. 160, n. 1, p. 61-68, 1945.
- SOUZA, D. M. e C. H. GARCIA-CRUZ. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. *Semina, Ciências Agrárias, Londrina*, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.
- SOUZA, J. I.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; SCHOENLEIN, N. C. Cooper, manganese and cadmium biosorption by *Saprolegnia subterranea* (Dissmann) R.L. Szym. and *Pythium torulosum* Coker & P. Patt. (Oomycetes) biomass. *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 217-223, 2008.
- TAIT M. I., SUTHERLAND I. W., CLARKE-STURMAN A. J. Effect of growth conditions on the production composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. *Journal of General Microbiology*. v. 132, p.1483 -1492, 1986
- TAVARES, T. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados: exemplos do recôncavo baiano. *Química Nova*. São Paulo, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.
- TAVARES, T. e SILVA, I.S. Remoção de metais pesados por biofilmes suportados em carvão ativado. In: *Catalizadores y adsorbentes para la protección ambiental en la región Iberoamericana*, Ed. J. Blanco, P. Avila, CYTED, Rede temática V.C

Catalizadores para la protección ambiental, Madrid, p. 237-240, 2001. (ISBN 84-931538-5-0).

TEWARI, N.; VASUDEVAN, P. e GUHA, B. K. Study on biosorption of Cr (VI) by *Mucor hiemalis*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 23, n. 2, p. 185–192, 2005.

THOMAS, L. D. K.; HODGSON, S. NIEUWENHUIJSEN, M e JARUP, L. Early Kidney Damage in a Population Exposed to Cadmium and Other Heavy Metals. *Environment Health Perspectives*. v. 117, n. 2, p. 181–184, 2009.

TOMKO, J.; BAČKOR M.; ŠTOFKO, M. Biosorption of heavy metals by dry fungi biomass. *Acta Metallurgica Slovaca*. v. 12, p. 447 – 451, 2006

TUNALI, S.; AKAR, T.; OZCAN, A. S.; KIRAN, I. e OZCAN, A. Equilibrium and kinetics of biosorption of lead (II) from aqueous solutions by *Cephalosporium aphidicola*, *Separation and Purification Technology*. v. 47, n. 3, p. 105–112, 2006.

USGS, U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries, Cadmium. Reston, Virginia, p. 36-37, 2010. Disponível em: <<http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/cadmium/140303.pdf>>. Acesso em 06 mar. 2010.

VEGLIO, F. e BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*. v. 44, n. 3, p. 301-316, 1997.

VIEIRA, R. H. S.; VOLESKY, V. B. Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiology*, v. 3, p. 17–24, 2000.

VIJAYARAGHAVAN, K. e YUN, Y. S. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*. v. 26, n. 3, p. 266-291, 2008.

VIMALA, R. e NILANJANA DAS, N. Biosorption of cadmium (II) and lead (II) from aqueous solutions using mushrooms: A comparative study. *Journal of Hazardous Materials*. v. 168, n. 1, p. 376-382, 2009.

VINOD, V. T. P.; SASHIDHAR, R. B.; SREEDHAR, B.; RAMA RAO, B.; NAGESWARA RAO, T. e ABRAHAM, J. T. Interaction of Pb^{2+} and Cd^{2+} with gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A natural carbohydrate polymer with biosorbent properties, *Carbohydrate Polymers*, v. 78, n. 894–901, 2009.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Genetics Bulletin*., v. 13, p. 42-46, 1956.

VOLESKY, B. Biosorption of heavy metals. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1990, 396 p.

VOLESKY, B.; MAY, H. e HOLAN, Z. R. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Bioengineering*. v. 41, n. 8, p. 826-829, 1993.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z.R. Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*, Nova York, v.11, n. 3, p. 235-250, 1995.

VULLO, D. L.; CERETTI, H. M.; DANIEL, M. A.; RAMÍREZ, S. A. M. e ZALTS, A. Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. *Bioresource Technology*. v. 99, n. 13, p. 5574-5581, 2008.

XIAO, X.; LUO, S. G.; ZENG, G.; WEI, W.; WAN, Y.; CHEN, L.; GUO, H.; CAO, Z.; YANG, L.; CHEN, J. e XI, Q. Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microspheeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresource Technology*. v. 101, n.6, p. 1668-1674, 2010.

ZHOU, W. Z.; LI, W. W.; ZHANG, Y. Z.; GAO, B. Y. e WANG, J. Biosorption of Pb super (2+) and Cu super (2+) by an Exopolysaccharide from the Deep-Sea Psychrophilic Bacterium *Pseudoatieromonas* sp. SM9913. *Environmental Science*. v. 30, n. 1, p. 200-205, 2009a.

ZHOU, W.; WANG, J.; SHEN, B.; HOU, W. e ZHANG, Y. Biosorption of copper (II) and cadmium (II) by a novel exopolysaccharide secreted from deep-sea mesophilic bacterium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 72, n. 2, p. 295-302, 2009b.

ZHU, H. e SUN, S. J. Effect of Constant Glucose Feeding on the Production of Exopolysaccharides by *Tremella fuciformis* spores. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 152, n. 3, p 366–373, 2009.

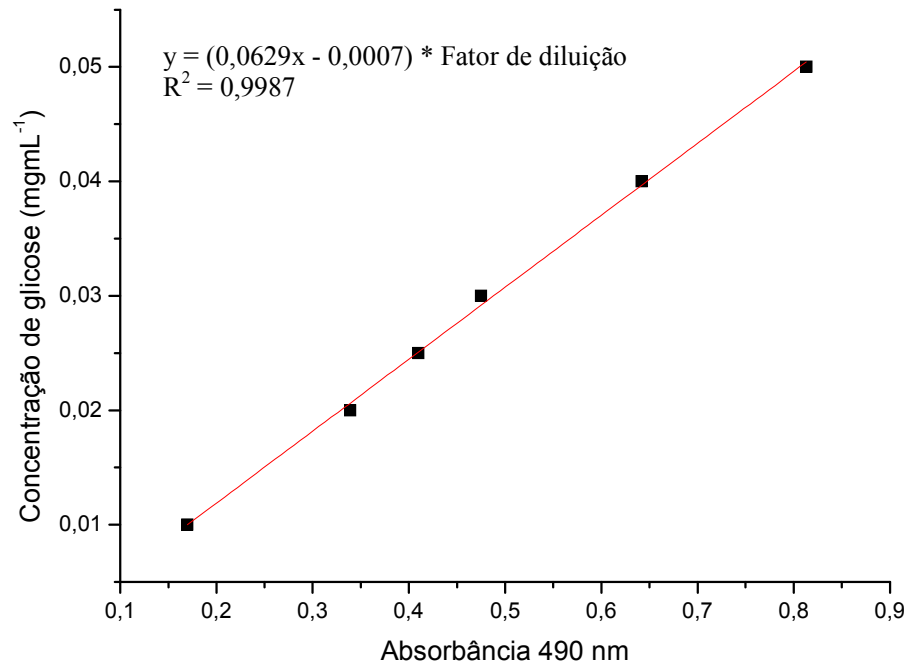
ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C. e PRATA NEVES, M. C. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

WANG, G.; SU, M. Y.; CHEN, Y. H.; LIN, F. F.; LUO, D. e GAO, S. F. Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in southeastern China. *Environmental Pollution*, v. 144, n. 1, p. 127-135, 2006.

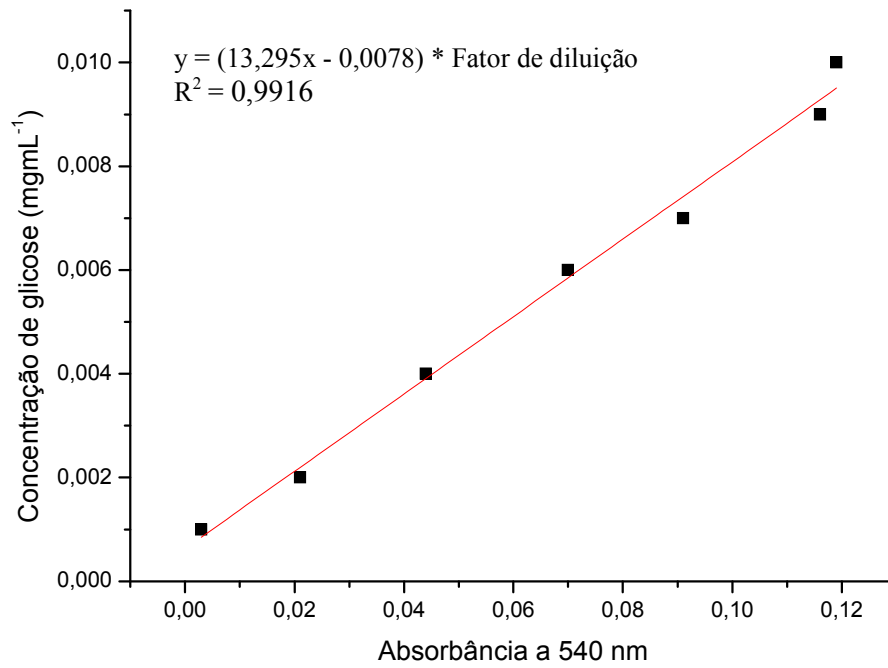
WU, C. H.; LIANG, Z. C.; LU, C. P. e WU, S. H. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Production and Carbohydrate Composition of Exopolysaccharide by Submerged Culture of *Pleurotus citrinopileatus* *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 16, n. 2, p. 61-67, 2008.

YAN, G. E VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research*.v. 37, n. 18, p. 4468–4496, 2003.

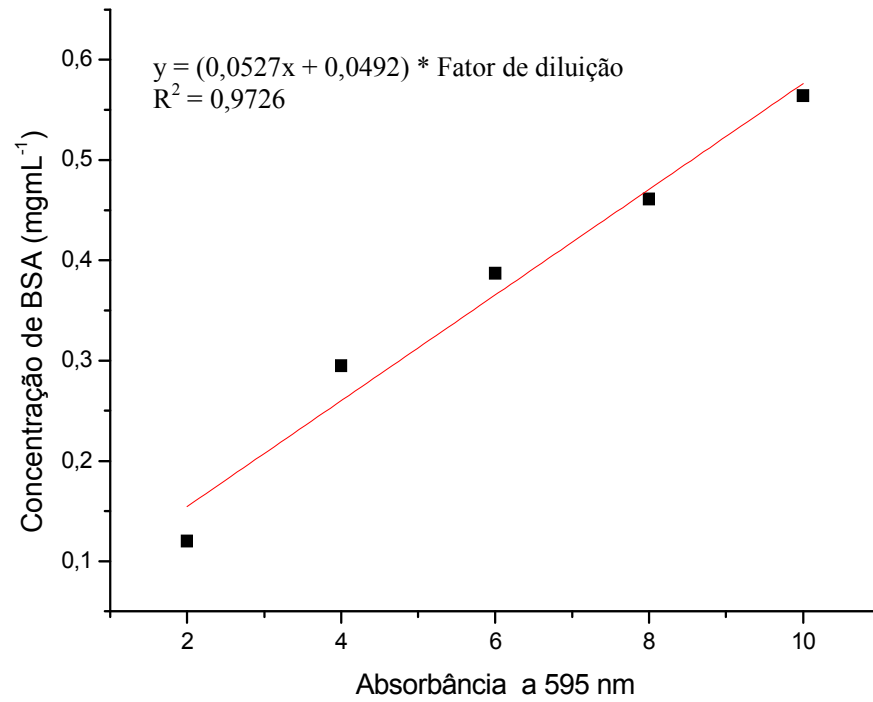
APÊNDICES



1 – Curva de calibração dos açúcares totais segundo método de Dubois e colaboradores (1956).



2 – Curva de calibração dos açúcares redutores segundo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944).



3 – Curva de calibração de proteínas totais solúveis segundo método de Bradford (1976).

ANEXO

Relação dos constituintes presentes no meio mínimo de sais de Vogel, para o preparo de um litro de solução:

Sais	Quantidades
Na ₃ citrato 5/2.H ₂ O	150 g
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g
NH ₄ NO ₃	100 g
MgSO ₄ 7.H ₂ O	10 g
CaCl ₂ 2.H ₂ O	5 g
Solução Elementos Traços*	5 mL
Solução de Biotina (0,01%)	2,5 mL

A solução de elementos-traços*

Ácido cítrico 1.H ₂ O	50 g
ZnSO ₄ 7.H ₂ O	50 g
Fe(NH ₄)(SO ₄) ₂ 6.H ₂ O (v/v)	10 g
CuSO ₄ 5.H ₂ O	2,5 g
MnSO ₄ 1.H ₂ O	2,5 g
H ₃ BO ₃ anidro	0,5 g
Na ₂ MoO ₄ 2.H ₂ O	0,5 g