

EDUARDO KOVALSKI MITTER

**UTILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* IMOBILIZADA EM
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PARA A BIOSSORÇÃO E
BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE ACID BLACK 48**

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS RENATO CORSO

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

RIO CLARO – SP

ABRIL – 2012

620.1122 Mitter, Eduardo Kovalski
M685u Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bagaço de
cana de açúcar para a biossorção e biodegradação do corante Acid Black
48 / Eduardo Kovalski Mitter. - Rio Claro : [s.n.], 2012
121 f. : il., figs., tabs., quadros

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

1. Biodegradação. 2. Corantes Têxteis. 3. Polietilenoimina. 4.
Imobilização celular. I. Título.

À minha família:

Ao meu pai Luiz, a minha mãe Claudia e ao meu segundo pai Gabriel,

Aos meus irmãos Manuel e Felipe;

Por todo o incentivo, ensinamentos, carinho e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo livre-arbítrio, às pessoas e oportunidades que ele me deu.

Ao Professor Carlos Renato Corso pela orientação profissional, confiança e amizade que me ajudaram a crescer como pesquisador e como pessoa.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

Ao técnico do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas de Meio Ambiente, José Roberto Pedro, pela atenção, dedicação e ideias que me ajudaram a concluir este trabalho.

A Aline pela paciência, entender minha ausência, entender novos rumos na minha vida, companheirismo, discussões microbiológicas, incentivo, carinho e preocupação.

A toda a minha família (Kovalski-Mitter), em especial as minhas duas avós Lina e Ibra, por entender minha ausência durante tantos anos longe de Curitiba. Por procurar entender meus objetivos no mestrado e minha linha de pesquisa

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, Grazy, Erica “Xena”, Paulo “Chal”, Renato “Bill”, Ivo, Jaqueline, Heide e Mariana. Por todos os momentos de descontração, pelo ótimo ambiente de trabalho que criamos, por toda companhia, ajuda com os meus experimentos, softwares, etc.

Aos meus colegas do Departamento de Bioquímica da UNESP – Rio Claro, César, Alex, Eduardo Morales, Angela, Thayse, Mariana, Juliana, Tulio, Roberta, Mary Helen, Kate, Viviane, Cárol, Fabrício, Bárbara, Luciana, Luana e outros alunos de pós-graduação e graduação.

Aos meus amigos da república Zona Rural – UFSCar, Alexandre “Zica”, Marcel “Piniko”, Ícaro “Porva” e Felipe “Poka-Pika”, pela amizade desde os tempos da faculdade.

Aos meus amigos da UNESP – Rio Claro, Lucas “Fólem”, Rafa e Vinícius, obrigado pelos momentos de descontração e convivência durante esses anos.

A música, em especial ao heavy metal, que durante 13 anos tem sido uma parte importante da minha vida e que me ajudou ser uma pessoa mais forte e centrada nas dificuldades e obstáculos da vida.

“Born to lose, live to win”

Lemmy Kilmister

"A little love and affection

In everything you do

Will make the world a better place

With or without you.”

Neil Young

RESUMO

Com a revolução industrial ocorreu o crescimento do setor têxtil, o qual utiliza uma grande quantidade de água nos processos de tingimento e uma ampla variedade de corantes sintéticos. Uma pequena concentração destes corantes no meio ambiente já pode gerar uma poluição altamente visível e indesejável, provendo alterações nos ecossistemas aquáticos. Dentre os processos de remoção de corantes, a adsorção, bioadsorção e biodegradação apresentam-se como as técnicas mais vantajosas. A adsorção consiste em um processo de transferência de massa na qual se explora a capacidade de certos sólidos em concentrar determinadas substâncias existentes em soluções líquidas. A bioadsorção envolve interações físico-químicas entre a superfície celular de microrganismos e corantes através de difusão passiva. A biodegradação, por sua vez, ocorre através de enzimas produzidas por alguns microrganismos que são capazes de degradar a molécula do corante. De forma a aumentar a eficiência destes processos, a imobilização celular permite a reutilização das células imobilizadas, alta resistência mecânica permitindo que os processos metabólicos se realizem em condições adversas. Portanto, este trabalho propôs a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em bagaço de cana ativado para promover a bioadsorção e biodegradação do corante Acid Black 48 (AB48) em solução aquosa. Para isso, o bagaço de cana de açúcar foi tratado com polietilenoimina (PEI), NaOH e água destilada. Concentrações de 0,25, 0,5 e 1% de uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* foram avaliadas para determinar as melhores taxas de imobilização celular. Uma vez estabelecida a imobilização, foram elaborados ensaios de bioadsorção/adsorção utilizando *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada, livre e apenas o bagaço de cana tratado, após o contato com o corante à 30°C, por 2 horas nos pHs 2,50, 4,50 e 6,50. Após cálculos de descoloração, taxa de remoção do corante e capacidade adsorptiva, os melhores resultados foram determinados no pH 2,50 e utilizando-se o bagaço de cana tratado com PEI. Sendo assim, novos ensaios de biodegradação por 240 horas com levedura livre e imobilizada em bagaço de cana tratado com PEI foram avaliados através de espectrofotometria UV-Vis e FT-IR. As análises UV-Vis apresentaram valores significativos de absorbância relativa indicando a ocorrência de biodegradação em ambos os tratamentos avaliados. Estes resultados foram comprovados novamente através dos espectros de FT-IR, através dos quais foram detectadas bandas indicando prováveis alterações na molécula do corante, assim como a possível formação novos metabólitos. Portanto o uso de *Saccharomyces*

cerevisiae imobilizada em bagaço de cana é um método promissor para a bioadsorção e biodegradação no tratamento de efluentes têxteis. Além da alta capacidade de remoção do corante com células imobilizadas em bagaço de cana, estas são de fácil decantação e remoção em relação ao uso de células livres.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*, polietilenoimina, bagaço de cana de açúcar, corantes têxteis, imobilização celular, biodegradação, bioadsorção e adsorção.

ABSTRACT

Along with the industrial revolution, textile sector growth is inserted. These industries use large amounts of water in dyeing processes and a wide variety of synthetic dyes. A small concentration of these dyes in the environment can generate a highly visible and undesirable pollution and also changes in aquatic ecosystems. Among dye removal processes, adsorption, biosorption and biodegradation are the most advantageous techniques. Adsorption is a mass transfer process in which exploits certain solids ability to concentrate other substances dissolved in liquid solutions. Biosorption involves physicochemical interactions between microorganism cell surface and dye molecule through passive diffusion. Biodegradation occurs when enzymes produced by certain microorganisms are capable of breaking the dye molecule. In order to increase the efficiency of these processes, cell immobilization allows reuse of the immobilized cells and enables high mechanical strength in which metabolic processes can take place in adverse conditions. Therefore, this study aims the use of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in activated sugarcane bagasse to promote Acid Black 48 dye (AB48) biodegradation and biosorption in aqueous solutions. In order to achieve these results, sugarcane bagasse was treated with polyethyleneimine (PEI), NaOH and distilled water. Concentrations of 0.25, 0.5 and 1% of a *Saccharomyces cerevisiae* suspension were evaluated to determine best cell immobilization rates. Once the immobilization was established, biosorption/adsorption assays were developed using immobilized and free yeast cells and only treated sugarcane bagasse, after 2 hours dye contact at 30°C and at pH 2.50, 4.50 and 6.50. After discoloration rate, dye removal and adsorption capacity were determined, best results were established at pH 2.50, and using PEI treated bagasse. Hence, further biodegradation assays for 240 hours with free and immobilized yeast in PEI treated sugarcane bagasse were evaluated by UV-Vis and FT-IR spectrophotometry. UV-Vis analysis showed a significant relative absorbance value which indicates the occurrence of biodegradation in both treatments. These results were confirmed by FT-IR spectra, whereby bands were detected indicating probable dye molecule change, and possible new metabolites formation. Therefore *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in sugarcane bagasse is very attractive for biosorption and biodegradation in textile effluent treatment. Besides high dye removal capacity immobilized yeast cells are easily decanted when compared to free cells use.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, polyethyleneimine, sugarcane bagasse, textile dyes, cell immobilization, biodegradation, adsorption and biosorption.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: IMPORTAÇÕES E EXPORTAÇÕES BRASILEIRAS NO SETOR DE CORANTES, PIGMENTOS E BRANQUEADORES ÓPTICOS, DE 2005 A 2010.	42
FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA DA POLIETILENOIMINA – PEI.....	50
FIGURA 3: METODOLOGIA UTILIZADA PARA O TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E ANÁLISE PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REMANESCENTES.	58
FIGURA 4: DETERMINAÇÃO DAS MELHORES TAXAS DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DA ANÁLISE EM ESPECTROFOTÔMETRO UV-VIS À 540 NM.	60
FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DO CORANTE ACID BLACK 48.....	61
FIGURA 6: TESTES APENAS COM BAGAÇO DE CANA TRATADO.....	63
FIGURA 7: TESTES COM <i>S. CEREVISIAE</i> IMOBILIZADA.....	64
FIGURA 8: TESTE COM <i>S. CEREVISIAE</i> LIVRE.....	65
FIGURA 9: VARREDURAS ESPECTRAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE REMANESCENTE NO BAGAÇO DE CANA. AS DIFERENTES VARREDURAS FORAM OBTIDAS A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR APÓS O CONTATO DE 120MIN COM ÁGUA DESTILADA NO PH 2,50. VALORES OBTIDOS A PARTIR DE UMA CUBETA DE QUARTZO COM CAMINHO ÓPTICO DE 0,5 CM.	70
FIGURA 10: CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE REMANESCENTE (MG.ML ⁻¹) PRESENTE EM 6 MG DE BAGAÇO DE CANA SEM TRATAMENTO, TRATADO COM ÁGUA DESTILADA, TRATADO COM PEI E TRATADO COM NaOH. ENSAIOS APÓS O CONTATO DE 120 MIN COM ÁGUA DESTILADA NO PH 2,50, 4,50 E 6,50.....	71
FIGURA 11: RELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE <i>S. CEREVISIAE</i> COM OS RESULTADOS DE ABSORBÂNCIA OBTIDOS PARA CADA CONCENTRAÇÃO.....	72
FIGURA 12: PORCENTAGEM <i>S. CEREVISIAE</i> IMOBILIZADA PARTINDO-SE DE UMA SUSPENSÃO DE LEVEDURA NA CONCENTRAÇÃO 1 %. RESULTADOS AVALIADOS ENTRE A PORCENTAGEM DE LEVEDURAS IMOBILIZADAS POR MG DE BAGAÇO EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE BAGAÇO (MG) EM SOLUÇÃO UTILIZADA NOS ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO.	73
FIGURA 13: GRÁFICO DA PORCENTAGEM DE IMOBILIZAÇÃO DE SUSPENSÕES ESTOQUE DE LEVEDURA À 0,25, 0,5 E 1% EM 10 MG.ML DE BAGAÇO. VALORES EXPRESSOS EM PORCENTAGEM POR MG DE BAGAÇO NA SOLUÇÃO.	74
FIGURA 14: VARREDURA ESPECTRAL DAS CONCENTRAÇÕES DE 20, 40, 60, 80 E 100 µG.ML ⁻¹ DO CORANTE ACID BLACK 48 NO PH 2,50. ABSORBÂNCIA ^{663NM} = 0,00272 +	

0,004421*CONC DO CORANTE. RESULTADOS OBTIDOS EM CUBETA DE QUARTZO COM CAMINHO ÓPTICO DE 0,5 CM.	76
FIGURA 15: PORCENTAGEM DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE AB48 EM PH 2,50 APÓS O CONTATO COM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR TRATADO COM PEI, ÁGUA DESTILADA E NAOH POR 120MIN À 30°C. ABSORBÂNCIA $^{663\text{NM}} = 0,00272 + 0,004421*\text{CONC DO CORANTE}$. RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO-SE CUBETA DE QUARTZO COM CAMINHO ÓPTICO DE 0,5 CM.	78
FIGURA 16: PORCENTAGEM DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ACID BLACK 48 EM PH 4,50 APÓS O CONTATO COM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR TRATADO COM PEI, ÁGUA DESTILADA E NAOH POR 120MIN À 30°C. RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO-SE CUBETA DE QUARTZO COM CAMINHO ÓPTICO DE 0,5 CM.	79
FIGURA 17: PORCENTAGEM DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ACID BLACK 48 EM PH 6,50 APÓS O CONTATO COM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR TRATADO COM PEI, ÁGUA DESTILADA E NAOH POR 120MIN À 30°C. RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO-SE CUBETA DE QUARTZO COM CAMINHO ÓPTICO DE 0,5 CM.	80
FIGURA 18: PORCENTAGEM DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ACID BLACK 48 EM PH 2,50 APÓS O CONTATO COM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> IMOBILIZADA EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR TRATADO COM PEI, ÁGUA DESTILADA E NAOH POR 120MIN À 30°C. RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO-SE CUBETA DE QUARTZO COM CAMINHO ÓPTICO DE 0,5 CM.	82
FIGURA 19: DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ACID BLACK 48 EM PH 2,50, 4,50 E 6,50 APÓS O CONTATO COM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> LIVRE POR 120MIN À 30°C. RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO-SE CUBETA DE QUARTZO COM CAMINHO ÓPTICO DE 0,5 CM.	83
FIGURA 20: COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE BIOSSORTIVA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR TRATADO COM POLIETILENOIMINA, SOLUÇÃO DE LEVEDURA 1%, <i>S. CEREVISIAE</i> IMOBILIZADA EM BAGAÇO DE CANA TRATADO COM PEI E A SOLUÇÃO INICIAL DO CORANTE. TESTES REALIZADOS NO PH 2,50 E APÓS O PERÍODO DE 2 HORAS.	86
FIGURA 21: VARREDURA DO CORANTE ACID BLACK 48, NA CONCENTRAÇÃO DE $100\mu\text{G.ML}^{-1}$, COM INDICAÇÕES DOS PICOS DE COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO E SECUNDÁRIO NO PH 2,50 E. LEITURA EM ESPECTROFOTÔMETRO UV-VIS COM CUBETA DE QUARTZO DE CAMINHO ÓPTICO DE 5MM.	87

FIGURA 22: TESTE DE KRUSKAL-WALLIS (MÉTODO DE DUNN). COMPARAÇÕES DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA RELATIVA A^{663}/A^{413} APÓS O CONTATO DE <i>S. CEREVISIAE</i> LIVRE E IMOBILIZADA COM O CORANTE ACID BLACK 48. GRAUS DE LIBERDADE = 2, $p=0,0002$	88
FIGURA 23: ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DO CORANTE ACID BLACK 48 EM SOLUÇÃO AQUOSA NO PH 2,50, APÓS A INTERAÇÃO COM <i>S. CEREVISIAE</i> IMOBILIZADA EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR À UMA TEMPERATURA DE 30°C. VARREDURAS AVALIADAS APÓS 48, 120 E 216 HORAS.	88
FIGURA 24: ABSORBÂNCIAS DOS GRUPOS CROMÓFORO (663NM) E SECUNDÁRIO (413NM) E OS VALORES DE ABSORBÂNCIA RELATIVA A CADA 24 HORAS, APÓS O CONTATO DO CORANTE COM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> IMOBILIZADA COM BAGAÇO DE CANA TRATADO COM PEI.	89
FIGURA 25: ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DO CORANTE ACID BLACK 48 EM SOLUÇÃO AQUOSA NO PH 2,50, APÓS A INTERAÇÃO COM <i>S. CEREVISIAE</i> LIVRE EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR À UMA TEMPERATURA DE 30°C. VARREDURAS AVALIADAS APÓS 48, 120 E 216 HORAS.	90
FIGURA 26: ABSORBÂNCIAS DOS GRUPOS CROMÓFORO (663NM) E SECUNDÁRIO (413NM) E OS VALORES DE ABSORBÂNCIA RELATIVA A CADA 24 HORAS, APÓS O CONTATO DO CORANTE COM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> LIVRE.	91
FIGURA 27: ESPETRO DO CORANTE ACID BLACK 48 NA REGIÃO DE 4000 À 400 cm^{-1} ATRAVÉS DA LEITURA DE PASTILHAS ELABORADAS COM KBr.	93
FIGURA 28: ESPECTRO DO CORANTE ACID BLACK 48 NA REGIÃO DE 4000 À 400 cm^{-1} APÓS O CONTATO POR 24H COM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR TRATADO COM POLIETILENOIMINA E SOMENTE POLIETILENOIMINA. LEITURA NA FORMA DE PASTILHAS NA PROPORÇÃO DE 1 MG DE AMOSTRA (PESO SECO) PARA 149 MG DE KBr.	96
FIGURA 29: ESPETRO DO CORANTE ACID BLACK 48 NA REGIÃO DE 2000 À 400 cm^{-1} APÓS 72 HORAS DE CONTATO COM <i>S. CEREVISIAE</i> LIVRE E IMOBILIZADA EM BAGAÇO DE CANA. LEITURA NA FORMA DE PASTILHAS NA PROPORÇÃO DE 1 MG DE AMOSTRA (PESO SECO) PARA 149 MG DE KBr.	98
FIGURA 30: ESPETRO DO CORANTE ACID BLACK 48 NA REGIÃO DE 2000 À 400 cm^{-1} APÓS 144 HORAS DE CONTATO COM <i>S. CEREVISIAE</i> LIVRE E IMOBILIZADA EM BAGAÇO DE CANA. LEITURA NA FORMA DE PASTILHAS NA PROPORÇÃO DE 1 MG DE AMOSTRA (PESO SECO) PARA 149 MG DE KBr.	101

FIGURA 31: ESPETRO DO CORANTE ACID BLACK 48 NA REGIÃO DE 2000 À 400 cm^{-1} APÓS 240 HORAS DE CONTATO COM <i>S. CEREVISIAE</i> LIVRE E IMOBILIZADA EM BAGAÇO DE CANA. LEITURA NA FORMA DE PASTILHAS NA PROPORÇÃO DE 1 MG DE AMOSTRA (PESO SECO) PARA 149 MG DE KBr.	103
FIGURA 32: POSSÍVEIS MOLÉCULAS FORMADAS A PARTIR DO CORANTE ACID BLACK 48 NOS PROCESSOS DEGRADATIVOS UTILIZANDO-SE <i>S. CEREVISIAE</i>	104

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1: CLASSIFICAÇÃO DE CORANTES DE ACORDO COM O USO.....	40
QUADRO 2: CARACTERÍSTICAS IDEAIS DESEJÁVEIS PARA A MATRIZ OU SUPORTE SELECIONADO PARA IMOBILIZAR CÉLULAS MICROBIANAS.	48
TABELA 1: QUANTIDADE DE SOLUÇÃO ESTOQUE DE ACID BLACK 48 E ÁGUA DESTILADA NO PH 2,50, 4,50 E 6,50 PARA A OBTENÇÃO DA RETA PADRÃO E GRÁFICO DE VARREDURA DO CORANTE.	62
TABELA 2: VALORES DE PORCENTAGEM DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR PARTINDO-SE DE UMA SOLUÇÃO DE LEVEDURA À 0,25, 0,5 E 1% EM CONTATO COM 2, 4, 6, 8 E 10MG DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR TRATADO COM PEI, NaOH E ÁGUA DESTILADA.	75
TABELA 3: DADOS DA RETA PADRÃO DE AB48 NOS VALORES DE PH 2,50, 4,50 E 6,50..	76
TABELA 4: VALORES DE PESO SECO OBTIDOS APÓS OS ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO COM BAGAÇO TRATADO COM ÁGUA DESTILADA, PEI E NaOH. OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS COMPARANDO-SE OS VALORES DE PESO ÚMIDO INICIAIS.	77
TABELA 5: CAPACIDADE ADSORTIVA DO BAGAÇO DE CANA TRATADO, <i>SACCHAROMYCES</i> <i>CEREVISIAE</i> IMOBILIZADA EM BAGAÇO DE CANA TRATADO E <i>SACCHAROMYCES</i> <i>CEREVISIAE</i> LIVRE PARTINDO-SE DE UMA SOLUÇÃO INICIAL DE CORANTE ACID BLACK 48 DE 100 $\mu\text{G} \cdot \text{ML}^{-1}$. RESULTADO OBTIDO A PARTIR DE 6 MG DOS DIFERENTES ADSORVENTE E EXPRESSO EM μG DE CORANTE POR MG DE BAGAÇO.	84
TABELA 6: BANDAS CORRESPONDENTES AO ACID BLACK 48 CONTROLE E SUAS RESPECTIVAS IDENTIFICAÇÕES NA LITERATURA.....	93

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	33
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. Objetivo Geral	36
2.2. Objetivos Específicos	36
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	37
3.1. Corantes têxteis.....	37
3.2. Classificação de Corantes Têxteis:	38
3.3. A indústria têxtil no Brasil.....	41
3.4. Efluente de indústria têxtil.....	42
3.5. Impactos ambientais do efluente têxtil:	43
3.6. Métodos de adsorção	44
3.7. Bagaço de cana como adsorvente	45
3.8. Imobilização celular.....	46
3.9. Tratamento do Suporte para Imobilização Celular	49
3.9.1. Polietilenoimina (PEI)	49
3.9.2. NaOH.....	50
3.10. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
3.11. Biossorção	51
3.12. Biodegradação.....	52
3.13. Análises de Degradação em FTIR.....	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1. Equipamentos.....	55
4.2. Preparo do bagaço de cana de açúcar	55
4.3. Tratamento do bagaço de cana de açúcar	56
4.3.1. Tratamento com polietilenoimina.....	56

4.3.2. Tratamento com hidróxido de sódio (NaOH).....	56
4.3.3. Tratamento com água destilada	56
4.4. Determinação da quantidade de sacarose remanescente no bagaço de cana de açúcar.....	57
4.5. Suspensão de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
4.6. Reta padrão de suspensão de levedura	59
4.7. Ensaios de imobilização	59
4.7.1. Determinação das melhores taxas de imobilização	59
4.7.2. Cálculo de imobilização celular	60
4.8. Solução corante.....	61
4.8.1. Corante Acid Black 48	61
4.8.2. Preparo da solução estoque de Acid Black 48.....	61
4.8.3. Determinação da reta padrão de Acid Black 48 e teste de estabilidade do pH	61
4.9. Preparo dos testes de remoção do corante	62
4.9.1. Teste apenas com bagaço de cana tratado	62
4.9.2. Testes com <i>S. cerevisiae</i> imobilizada	63
4.9.3. Testes com <i>S. cerevisiae</i> livre.....	64
4.10. Testes de remoção do corante.....	65
4.11. Análise de resultados após os testes de remoção do corante.....	65
4.11.1. Cálculo da concentração remanescente	66
4.11.2. Cálculo da porcentagem de descoloração.....	66
4.11.3. Cálculo de capacidade adsortiva.....	66
4.12. Testes de biodegradação do corante	67
4.12.1. Preparo das amostras de biodegradação do corante com células livres	67
4.12.2. Preparo das amostras de biodegradação do corante com células imobilizadas.....	67
4.12.3. Condições para os testes de degradação de Acid Black 48	67

4.13. Análise dos testes de biodegradação do corante.....	68
4.13.1. Análise por espectrofotômetro UV-Vis.....	68
4.13.2. Análise por espectrofotômetro FT-IR.....	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1. Análises da determinação de sacarose remanescente no bagaço de cana.....	69
5.1.1. Determinação da reta padrão de concentração remanescente de açúcares.....	69
5.1.2. Avaliação de sacarose após o tratamento do bagaço de cana.....	71
5.2. Análise da reta padrão de suspensão de leveduras.....	72
5.3. Determinação das melhores taxas de imobilização celular.....	72
5.4. Reta padrão do corante Acid Black 48	75
5.5. Determinação dos valores de peso seco após a imobilização	77
5.6. Testes de remoção do corante	77
5.6.1. Teste apenas com bagaço de cana tratado	77
5.6.2. Testes Com <i>S. cerevisiae</i> imobilizada	81
5.6.3. Testes com <i>S. cerevisiae</i> livre.....	83
5.6. Cálculos de capacidade adsortiva	84
5.7. Análise dos testes de biodegradação do Corante.....	86
5.7.1. Análise por espectrofotômetro UV-Vis.....	86
5.7.2 Análise por espectrofotômetro FT-IR	92
6. CONCLUSÕES.....	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

1. INTRODUÇÃO

Até o século XX todos os corantes eram naturais, derivados de folhas, ramos, raízes, frutos, flores, substâncias extraídas de animais e de minerais. A partir do isolamento do primeiro corante sintético em 1853, esta nova classe de corantes foi adquirindo cada vez mais o seu espaço no mercado (CHRISTIE, 2001).

Com a revolução industrial ocorreu o crescimento do setor têxtil, o qual consome uma grande quantidade de água no processo de tingimento e acabamento, utilizando uma ampla variedade de corantes sintéticos. No decorrer dos anos o consumidor se tornou cada vez mais exigente em relação à tonalidade de cores, resistência à luz e lavagem, o que resultou na síntese de uma grande variedade de corantes.

Estes corantes podem variar desde compostos inorgânicos, polímeros e compostos orgânicos. Embora os corantes estejam presentes em pequena quantidade nos efluentes, uma pequena concentração destes compostos já pode gerar uma poluição altamente visível e indesejável. Esta poluição, resultante das perdas ocorridas durante os processos de fixação da tintura nos tecidos, em concentrações tão baixas como 1 mg.L^{-1} de corante já pode ser visivelmente observada (FERRAZ, 2008). Em geral, os corantes não são facilmente removíveis através dos processos tradicionais de tratamento de efluentes e possuem efeitos mutagênicos e carcinogênicos.

O tratamento convencional de efluentes, o qual se baseia principalmente na biodegradação aeróbica, possui uma baixa capacidade na remoção de corantes. Os efluentes têxteis contêm alto teor de corantes e compostos orgânicos que causam sérios problemas de poluição à vida aquática em lagos, rios e mares. Sendo que, estes corantes têm sua remoção difícil dos efluentes por serem estáveis a luz, ao calor e biologicamente não degradáveis.

Nos sistemas aquáticos, os corantes promovem uma alteração na atividade fotossintética dos vegetais já que impedem a penetração da radiação solar. Com a crescente preocupação com o meio ambiente, sistemas de tratamentos para águas contaminadas têm sido estudados. Atualmente, estes tratamentos têm-se baseado na perspectiva de reuso, recuperação e reciclagem do efluente tratado, pois, além de beneficiar o meio ambiente, reduz também os custos industriais (PERUZZO, 2003).

Dentre os processos de remoção de corantes, a adsorção tem sido considerada superior à outras técnicas, sendo a mais utilizada no setor industrial. A adsorção consiste em um processo de transferência de massa do tipo sólido-fluído na qual se explora a capacidade de certos sólidos em concentrar na sua superfície determinadas substâncias existentes em soluções líquidas ou gasosas, o que permite separá-las dos demais componentes dessas soluções (LEAL et al., 2010). Já que os componentes que são adsorvidos se concentram na superfície externa do sólido, quanto maior a superfície de contato melhor será a capacidade de adsorção. A grande vantagem deste processo também é a possibilidade de recuperação do corante na forma concentrada e a reutilização do adsorvente (KIMURA et al, 1999). Nos últimos anos, a atenção tem sido direcionada para vários materiais sólidos naturais que são capazes de remover poluentes de água contaminada a um baixo custo (ROYER, 2008). Dentre estes, o bagaço de cana é um dos materiais mais promissores.

Na moagem da cana-de-açúcar, vários resíduos são obtidos e dentre eles tem-se o bagaço (OLIVEIRA et al., 2006). Com o passar dos anos têm se gerado uma quantidade maior de bagaço devido à expansão da área cultivada de cana de açúcar. O bagaço resultante da exploração da cana pode ser queimado para gerar o processo de calor nas caldeiras, no entanto, acaba sobrando de 37 a 50 kg por tonelada de cana moída (CARDOSO, 2006).

Os métodos químicos e físicos, no qual se inclui a adsorção, são muito eficientes na remoção de corantes, porém resulta na formação de grandes quantidades de lodo. Sendo assim, tem sido proposto na literatura o uso de sistemas integrados, incluindo processos químico, físicos e biológicos, para aumentar a eficiência nos processos de biodegradação e bioissorção (LU e LIU, 2010).

Os processos de descoloração de corantes têxteis utilizando métodos biológicos ocorrem de duas maneiras: por adsorção/bioissorção ou por biodegradação (OGUGBUE e SAWIDIS, 2011). A bioissorção é um fenômeno que pode ocorrer em biomassa viva ou morta. O processo de bioissorção envolve interações físico-químicas entre a superfície celular e os corantes através de difusão passiva (DIAS et al., 2010). Apesar da grande maioria dos trabalhos de descoloração de corantes têxteis envolverem apenas técnicas de bioissorção, nas últimas décadas uma série de microrganismos tem sido isolados para a biodegradação. A biodegradação ocorre através de enzimas produzidas por alguns microrganismos, sendo que apesar de existir uma gama enorme de enzimas, apenas as oxi-redutivas são capazes de degradar corantes. Estes microrganismos liberam estas enzimas no meio para que esta quebre a molécula do corante (CHACKO e SUBRAMANIAM, 2011).

A imobilização celular surgiu como uma alternativa à imobilização enzimática, já que não requer de etapas de extração, isolamento e purificação. A imobilização celular apresenta inúmeras vantagens no processo de bioissorção e biodegradação, entre elas a reutilização das células imobilizadas, alta resistência mecânica permitindo que os processos metabólicos se realizem em condições adversas de pH, de esterilidade e agitação (COVIZZI, 2007).

Em busca de melhorar os processos de tratamento de corantes têxteis, este trabalho consiste em buscar alternativas de baixo custo para a biodegradação e bioissorção de corantes têxteis. Para esta finalidade, se propôs a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em bagaço de cana ativado para promover a bioissorção e biodegradação do corante Acid Black 48 em solução aquosa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar os processos de biossorção e biodegradação do corante Acid Black 48 utilizando *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bagaço de cana tratado.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o tratamento do bagaço com polietilenoimina, NaOH e água destilada para a imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* e determinar a quantidade de sacarose remanescente no bagaço.
- Estabelecer a concentração ótima de suspensão de leveduras para as maiores taxas de imobilização celular.
- Analisar através de varreduras espectrais os processos de biossorção/adsorção do bagaço tratado, células de levedura imobilizadas e células livres.
- Determinar a ocorrência de biodegradação do corante por meio de análises em espectrofotômetro UV-Vis e FT-IR utilizando *Saccharomyces cerevisiae* na forma livre e imobilizada em bagaço de cana tratado.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Corantes têxteis

Acredita-se que os mecanismos de coloração tenham sido originados nos tempos Neolíticos, algo em torno de 4000 a 6000 anos atrás (WARNING e HALLAS, 1994). Estes primeiros corantes eram obtidos de recursos naturais como plantas, insetos, conchas, e passavam por operações bastante complexas, percorriam enormes distâncias para serem comercializados e demandavam de muito tempo de dedicação (BIER e DUSENBURY, 2007). Até então, os dois corantes naturais mais valiosos eram o Madder e o Indigo, sendo que a criação de corantes sintéticos equivalentes a estes seria um grande passo para a indústria têxtil. Porém, somente em 1853, no Royal College of Chemistry, em Londres, o britânico W. H. Perkin isolou o Mauve, o primeiro corante sintético a ser comercialmente produzido e utilizado. A aplicação do Mauve na seda, lã e no algodão, junto com o descobrimento da reação diazo por Jhoann P. Greiss estimulou um enorme interesse na preparação de corantes sintéticos principalmente na Inglaterra, Alemanha e Suíça (HUNGER, 2003).

O primeiro pesquisador a interpretar a cor dos corantes em termos de sua composição molecular foi o químico alemão Otto N. Witt em 1876. Até esta época os químicos estruturais já haviam estudado todos os grupos funcionais e Witt considerou que a molécula do corante poderia ser dividida em três componentes principais. Um dos componentes seria o benzeno, ou benzenos fundidos, anéis, e a estes estariam ligados grupos simples insaturados, $-C=O$, $-N=N$, $-NO_2$ (os quais ele chamara de cromóforos), e auxocromos, como $-NH_2$; $-OH$. A presença destas três unidades produziria a coloração intensa (CHRISTIE, 2001).

3.2. Classificação de Corantes Têxteis:

Até meados do século XIX, poucas publicações se baseavam na classificação dos corantes naturais disponíveis. Com a introdução dos corantes sintéticos, um grande número de publicações surgiu, nas quais os corantes eram classificados por nome e em alguns casos pela sua estrutura química. Todas estas classificações foram catalogadas apenas em 1924, quando houve a primeira publicação do Colour Index (CI) (WARNING e HALLAS, 1994). Estes corantes podem ser classificados de acordo com a sua constituição, estrutura química, ou na sua aplicação e uso. De acordo com Warning e Hallas (1994), existem vários tipos de classificação de corantes, sendo que o mais apropriado refere-se a classificação de acordo com a estrutura química do corante. Porém, algumas classes de corantes de acordo a aplicação também são bastante representativos na literatura como em Zollinger, (1991) e Cheng et al. (1991). Os principais grupos de corantes de acordo com a aplicação segundo a literatura (CHENG et al., 1991; CHRISTIE, 2001; DOS SANTOS et al., 2007; GUARATINI e ZANONI, 2000; IQBAL, 2008; LAING et al., 1991; MARCANTI-CONTATO, 1995; WARNING e HALLAS, 1994) são:

- a) Corantes Ácidos: corantes que são solúveis em água e que possuem um ou mais grupos ácidos sulfônicos ou carboxílicos em suas moléculas. Quimicamente se constituem de compostos azo, antraquinonas e triarilmetanos em compostos azina, xanteno iminocetona, nitro, nitroso e quinoline.
- b) Corantes Básicos: são corantes solúveis em água que produzem cátions coloridos em solução, suas principais classes químicas são azo, antraquinona,

- triarilmetano, metano, thiazine, oxazine, acridina e quinona. Alguns destes corantes básicos podem ser utilizados na medicina como antissépticos.
- c) Corantes Diretos: são conhecidos por não terem tanta afinidade com as fibras celulósicas assim como os corantes ácidos e básicos. São corantes aniônicos e solúveis em água quando na presença eletrólitos, aumentando sua afinidade com as fibras. Seu principal uso é no tingimento de algodão e celulose regenerada, papel, couro e em maior extensão para nylon.
 - d) Corantes Dispersos: são denominados também de corantes não-iônicos. Esta classe de corantes inclui corantes insolúveis em água os quais podem ser aplicados principalmente em fibras hidrofóbicas de dispersão aquosa, assim como o poliéster. Os corantes dispersos também podem ser aplicados em nylon, diacetato de celulose e fibras acrílicas.
 - e) Corantes Reativos: constituem de compostos que contém um ou mais grupos reativos capazes de formarem uma ponte covalente com a fibra, através dos átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre que podem estar presentes nestas fibras.
 - f) Corantes Sulforosos: é um grupo pequeno de corantes cuja característica principal é a presença de enxofre na sua molécula. Devido a seu baixo custo e suas boas propriedades de fixação, esta classe se torna importante do ponto de vista econômico.
 - g) Corantes de Cuba (Vat Dyes): este nome provém do significado de usar processos de fermentação naturais em cuba para produzir as condições necessárias em que o corante se torne solúvel em água. Estes são aplicados principalmente em fibras celulósicas como sais leuco-solúveis após redução em banho alcalino, em que normalmente é utilizado o hidrossulfito de sódio. As principais classes são antraquinona e índigo.
 - h) Corantes Azóicos: constituem a classe mais importante dos corantes e correspondem a 50% de todos os corantes comercializados. Estes corantes contém pelo menos um grupo azóico ($-N=N-$), monoazos, os mais comumente encontrados, mas podem conter dois (diazos), três (triazos) e até quatro (tetrazos).
 - i) Antraquinonas: corresponde a segunda classe mais importante de dos corantes. Estes também são um dos mais antigos tipos de corantes sendo datados em mais de 4000 anos atrás. Em contraste com os corantes azóicos, os quais não possuem

partes naturais, todos os corantes naturais vermelhos são antraquinonas (CHRISTIE, 2001).

- j) Corantes Mordentes: se refere a uma classe de corantes que é aplicada nas fibras junto com um mordente metálico. Os corantes mordentes, contendo os grupos (-OH, -COOH), são capazes de formar um complexo estável com o íon cromo dentro da fibra (WARNING e HALLAS, 1994).

Além da classificação de acordo com a aplicação, uma outra utilizada é a de acordo com o uso (Quadro 1).

Quadro 1: Classificação de Corantes de acordo com o uso.

Classe	Principais Substratos	Método de Aplicação	Observações
Acid	Nylon, lã, seda, papel, tintas e couro.	Geralmente através de banhos neutros e ácidos.	Este grupo de corantes é muito importante para a lã de fibras de proteínas. Os corantes premetalizados mais importantes são membros desta classe.
Azo-Corantes	Algodão, raíom, acetato de celulose, poliéster, papel e tintas.	A fibra é impregnada de componentes de acoplamento com uma solução de sal diazo estabilizada.	Tingimento e impressão em tons rápidos.
Básicos	Acrílico, nylon modificado e papel de poliéster, e tintas.	A aplicação se dá com banhos ácidos do corante.	Conhecidos como corantes catiônicos com rendimento de tons brilhantes intensos, porém fugaz à luz.
Diretos	Algodão, raíom, papel, couro e nylon.	Aplicação com banhos neutros ou ligeiramente alcalinos contendo eletrólitos adicionais.	Classe de corante bastante importante.
Dispersos	Poliéster, poliamidas, acetato de celulose, acrílicos e plásticos.	Bem preparadas, dispersões aquosas são normalmente aplicadas com altas temperaturas, pressão, ou métodos de transporte de baixas temperaturas, o corante pode ser	Novo ramo de corantes para fibras sintéticas em crescimento.

		preenchido no pano, ou cozido em termo-fixo.	
Branqueadores óticos	Sabão, detergentes, todas as fibras, óleos, pinturas e plásticos.	A partir de uma solução de dispersão ou uma suspensão em uma massa.	
Reativo	Algodão, raiom, lã, seda e nylon.	O sítio reativo no corante reage com o grupo funcional da fibra para ligar o corante covalentemente sob influência de calor e pH apropriado.	Gruda quimicamente com a fibra.
Sulfônicos	Algodão e raiom.	Substratos aromáticos avaliados com sulfeto de sódio e reoxidado a sulfato insolúvel contendo produtos das fibras.	Preto sulfúrico pertence a este grupo.
Cuba	Algodão, raiom e lã.	Corantes insolúveis em água, solubilizados por redução do sulfeto de sódio hidratado e logo esgotado na fibra e reoxidado.	Caracterizado pela alta rapidez especialmente em antraquinóides – mais valorizados para o tingimento e impressão em algodão.
Cuba Solubilizado	Algodão, lã, celulose, fibras de proteína de seda.	A fibra impregnada quando tratada com um agente oxidado geralmente ácido sulfúrico e nitrito de sódio para dicromato de algodão e seda; portanto, não há a interação de grupos alcalinos. Esta classe é aplicada para celulose e fibras de proteína.	Tingimento, impressão e lã em tons rápidos.

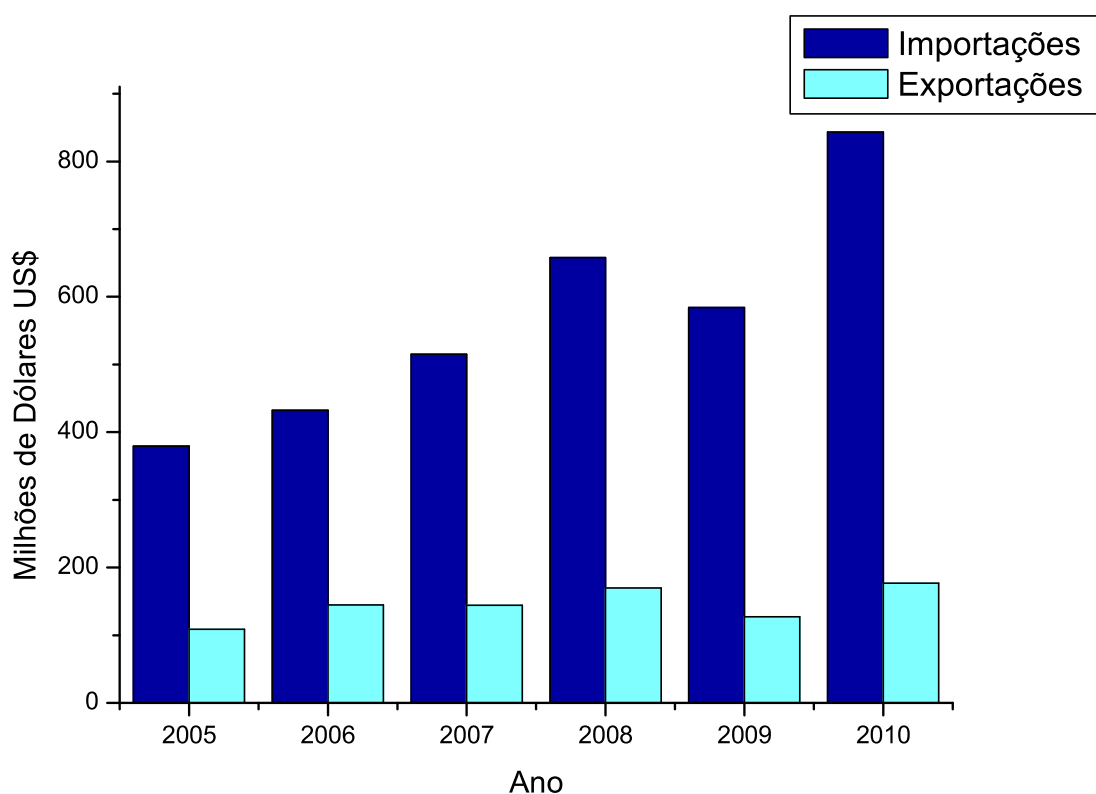
Fonte: (SANDHYA, 2010).

3.3. A indústria têxtil no Brasil

O setor têxtil hoje no Brasil é formado por aproximadamente 30.000 empresas entre elas empresas de fiação, tecelagens, malharias, estamparias, tinturarias e confecções. O Brasil é o sexto maior produtor têxtil do planeta, ocupando o segundo lugar na produção de denim. O setor têxtil de confecções é um dos que mais emprega no

país, sendo o segundo maior empregador da indústria de transformação da qual representa 18,6 % do produto interno bruto (ABIT, 2012).

As importações de corantes, pigmentos e branqueadores ópticos no Brasil teve um aumento de 400 milhões de dólares de 2005 a 2010 (Figura 1). Neste, mesmo período as exportações brasileiras aumentaram apenas 68 milhões de dólares (ABIQUM, 2012). Em 2012, a indústria têxtil e de confecção prevê crescimento de 1,5% em volume de produção e faturamento de US\$ 63 bilhões (ABIT, 2012).



FONTE : (ABIQUM, 2012)

Figura 1: Importações e Exportações Brasileiras no Setor de Corantes, Pigmentos e Branqueadores Ópticos, de 2005 a 2010.

3.4. Efluente de indústria têxtil

As indústrias têxteis consomem grandes quantidades de água e produtos químicos, em especial nos processos de tingimento e acabamento. Em média, de 60 a 90% do consumo de água total é gasto na lavagem (DANESHVAR et al., 2004). No Brasil, aproximadamente 20 t.ano⁻¹ de corantes são consumidas pelas indústrias têxteis,

e de 5 a 20%, dependendo do tipo de corante utilizado, são descartados como efluentes, devido à incompleta fixação do corante ao tecido (DALLAGO et al, 2005).

Os reagentes químicos usados pelas indústrias têxteis são muito diversos em composição química, desde compostos inorgânicos a compostos poliméricos. O Colour Index listou mais de 8000 produtos químicos que são usados somente no processo de tingimento de tecidos, entre eles várias classes de corantes, detergentes, ácidos, álcalis, sais, solventes e outros auxiliares (MISHRA e TRIPATHY, 1993).

A cor forte é a característica mais notória do efluente têxtil e por isso muitos processos tem sido estudados para a sua remoção. O tratamento biológico por lodo ativado oferece alta eficiência na remoção de compostos orgânicos, mas não é eficiente na eliminação de cores. Um dos maiores problemas no tratamento destes efluentes, atualmente, é a remoção de corantes solúveis, estes que apresentam uma baixa capacidade de serem adsorvidos nos processos de tratamento convencionais (SANIN, 1997).

Devido a uma grande variedade de compostos que formam os corantes têxteis, e consequentemente uma maior variedade nos compostos que podem ser encontrados no efluente têxtil, surge uma preocupação constante em desenvolver processos direcionados a introdução de tratamentos mais eficientes. Estudos mais recentes propõem o uso de combinações de processos para obtenção de melhores resultados (MARCHETTO e FILHO, 2005; SOLMAZ *et al.*, 2007).

3.5. Impactos ambientais do efluente têxtil:

O grau de intensidade de impacto de efluentes depende principalmente de sua demanda bioquímica e química de oxigênio e do oxigênio dissolvido nos corpos d'água. Sendo assim, os compostos químicos presentes no efluente têxtil esgotam o oxigênio dissolvido e aumentam a demanda bioquímica de oxigênio, podendo interferir na fisiologia respiratória de peixes e resultando em uma alta taxa de mortalidade (MUTHUKUMAR et al, 2005). Nos sistemas aquáticos, os corantes promovem uma alteração na atividade fotossintética dos vegetais já que estes impedem a penetração da radiação solar.

Apesar de pouco difundidas as informações sobre os riscos da contaminação por corantes e o impacto causado pelos seus rejeitos na qualidade da água e em

ecossistemas aquáticos, sabe-se que esses compostos podem permanecer por cerca de 50 anos na biota terrestre e aquática, pondo em risco a estabilidade desses ecossistemas e a vida em seu entorno (GUARATINI e ZANONI, 2000).

Do ponto de vista toxicológico, devido a sua alta solubilidade em água, os corantes têxteis podem ser absorvidos por uma variedade de organismos. Sabe-se que os corantes mais tóxicos são encontrados no grupo diazo e nos corantes catiônicos. Pigmentos e corantes de cuba têm uma baixa toxicidade possivelmente devido a sua baixa solubilidade em água e sistemas lipofílicos (ZOLLINGER, 1991). Os corantes reativos e ácidos assim como reagem com fibras naturais também podem reagir com proteínas e a própria celulose nos vegetais.

Dentre os processos de degradação dos corantes têxteis, cabe destacar que a grande maioria resulta na quebra da estrutura química do corante resultando em substâncias ainda mais nocivas à biota aquática e aos seres humanos (MARCANTI-CONTATO, 1991). Segundo Royer (2008), apesar dos riscos de dermatites, o maior risco se dá pela ingestão oral destes compostos. Isto por que, se os corantes forem catalisados por enzimas específicas do organismo, podem gerar substâncias tais como as aminas aromáticas, com propriedades carcinogênicas e mutagênicas.

Os impactos ambientais ocasionados em células vegetais tem sido muito estudado na literatura. Em Poonkuzhall et. al (2011), realizaram testes de toxicidade com *Allium cepa* após a descoloração do corante Reactive Blue 198 com lacase e observaram que o crescimento das raízes está diretamente relacionado com a concentração de corante utilizada. Outros testes de citotoxicidade com *Allium cepa* foram realizados por Jadhav et al. (2010) com Reactive Orange 16. Estes autores identificaram que houve uma grande incidência de células defeituosas após o contato com o corante em todas as concentrações avaliadas.

3.6. Métodos de adsorção

A adsorção é um processo de transferência de massa do tipo sólido-líquido em que se explora a propriedade de alguns sólidos em concentrar na sua superfície determinadas substâncias presentes em soluções líquidas ou gasosas, o que permite separá-las dos demais componentes dessas soluções (LEAL et al., 2010). Os tratamentos por adsorção são os mais aplicados industrialmente, pois associam baixo custo e elevadas taxas de remoção (GUARATINI e ZANONI, 2000). Além disto, em

alguns casos, por não se tratar de um método destrutivo, possibilita a recuperação do corante sem perda de sua identidade química. Segundo Marcanti-Contato et al. (1995), a descoloração do efluente é o resultado de dois mecanismos, a adsorção e a troca iônica (sítios com cargas no adsorvente). Esta descoloração também é influenciada por fatores físico-químicos, tais como a interação entre adsorbato e o adsorvente, área superficial do adsorvente, tamanho da partícula, tamanho de poros do adsorvente, temperatura, acidez da solução do adsorbato, pH e tempo de contato entre o corante e o adsorvente

A adsorção pode ser realizada através de compostos naturais ou sintéticos. Um dos compostos industrialmente mais utilizados é o carvão ativado. Carvão ativado é ainda um dos adsorventes mais utilizados na remoção de impurezas de gases e líquidos devido a sua alta capacidade de adsorção. O carvão ativado tem uma estrutura porosa bem desenvolvida e a alta capacidade de adsorção está associada principalmente com a distribuição de tamanho de poros, área superficial e volume de poros (SOARES, 1998). Porém, o carvão ativado apresenta inúmeras desvantagens, tais como alto custo, ineficiência com alguns tipos de corantes e em alguns casos existe certa dificuldade no processo de regeneração com provável perda de adsorvente (CHUN e YIZHONG, 1999). Como uma alternativa para substituir o carvão ativado, atualmente procura-se por outros adsorventes constituídos de materiais sólidos preferencialmente naturais. Estes materiais devem estar em abundância na natureza e se possível serem provenientes de resíduos agrícolas ou industriais para diminuir o custo das técnicas de adsorção. O uso de argilas naturais, bagaço de cana e espiga de milho como adsorventes foi estudado em McKay et al. (1996) e mostraram-se economicamente atraentes para a remoção de cor em soluções aquosas. Estes adsorventes naturais foram recomendados como efetivos e baratos. Portanto, a regeneração do adsorvente após a saturação não seria necessária, uma vez que a utilização destes materiais é de baixo custo. Uma série de materiais tem sido estudada como adsorventes de corantes têxteis, tais como: folhas de piracanta (AKAR et al. 2010), sementes de pimenta (AKAR et al. 2011) e casca de laranja (BIBI et al, 2011).

3.7. Bagaço de cana como adsorvente

A cana-de-açúcar, originária da Índia, chegou ao Brasil em 1522 e, atualmente, é explorada em quase todo o país (ZAMBELLO, 1983). Esta monocultura apresenta 5,4

milhões de hectares cultivados, sendo o Brasil considerado o maior produtor mundial e o país com maior potencial de expansão em área plantada (REIS JR e MONNERAT, 2002). A safra de cana de açúcar em 2011/2012 teve uma diminuição de 5,6% em relação à safra passada, devido a uma seca intensa no final de 2011. Porém, ainda assim a produção atingiu 588,9 milhões de toneladas e houve um aumento de 4,7% na área plantada. O estado de São Paulo possui 4.46 milhões de hectares de cultivo de cana, o que representa 53% de toda área plantada com esta cultura em todo Brasil (CONAB, 2012).

Estima-se que, além da quantidade de bagaço processado e utilizado para alimentar caldeiras, haja um excedente de bagaço de cana-de-açúcar correspondente a 8% nas destilarias anexas e 12% nas autônomas, que poderia ter outros destinos, inclusive ser empregado de forma a melhorar a qualidade do meio ambiente (AGUIAR e MENEZES, 2002). Sendo assim, a grande disponibilidade e o excedente de bagaço de cana gerado pelas indústrias canavieiras fazem com que esta seja uma fonte natural e de baixo custo para remoção de corantes têxteis.

O bagaço de cana possui uma composição de 50% de celulose, 27% polioses e 23% de lignina (MARTÍN-LARA et al., 2010). Devido a sua composição, o bagaço de cana de açúcar tem sido estudado principalmente para a adsorção de metais pesados (HOMAGAI et al. 2010), embora recentemente também tenha sido utilizado para a remoção de corantes têxteis (AMIN, 2008; MITTER et al., 2012; SAAD et al., 2010; RACHAKORNKIJ et al., 2004).

Rachakornkij et al. (2004) estudou o efeito de cinzas de bagaço de cana de açúcar para remoção de Remazol Black B, Remazol Brilliant Blue R, e Remazol Brilliant Red F3B. Estes autores determinaram que a medida que aumenta a concentração de bagaço também aumenta a remoção do corante quando analisado em pH 5. AZHAR et al. (2005) também estudaram a remoção de corantes, neste caso o Metil Red, através da adsorção por meio do bagaço de cana de açúcar com a adição de ácido sulfúrico e formaldeído. Estes autores concluíram que o tratamento do bagaço de cana de açúcar provoca um aumento nas taxas de remoção do corante.

3.8. Imobilização celular

A imobilização é um termo que descreve as muitas formas das células serem encapsuladas ou aprisionadas. Esta consiste no confinamento físico das células em uma

região definida de espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua possibilitando a reutilização destas células (MELO et al., 1999).

As técnicas clássicas de Imobilização celular podem ser classificadas em naturais ou artificiais. As técnicas naturais são aquelas que incluem a formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais. As artificiais, por sua vez, são as que incluem a encapsulação em matrizes como, por exemplo, o alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes (SONG, 2005). A imobilização natural ocorre espontaneamente por meio de interações eletrostáticas. Já no caso da imobilização artificial, as células são ligadas às matrizes por ligações covalentes, utilizando-se agentes ligantes como glutaraldeído ou carbodiimida. Uma grande vantagem da imobilização é que a célula permanece viável independente dos possíveis danos causados pelo procedimento (COVIZZI, 2007).

O uso de células imobilizadas para aplicação no tratamento de efluentes tem muitas vantagens em relação às técnicas por células livres, incluindo a proteção do estresse biótico como a predação por protozoários e bacteriófagos, proteção do estresse abiótico como o efeito inibitório dos compostos tóxicos. Além disso, garante a sobrevivência das células, promove a atividade fisiológica, aumenta a densidade celular e o crescimento celular preferencial em várias zonas aeróbicas e anaeróbicas do material em que as células se encontram imobilizadas (PASSOS, 2006). O aprimoramento e o desenvolvimento de novas técnicas de imobilização celular, associadas ao uso de novos materiais como suporte, têm permitido que os processos de degradação com células imobilizadas fossem realizados em condições adversas de pH, de esterilidade e agitação. O emprego de células livres por sua vez não seria possível, em meios de cultivo mais tóxicos, como por exemplo, no tratamento de águas residuais contaminadas (JUNTER e JOUENNE, 2004). No caso do uso de fungos filamentosos, estes que possuem uma taxa de crescimento mais lenta quando comparada à maioria das espécies de leveduras, a imobilização celular é capaz de reduzir os custos de produção (DIAS et al., 2010).

De forma a se obter materiais ideais para a imobilização celular, uma série de características são consideradas favoráveis (Quadro 2).

Quadro 2: Características ideais desejáveis em uma matriz ou suporte selecionado para imobilizar células microbianas.

Características
Ter grande área superficial com espaço intersticial para o crescimento celular.
Possuir grupos funcionais ligantes no caso de adesão artificial.
Ser facilmente regenerável e possível de reuso.
Proporcionar a viabilidade celular e atividade catalítica, por um longo período de tempo.
Apresentar porosidade uniforme a fim de permitir trocas gasosas, entrada de substrato e fluxo de cofatores e produtos do metabolismo microbiano.
Ter boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica
Não ser degradável facilmente por enzimas ou solventes envolvidos no processo.
Ser estável a mudanças drásticas de pressão, temperatura e pH do meio.
Proporcionar imobilização fácil, acessível e viável para uso em escala industrial.

Fonte: (COVIZZI et al., 2007)

Devido ao grande potencial da imobilização celular com materiais naturais, houve a necessidade da busca destes materiais partir de diversas fontes vegetais, biomateriais, que podem ser utilizados para o aprisionamento de células.

No caso de imobilização em biomateriais, além da recuperação das células, as vantagens do processo são a diminuição de problemas de toxicidade, resistência mecânica e abertura de espaços dentro da matriz para células de crescimento (IQBAL e EDYVEAN, 2004). A eficiência do suporte no processo de imobilização celular pode ser avaliada pela capacidade da matriz em alojar a maior quantidade de células viáveis possível, sem limitar a transferência de massa entre o microrganismo e o meio de cultivo. O tamanho do poro, a porosidade e o grau de hidrofobicidade da matriz interferem na intensidade da adesão celular (SILVA et al., 2006).

O uso dos materiais naturais como bagaço de cana para o aprisionamento de células se mostra bastante promissor a uma variedade de matrizes de imobilização (GANGULY et al., 2007). Nessa perspectiva, a utilização de células de leveduras imobilizadas em suporte inerte e de baixo custo é hoje um dos enfoques para aplicação de processos de bioengenharia (ORLANDO et al., 1994).

3.9. Tratamento do Suporte para Imobilização Celular

O objetivo do tratamento químico em suportes compostos de lignina é aumentar a solubilidade da lignina ou diminuir a força das ligações entre lignina com grupos fenólicos e outros constituintes da parede celular, principalmente hemicelulose (SUKSOMBAT, 2004). As hemiceluloses são altamente suscetíveis a condições extremas de pH, aumentando assim a sua solubilidade (WINUGROHO et al., 1984). O revestimento destes suportes aumenta a quantidade de cargas na superfície facilitando os processos de imobilização celular por adsorção e ligação iônica.

3.9.1. Polietilenoimina (PEI)

A Polietilenoimina (PEI) é um dos polímeros conhecidos por ter um efeito positivo na atividade de enzimas e estabilidade (TERAMOTO et al., 1996). O PEI é uma poli base fraca com uma estrutura fragmentada na qual 25% dos átomos de nitrogênio são aminas primárias, 50% aminas secundárias e 25% aminas terciárias (ANDERSSON e HATTI-KAUL, 1999). Este polímero tem sido usado em inúmeras aplicações, desde precipitação de ácidos nucleicos (BURGESS, 1991), agente de floculação de células (GUOQIANG et al., 1994) e agente na imobilização de enzimas e células em suportes sólidos por adsorção (SENTHURAN et al., 1999). O grau de protonação do PEI depende do pH do meio. A adsorção no PEI gera um microambiente hidrofílico cobrindo as células ou enzimas, no entanto, esse microambiente evita a ligação de moléculas de solventes orgânicos mantendo a estabilidade da enzima (PAN et al., 2011). PEI é relativamente solúvel em água e tem que ser fixado em suportes insolúveis para prevenir o vazamento durante a operação. O PEI tem sido muito usado para a remoção de metais pesados já que o número alto de grupos amino na sua macromolécula é ideal para complexar-se com íons de metais pesados (CHEN et al., 2011). A forma comercializada da Polietilenoimina é sua fórmula ramificada (Figura 2), já que está é solúvel em água, ao contrário da forma linear do polímero.

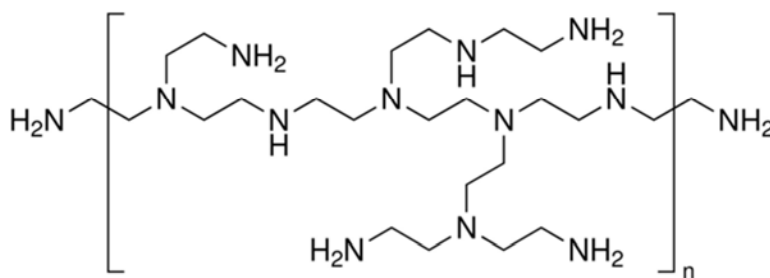


Figura 2: Estrutura química da Polietilenoimina – PEI.

3.9.2. NaOH

O NaOH tem sido selecionado como modelo de tratamento de materiais compostos de lignina similares ao do bagaço de cana de açúcar (KOULLAS et al., 1991; VRIJE et al., 2002). Panagiotopoulos et al. (2010) trataram o bagaço de sorgo com uma solução de NaOH à 2% para a produção de hidrogênio através de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Estes autores observaram uma deslignificação de 46 à 50%. Na hidrólise alcalina ocorre o rompimento nas ligações éster entre hemiceluloses e lignina, sendo que o efeito irá depender do conteúdo de lignina no material. Após a hidrólise ocorre um aumento na porosidade do material quando as ligações éster são rompidas. O NaOH saponifica o ácido urônico e ésteres de ácido acético e neutraliza os grupos livres de ácido urônico, e assim, enfraquece as ligações (FEIST et al., 1970). Este enfraquecimento das ligações aumenta a capacidade de inchamento da celulose e também permite maior penetração de células e enzimas microbianas. Coelho (2007) avaliou as taxas de imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) moída e obteve um aumento de 18,76% nas taxas de imobilização em relação ao controle. O tratamento com NaOH provoca um aumento da área de superfície do suporte.

3.10. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, também conhecido como fermento do pão, é um microrganismo aeróbio facultativo, isto é, que tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (DOS SANTOS et al., 2010). Do ponto de vista industrial, *S. cerevisiae* é um dos biocatalisadores mais comuns, devido principalmente a sua fácil disponibilidade, baixo custo, o não requerimento de instrumentação especial, fácil manipulação, não patogenicidade, eficiência em relação a catalisadores convencionais e o seu

desenvolvimento à temperatura ambiente (BARALDI e CORRÊA, 2004). Sendo assim, devido a sua longa história de aplicação em processos de larga escala, como fermentação do pão e produção de etanol, o uso deste microrganismo é considerado seguro.

O gênero *Saccharomyces* é responsável pela produção dos principais produtos de fermentação (em termos de tonelagem mundial por ano), isto é, 60 milhões de toneladas de cerveja, 30 milhões de toneladas de vinho, 800.000 toneladas de proteína microbiana (SCP – Single Cell Protein) e 600.000 toneladas de fermento de pão (PRETORIUS et al., 2003).

Devido ao fato de ser um dos organismos eucarióticos mundialmente utilizados, existe uma série de estudos sobre o seu metabolismo (BROCARD-MASSON e DUMAS, 2006; LOPEZ-MIRABAL e WINTHER, 2008), ciclo celular (NASHEUER et al., 2002) e regulação da expressão gênica (BIDDICK e YOUNG, 2009).

Na biodegradação e bioissorção de corantes têxteis, a levedura *S. cerevisiae* possui a habilidade de acumular uma grande quantidade de corante sob condições externas adversas. As leveduras em geral também são conhecidas pela sua capacidade de bioissorção de metais pesados, porém pouco estudo tem sido realizado na remoção de corantes de efluentes têxteis (AKSU, 2003).

Células mortas de *S. cerevisiae* magneticamente modificadas foram usadas como adsorvente para a remoção de azul de anilina, vermelho do congo e Naphtol Blue Black, safranina e cristal violeta (SAFARÍKOVÁ et al., 2005). Nestes ensaios pode-se obter uma remoção de cor de 30% para todos os corantes, podendo chegar até 90% para o vermelho do congo em um ensaio de 4h.

3.11. Bioissorção

Dos poucos trabalhos de biorremediação de efluentes têxteis por leveduras, estes mencionam geralmente processos não enzimáticos como o mecanismo principal de descoloração, como a bioissorção. A bioissorção é definida como a acumulação e concentração de poluentes orgânicos e inorgânicos incluindo principalmente metais pesados e corantes de soluções aquosas pelo uso de materiais biológicos. Estes materiais biológicos são compostos principalmente de biomassa microbiológica morta ou viva, a qual pode incluir bactérias, fungos e algas (AKSU e KARABAYIR, 2008).

Para realizar a remoção de compostos tóxicos, como corantes em soluções aquosas, a utilização de biomassa microbiana têm tido muito estudada nos últimos anos, principalmente pelo fato de se obter um relativo sucesso no emprego desta técnica na remoção de metais pesados de efluentes industriais (CORSO e ALMEIDA, 2009). Ainda existe pouca informação entre os mecanismos de interação entre as células sorbentes e os corantes.

O mecanismo de bio sorção pode resultar de mecanismos que podem variar de forças de van der Waals, ligações covalentes ou iônicas (WOON et al., 2008). Porém, a capacidade de bio sorção depende do tipo de biomassa, o tipo de adsorbato, a presença de íons competidores no meio, o método de preparo da cultura microbiana, temperatura, concentração iônica e pH. Dentre os microrganismos usados na bio sorção, a biomassa fúngica se torna bastante atraente já que esta é produzida industrialmente utilizando-se de técnicas simples de fermentação e de meios de crescimento de baixo custo. A biomassa fúngica também está disponível como resíduo de vários processos industriais (MAURYA et al., 2006).

A bio sorção através de fungos e leveduras tem sido amplamente reportada na literatura. Akar et al. (2009) avaliaram o efeito da mudança do pH, quantidade de biomassa, tempo de contato e temperatura na descoloração de uma solução de Acid Red 44 utilizando-se o macro fungo *Agaricus bisporus*. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* por sua vez tem sido estudada na bio sorção do Remazol Blue, Reactive Black e Reactive Red (AKSU, 2003). Rodrigues (2010) determinou que o uso de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio na biodegradação e bio sorção dos corantes Acid Red 151 e Acid Blue 40 se mostra bastante eficiente. Neste trabalho, avaliou-se o tempo de contato da levedura com o corante, pH e a relação da eficiência do uso de células imobilizadas em comparação com células livres.

3.12. Biodegradação

A biodegradação pode ser expressa pela maneira em que um microrganismo através de reações de oxidação, redução, hidroxilação, desalogenização, hidrólise, demetilação inicia a quebra da molécula tornando-a susceptível à ação de outros organismos (RAJAGURU et al., 2000). A degradação é influenciada pela estrutura química da molécula (MEYER, 1978). Sendo assim, se busca cada vez mais

microrganismos versáteis, capazes de degradar de maneira eficaz um grande número de compostos poluentes a um baixo custo.

A biodegradação causada pela ação de enzimas, resulta na decomposição destes compostos com a formação de dióxido de carbono, água, produtos orgânicos e inorgânicos de ocorrência comum, podendo haver a formação de metabólitos tóxicos, quando a degradação é incompleta (DELLAMATRICE, 2005). Durante a degradação os corantes podem sofrer transformações que levem a formação de substâncias cancerígenas como aminas e metais livres.

Devido à diversidade, concentração e composição de espécies químicas presentes em cada efluente, poucos microrganismos são capazes de sobreviver à essas condições adversas assim como degradar estes compostos. (KUNZ et al., 2002). Um determinado grupo de microrganismos pode ser hábil para degradar um produto, mas não outro estruturalmente diferente, havendo especificidade entre microrganismo e composto (GOSZCZYNSKI et al., 1994).

Nigam et al. (2000) encontraram que os corantes contendo grupos amino e hidroxila, amina, acetamida, ou nitro grupos ligados ao anel são mais susceptíveis a degradação. Já os corantes sulfonados são considerados de difícil degradação (SHAUL et al., 1991). Em geral, corantes com estruturas mais simples e menores pesos moleculares exibem maiores taxas de degradação, enquanto moléculas altamente substituídas com elevados pesos moleculares são mais difíceis de degradar (PEARCE et al., 2003).

Glenn e Gold (1983) correlacionaram a remoção de cor e a atividade lignolítica de *Phanerocheate chrysosporium* pela comparação de vários parâmetros fisiológicos, mutações e substâncias inibitórias. Estes autores descobriram que certos corantes poderiam servir de substratos para o sistema de degradação de lignina assim como a determinação de metabólitos secundários de *Phanerocheate chrysosporium*. Neste trabalho, também se constatou que o oxigênio aparentemente estimula a descoloração do corante assim como ativa o sistema catalítico já presente e, portanto, provando a potencialidade deste fungo para o tratamento de efluentes de indústria têxtil.

As enzimas responsáveis pela degradação dos corantes têxteis são peroxidases e lacases. Estas enzimas são extracelulares e apresentam baixa especificidade para o substrato tornando estes organismos bastante interessantes para o tratamento de resíduos de características variadas como os resíduos têxteis.

Um grande número de enzimas oxidativas encontradas em bactérias, fungos e plantas têm tido um papel importante em numerosas aplicações de tratamento de efluentes. Peroxidases e ou fenoloxidasas podem atuar em poluentes recalcitrantes específicos por precipitação ou transformando-os em outros produtos, permitindo assim um melhor tratamento final do efluente (VITOR e CORSO, 2008).

Segundo Durán e Esposito (2000), a degradação por fungos basidiomicetos ocorre principalmente a pHs baixos que correspondem ao pH próximo para a atividade das enzimas atuando na degradação, porém pode haver variação entre as espécies.

3.13. Análises de Degradação em FTIR

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das micro-ondas. A radiação no infravermelho de frequência na faixa de 10.000 a 100 cm^{-1} quando absorvida converte-se em energia de vibração molecular. O processo é quantizado, porém o espectro vibracional costuma aparecer como uma série de bandas. (SILVERSTEIN, 1994).

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) tem sido utilizada para gerar impressões digitais informativas sobre o metabolismo de materiais biológicos (SMITH et al, 2003;. WINDER e GOODACRE, 2004). Outros estudos anteriores também mostraram o sucesso da sua aplicabilidade na taxonomia de sistemas biológicos podendo chegar ao nível de subespécie (NAUMANN et al, 1991;. TIMMINS et al, 1998; WINDER e GOODACRE, 2004). Além disso, a combinação do FT-IR e análise metabólica têm sido bem sucedida na identificação de alterações metabólicas em fermentações naturais multi-organismo (SMITH et al., 2003). FT-IR é particularmente útil para o entendimento de problemas biológicos complexos através de método de triagem inicial, pois é de alto rendimento com tempos de análise de 10 a 60 segundos por amostra, requer de preparação mínima da amostra, é automatizado e relativamente barato (WARFHE et al. , 2010). Além disso, a análise por FT-IR, permite que a amostra seja analisada em vários ambientes como sólido, amorfo ou cristalino, filmes, membranas, pastilhas de KBr, além dos espectrômetros de FT-IR serem mais facilmente encontrados no mercado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Equipamentos

Estufa de cultivo Nova Ética modelo 400/ND; balança analítica ADA 210/L; balança semi-analítica Shimadzu BL 3200H; autoclave vertical Phoenix AV 75; autoclave Fabbe 104 C; agitador magnético Fisatom modelo 752; agitador de tubos Phoenix AP 56; centrífuga Centribio 80-2B; mesa rotatória Catel CFW08; estufa de secagem Fanem modelo 315 SE; refrigeradores Brastemp 280 e Continental 460 modelo RC46; medidor de pH DMPH-2 Digimed; espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu UV-2401 PC e espectrofotômetro FT-IR Shimadzu IRPrestige-21.

4.2. Preparo do bagaço de cana de açúcar

Foram coletadas amostras de bagaço de cana de açúcar na Usina Nova América do grupo COSAN no município de Tarumã/SP. Estas amostras foram lavadas sete vezes em água de torneira para a remoção de açúcares ainda presentes no bagaço. Posteriormente, o bagaço foi secado em estufa de secagem à 65°C por 48h e triturado em um triturador mecânico. Após a trituração, o material foi peneirado de forma a obter partículas de bagaço entre 1,00 e 1,19mm.

4.3. Tratamento do bagaço de cana de açúcar

O tratamento do bagaço de cana de açúcar com a finalidade de aumentar as taxas de imobilização celular foi adaptado da metodologia de Coelho (2007). Os diferentes tratamentos do bagaço foram posteriormente avaliados de acordo com as respectivas taxas de imobilização celular. Quantidades de 1g de bagaço lavado e triturado foram adicionados em frascos erlenmeyers de 250 mL e submetido aos tratamentos descritos nos itens 4.3.1, 4.3.2. e 4.3.3.

4.3.1. Tratamento com polietilenoimina

A Polietilenoimina (PEI) obtida é um produto sintetizado pela Fluka Analytical e comercializado no Brasil pela Sigma-Aldrich na concentração de 50%. Esta solução foi diluída a uma concentração de 2% (v/v) ajustada para o pH 7,00 com HCl (2,0N).

4.3.2. Tratamento com hidróxido de sódio (NaOH)

Uma solução de hidróxido de sódio foi preparada na concentração de 2% e 50 ml desta solução foi adicionada aos frascos erlenmeyers.

4.3.3. Tratamento com água destilada

Uma quantidade de 50 ml de água destilada ajustada para o pH 7,00 com HCl e NaOH foi adicionada aos frascos erlenmeyers contendo bagaço de cana.

Em seguida, 50 mL destas três diferentes soluções foram adicionadas separadamente aos frascos contendo 1g de bagaço de cana. Logo, os frascos permaneceram sob agitação à 160rpm durante 24h e, a seguir, foram autoclavados por 20 minutos à 120°C, lavado com água destilada até atingir-se o pH neutro e secado em estufa à 65°C por 48h (Figura 3).

4.4. Determinação da quantidade de sacarose remanescente no bagaço de cana de açúcar.

Diferentes concentrações de bagaço (2, 4, 6, 8 e 10mg/ml) em água destilada ajustada para os pHs 2,50, 4,50 e 6,50 foram submetidas à uma temperatura de 30°C durante o período de 2h. Em seguida o material foi filtrado em peneira de 1,00mm e as respectivas soluções filtradas foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis à 340nm (BERGMEYER, 1988) como apresentado na figura 3. Através destas concentrações, elaborou-se uma reta padrão para determinar a relação de açúcares remanescentes por mg de bagaço ainda presentes no bagaço utilizado neste experimento. Os cálculos de açúcares remanescentes seguiram a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de Sacarose (mg.ml}^{-1}\text{)} = \frac{A \times M}{\epsilon \times d}$$

Onde:

M = Massa molar da sacarose (342.24 g.mol⁻¹).

€ = Coeficiente de sacarose à 340 nm. (6300)

d = Caminho óptico em cm (0,5 cm).

A = Absorbância da amostra

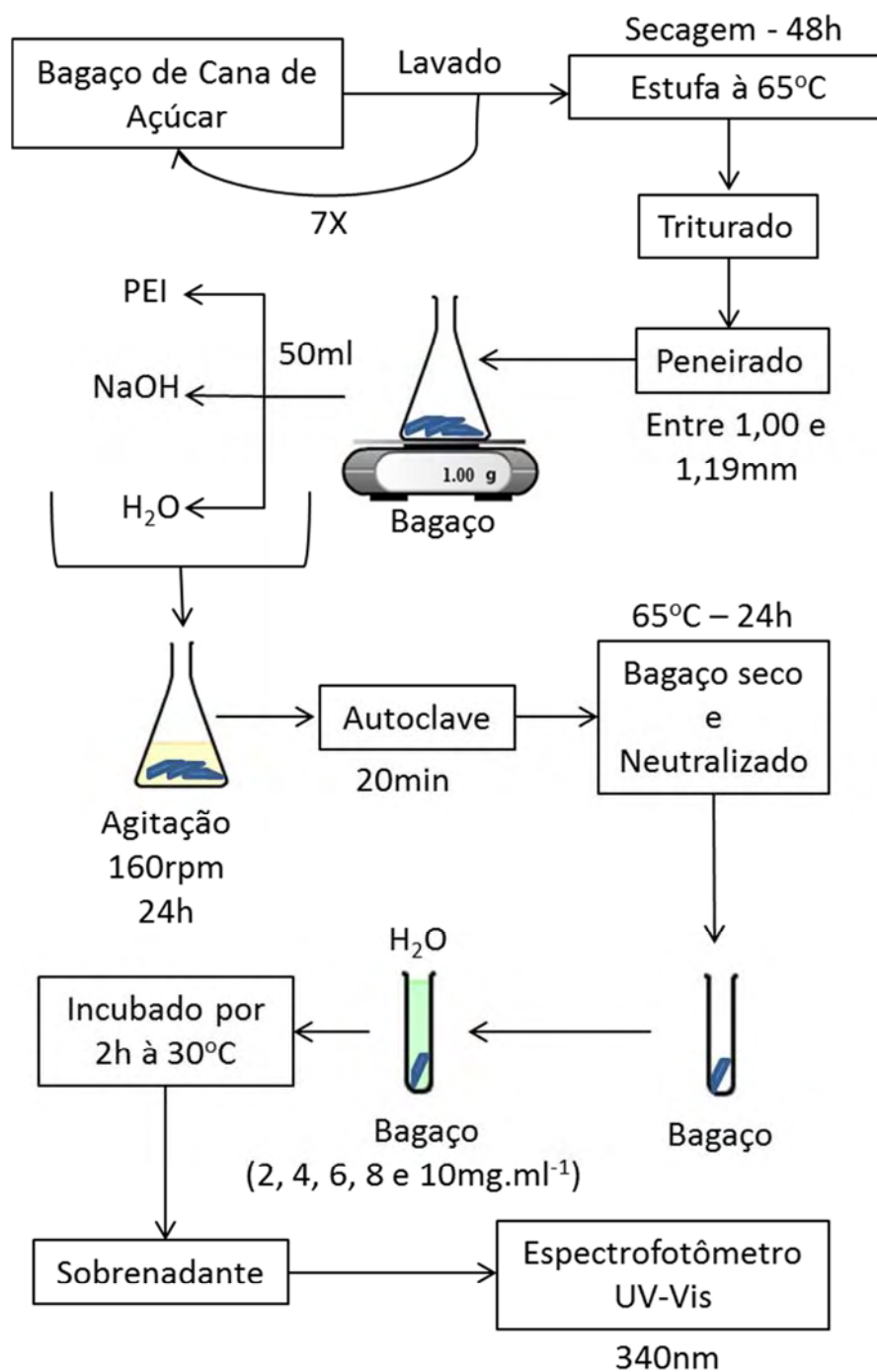


Figura 3: Metodologia utilizada para o tratamento do bagaço de cana de açúcar e análise para determinação de açúcares remanescentes.

4.5. Suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*

A suspensão de levedura foi elaborada através do fermento biológico comercializado, em forma liofilizada, pela Park Gida Uretim ve Pazarlama A.S. Cd. No: 5/634349 no lote 145418. Foram elaboradas suspensões estoque de *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações de 0,25, 0,5 e 1% em água destilada (pH 7,00).

4.6. Reta padrão de suspensão de levedura

A partir das suspensões estoque de levedura, foram elaboradas diferentes suspensões com concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada em duplicata. Foi estabelecida uma ampla variedade de concentrações de suspensões de levedura de modo a diminuir os erros experimentais aproximar-se do valor de concentração exata presente nas amostras. Cada suspensão foi analisada em espectrofotômetro UV-Vis à 540nm e os valores de absorbância foram coletados para elaborar uma reta padrão (GALGANI e STEVENS, 1978; SUMBU et al., 1983). Um agitador vortex foi utilizado para a agitação das amostras antes das leituras de absorbância de modo a evitar que a decantação da suspensão de leveduras interferisse nos resultados.

4.7. Ensaio de imobilização

4.7.1. Ensaio para a determinação das melhores taxas de imobilização

Primeiramente foram preparadas três suspensões estoque de levedura nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1%. Logo, uma alíquota de 1 ml de cada concentração foi adicionada à tubos de ensaio em duplicata contendo respectivamente 2, 4, 6, 8 e 10 mg de bagaço de cana tratado. Estes tubos permaneceram em estufa à 30°C durante 120 min. Através dos cálculos de porcentagem de imobilização celular foi determinada a concentração de levedura que apresentou as melhores taxas de imobilização e esta foi posteriormente utilizada nos testes de remoção do corante.

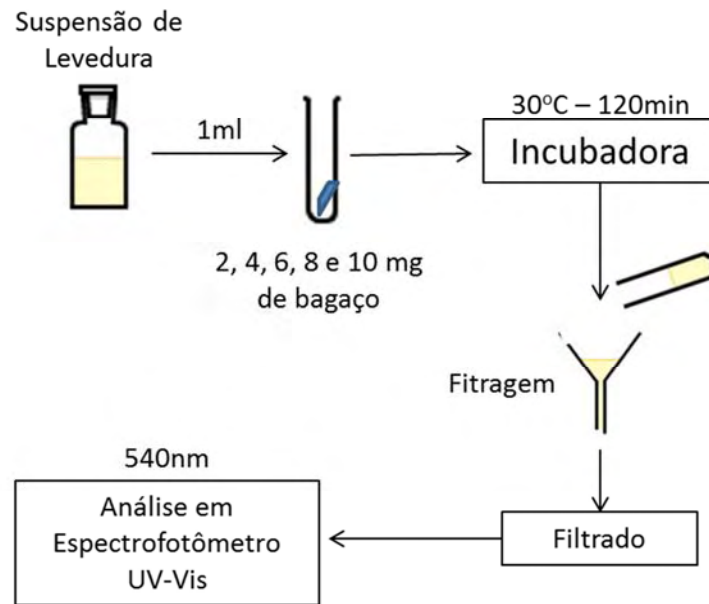


Figura 4: Determinação das melhores taxas de imobilização celular através da análise em espectrofotômetro UV-Vis à 540 nm.

4.7.2. Cálculo de imobilização celular

Através da concentração remanescente da suspensão de levedura após os ensaios de imobilização foi possível através do espectrofotômetro UV-Vis, à 540nm, avaliar a porcentagem de imobilização para cada tratamento em que o bagaço de cana de açúcar foi submetido. Os cálculos de imobilização celular, em porcentagem, foram obtidos utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Levedura Imobilizada} = \left[1 - \frac{(Absp - (Abse - Abscb))}{Absp} \right] * 100$$

Onde:

$Absp$ = Absorbância do controle contendo apenas a suspensão de levedura.

$Abse$ = Absorbância da suspensão de levedura após o contato com o bagaço tratado.

$Abscb$ = Absorbância do filtrado controle contendo apenas H_2O e bagaço de cana tratado.

4.8. Solução corante

4.8.1. Corante Acid Black 48

O corante Acid Black 48 (AB48) foi obtido do lote 092767 da Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc. O número de catálogo deste corante é 19,424-7 e o seu registro no Colour Index (C.I.) é 65005. De acordo com especificações químicas, o AB48 apresenta um peso molecular de $663,54 \text{ g.mol}^{-1}$ e um grau de pureza de 40%. A fórmula empírica deste corante é $\text{C}_{28}\text{H}_{15}\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{S}_2$ e sua fórmula estrutural está apresentada na figura 5.

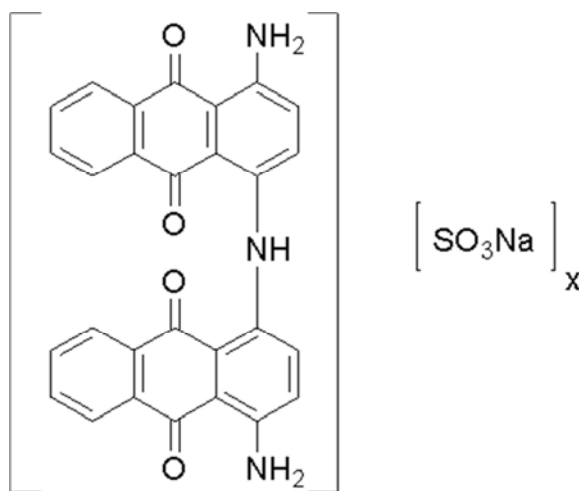


Figura 5: Estrutura química do corante Acid Black 48.

4.8.2. Preparo da solução estoque de Acid Black 48

A solução estoque do corante Acid Black 48 (AB48) com a concentração final de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se de 100 mg do corante em pó em água destilada e completando o volume para 100 ml. A solução foi armazenada em geladeira a 4°C até realização dos experimentos.

4.8.3. Determinação da reta padrão de Acid Black 48 e teste de estabilidade do pH

Em seis tubos de ensaio numerados e em duplicata foram colocadas diferentes diluições da solução estoque do corante Acid Black 48. As diluições dos tubos foram feitas com água destilada em três pHs diferentes (2,50, 4,50 e 6,50) conforme a tabela 1.

Tabela 1: Quantidade de solução estoque de Acid Black 48 e água destilada no pH 2,50, 4,50 e 6,50 para a obtenção da reta padrão e gráfico de varredura do corante.

Tubo	H ₂ O vol. (ml)	Sol. Corante (ml)	Concentração (µg.ml ⁻¹)
1	10	0,0	0
2	9,8	0,2	20
3	9,6	0,4	40
4	9,4	0,6	60
5	9,2	0,8	80
6	9,0	1,0	100

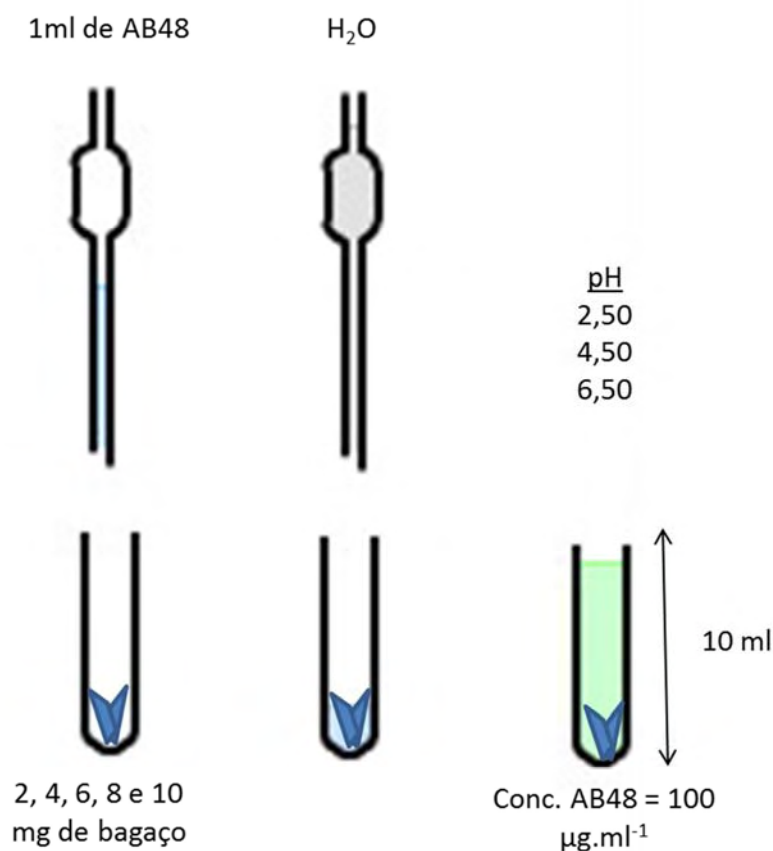
Cada tubo foi posteriormente submetido a uma varredura em espectrofotômetro UV-Vis nos comprimentos de onda de 800 até 190 nm utilizando-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 5 mm. Em seguida foram analisados os valores de absorbância dos picos de onda máximos de curva na varredura. Através dos valores de absorbância dos picos de onda máximo e suas respectivas concentrações de corante presente na solução em µg.ml⁻¹ foi obtido um gráfico de reta padrão de cada pH pelo programa Origin Professional 5.0. Os valores de A, B, e R na reta foram anotados para que posteriormente fosse possível calcular a quantidade de corante remanescente após os testes de biossorção e adsorção.

Para o teste de estabilidade, determinou-se se o corante é estável em concentrações equivalentes, porém em pHs diferentes, seguindo um padrão similar de varredura.

4.9. Preparo dos testes de remoção do corante

4.9.1. Teste apenas com bagaço de cana tratado

Em tubos de ensaio em triplicata foram adicionados 2, 4, 6, 8 e 10 mg de bagaço de cana tratado seco. Em seguida, foi adicionado 1 ml da solução estoque do corante com água destilada em pH 2,50, 4,50 e 6,50 completada para o volume final de 10 ml. Portanto, assim como nos testes com *S. cerevisiae* livre e imobilizada, a concentração inicial do corante obtida foi de 100 µg.ml⁻¹.

Teste apenas com bagaço de cana tratado**Figura 6:** Testes apenas com bagaço de cana tratado.**4.9.2. Testes com *S. cerevisiae* imobilizada**

Primeiramente 1g de bagaço de cana de açúcar tratado foi adicionado a erlenmeyers de 250 ml em triplicata contendo 50 ml da solução estoque de levedura que apresentou as melhores taxas de imobilização. Em seguida, estes frascos foram submetidos à uma agitação de 160 rpm por 24h. Logo, retiraram-se alíquotas de 1 g de bagaço úmido para o cálculo do peso seco do bagaço contendo levedura imobilizada, o restante do bagaço tratado úmido contendo levedura imobilizada foi adicionado em diferentes concentrações de corante. Após a imobilização, adicionou-se 20, 40, 60, 80 e 100 mg de bagaço úmido a tubos de ensaio em triplicata contendo em 9 ml de água destilada, nos pHs 2,50, 4,50 e 6,50. Em seguida, foi feita a adição de 1 ml da solução estoque de AB48. Desta maneira, obteve-se uma concentração inicial de corante de 100 µg.ml⁻¹ e um volume final de 10 ml.

Testes com *S. cerevisiae* imobilizada

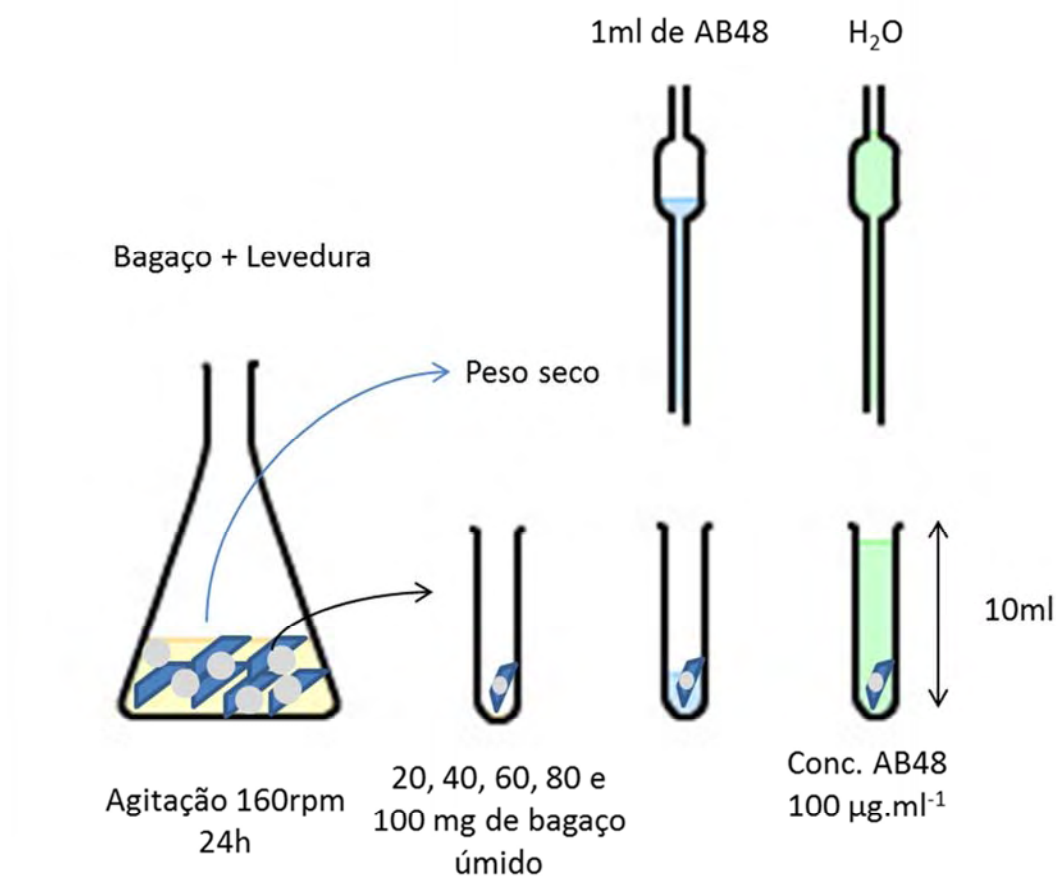


Figura 7: Testes com *S. cerevisiae* imobilizada.

4.9.3. Testes com *S. cerevisiae* livre

Foram adicionados 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 ml da suspensão de levedura estoque com melhor taxa de imobilização em tubos de ensaio em triplicata contendo 1 ml da solução estoque de AB48. Posteriormente foram adicionadas quantidades de água destilada em pH 2,50, 4,50 e 6,50 de modo a completar um volume final de 10 ml. As concentrações de células livres foram submetidas às mesmas concentrações de corante e pH do teste anterior. Os resultados de porcentagem de descoloração e concentração remanescente do corante foram comparados com o peso seco de levedura resultante de acordo com a suspensão estoque de levedura de melhor taxa de imobilização.

Testes com *S. cerevisiae* Livre

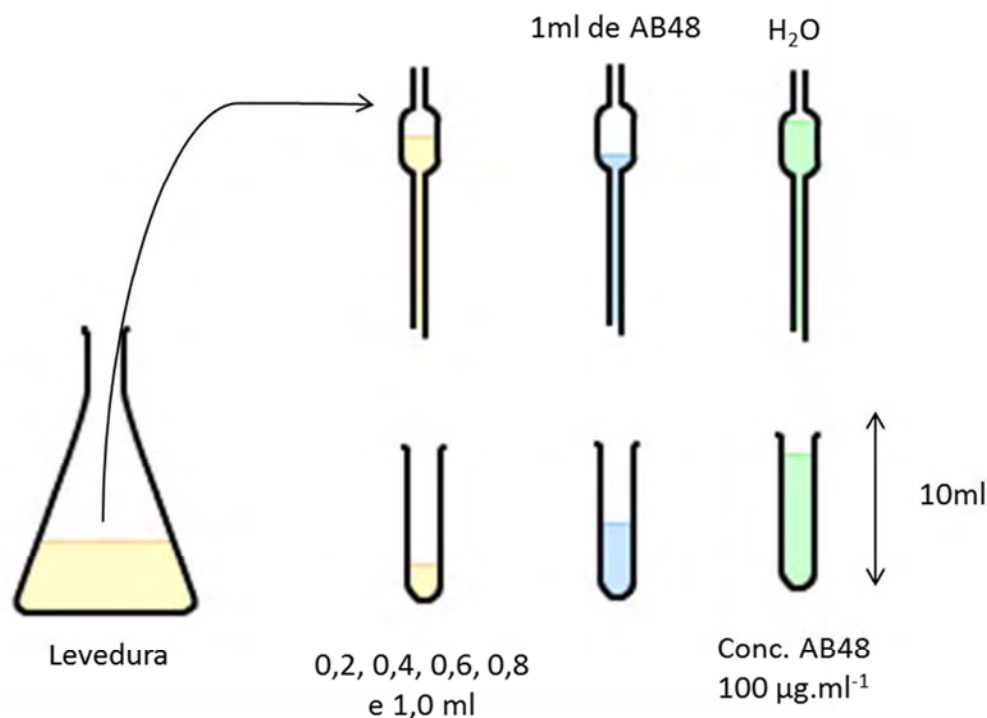


Figura 8: Teste com *S. cerevisiae* Livre.

4.10. Testes de remoção do corante

Os tubos de ensaio contendo os testes de bagaço de cana, bagaço de cana contendo levedura imobilizada e células livres foram levados a uma estufa de cultivo à 30°C por 120 minutos. Após este período, as amostras foram novamente filtradas em peneira de 1,00 mm e centrifugadas a 4000 rpm por 25 minutos para a completa separação da solução remanescente de corante do material adsorvente. Um experimento controle contendo 100 µg.ml⁻¹ de AB48 nos pHs 2,50, 4,50 e 6,50 também foi submetido a todas as condições anteriores. A solução remanescente de cada teste foi posteriormente analisada em espectrofotômetro UV-VIS nos comprimentos de onda entre 190 e 800 nm e em cubeta de quartzo com caminho óptico de 5 mm

4.11. Análise de resultados após os testes de remoção do corante

Os testes de remoção do corante com *S. cerevisiae* na forma livre e imobilizada e os testes apenas com o bagaço de cana tratado apresentam concentrações de peso seco distintas. Sendo assim, os valores de concentração remanescentes e porcentagem de

descoloração foram utilizados apenas para a comparação entre os tratamentos analisando-se cada teste individualmente. Para a comparação dos diferentes testes de remoção do corante entre si foi determinada a capacidade adsortiva do biomaterial, já que este cálculo leva em conta a quantidade de adsorvente pela concentração de corante removida.

4.11.1. Cálculo da concentração remanescente

Através dos valores da reta padrão obtido para o AB 48 em cada pH e o valor de absorbância das amostras após os testes de remoção do corante, calculou-se a concentração de corante remanescente na solução.

4.11.2. Cálculo da porcentagem de descoloração

Os cálculos de porcentagem de descoloração foram analisados segundo Won et al. (2008) e El-Rahin et al. (2009) a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Descoloração} = \frac{\text{Absorbância (controle)} - \text{Absorbância (amostra)}}{\text{Absorbância (controle)}} \times 100$$

Onde:

Absorbância (controle) = Absorbância da solução de corante inicial.

Absorbância (amostra) = Absorbância da amostra de corante que passou pelos ensaios de bioadsorção e adsorção.

4.11.3. Cálculo de capacidade adsortiva

Por meio dos valores de concentração remanescente após os três testes de remoção do corante foram calculados a capacidade adsortiva do biomaterial. A capacidade adsortiva, expressa em mg de matéria por µg de corante, indica a quantidade de corante que poderá ser adsorvida em 1 mg de adsorvente. A capacidade adsortiva foi calculada através da adaptação da seguinte fórmula (HOMAGAI et al., 2010):

$$q = \frac{Ci - Cf}{P}$$

Onde:

q = Capacidade adsorptiva.

Ci = Concentração Inicial do Corante.

Cf = Concentração final do corante após os testes de remoção.

P = Peso seco do adsorvente.

4.12. Testes de biodegradação do corante

Para este teste, apenas o valor de pH 2,50 e o tratamento do bagaço com polietilenoimina que apresentaram melhores taxas de remoção nos testes de bioadsorção e adsorção foram analisados. Portanto, foram feitos dois testes, um com células livres de levedura em contato com o corante e outro com *S. cerevisiae* imobilizada. As amostras foram preparadas da seguinte maneira:

4.12.1. Preparo das amostras de biodegradação do corante com células livres

Quantidades equivalentes à $5 \times 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$ de levedura foram obtidas adicionando 200 μL de uma suspensão de levedura 0,25% em um tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada, no pH 2,50, e com a adição de 1mL de Acid Black 48.

4.12.2. Preparo das amostras de biodegradação do corante com células imobilizadas

Primeiramente realizou-se novamente um ensaio de imobilização celular com o bagaço tratado com PEI. Após este ensaio, calculou-se a taxa de imobilização obtida e retiraram-se alíquotas de bagaço úmido com quantidades equivalentes de levedura utilizada no preparo de biodegradação do corante com células livres. Logo, esta quantidade de bagaço com levedura imobilizada foi adicionada em um tubo de ensaio com 9 mL de água destilada, no pH 2,50, e com adição de 1mL do corante.

4.12.3. Condições para os testes de degradação de Acid Black 48

Ambos os ensaios de degradação com células livres e imobilizadas foram realizados em duplicata. Um ensaio controle contendo apenas uma solução de Acid Black 48 e outro contendo bagaço de cana tratado com o corante também foram

realizados. Todos estes experimentos foram incubados à 30°C pelo período de 10 dias, ou 240 horas, sendo que a cada 24h uma amostra de cada experimento era retirada para análise. Após a retirada, centrifugaram-se os tubos por 25 min e coletou-se o sobrenadante.

4.13. Análise dos testes de biodegradação do corante

4.13.1. Análise por espectrofotômetro UV-Vis

As amostras de sobrenadante nos testes de biodegradação foram feitas varreduras em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu UV-2401 PC nos comprimentos de onda de 800 a 190 nm e em cubeta de quartzo de caminho óptico de 5mm assim com nos testes de bioissorção/adsorção. A biodegradação do Acid Black 48 foi avaliada através da determinação da absorbância relativa, segundo Glenn e Gold (1983).

Os valores de absorbância relativa foram submetidos a uma análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis utilizando o programa Biostat 5.0.

4.13.2. Análise por espectrofotômetro FT-IR

As amostras de sobrenadante retiradas, após a análise em espectrofotômetro UV-Vis, incluindo os ensaios controle, foram colocados em cadinhos e incubados em estufa de secagem à 100°C por 48 horas. Logo, as amostras foram retiradas e colocadas em dessecador por 24 horas até a confecção das pastilhas. Para a confecção das pastilhas, utilizaram-se quantidades equivalentes à 1mg do corante seco dos cadinhos mais 149mg de KBr através de uma compressão de 40kN por aproximadamente 5 minutos. Esta pastilha possui um aspecto transparente ou translúcido com aproximadamente 13 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Logo, a pastilha confeccionada foi colocada no aparelho para a leitura no intervalo de 400 à 4000 cm^{-1} , com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

As linhas de base foram corrigidas em 3 pontos, em 4000, 2000, e 400 cm^{-1} . Estes espectros também foram suavizados, desconvoluidos e apresentados em termos de absorbância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises da determinação de sacarose remanescente no bagaço de cana.

5.1.1. Determinação da reta padrão de concentração remanescente de açúcares

De acordo com os dados da literatura (BERGMEYER, 1988) em relação à concentração de açúcares remanescentes foi possível obter-se uma reta padrão com $R=0,97286$ para o pH 2,50, $R= 0,98738$ para o pH 4,50 e $R=0,98747$ para o pH 6,50. Portanto, através destes valores de absorbância permite-se estimar a quantidade de bagaço de cana de açúcar presente na solução através da determinação dos açúcares remanescentes. As varreduras espectrais se encontram apresentados na figura 9.

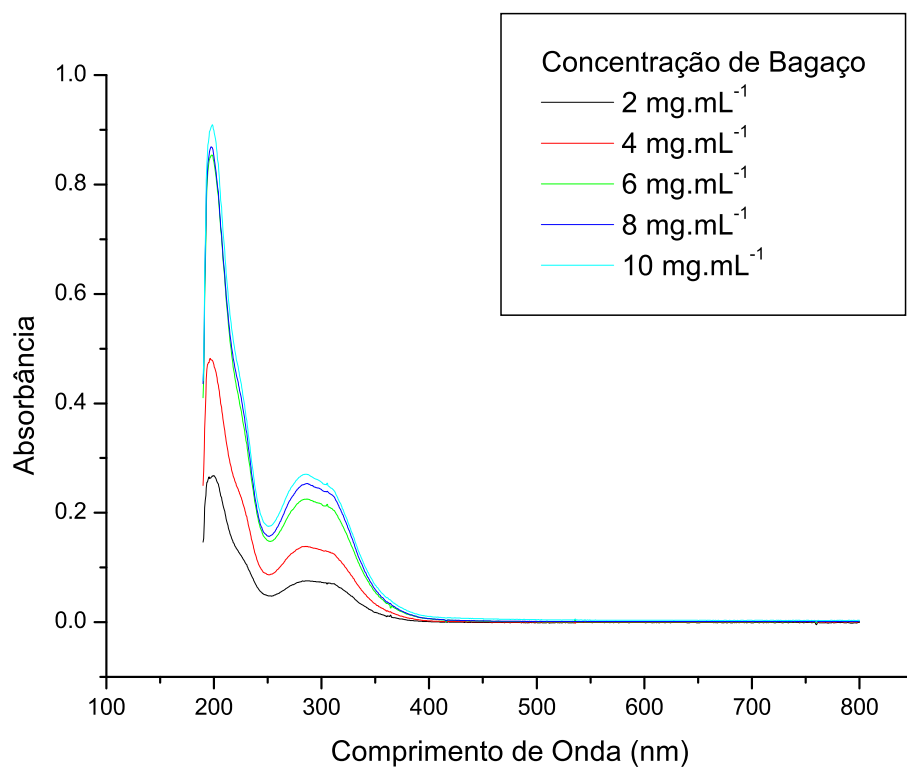


Figura 9: Varreduras espectrais para a determinação de concentração de sacarose remanescente no bagaço de cana. As diferentes varreduras foram obtidas a partir do bagaço de cana de açúcar após o contato de 120min com água destilada no pH 2,50. Valores obtidos a partir de uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm.

5.1.2. Avaliação de sacarose após o tratamento do bagaço de cana

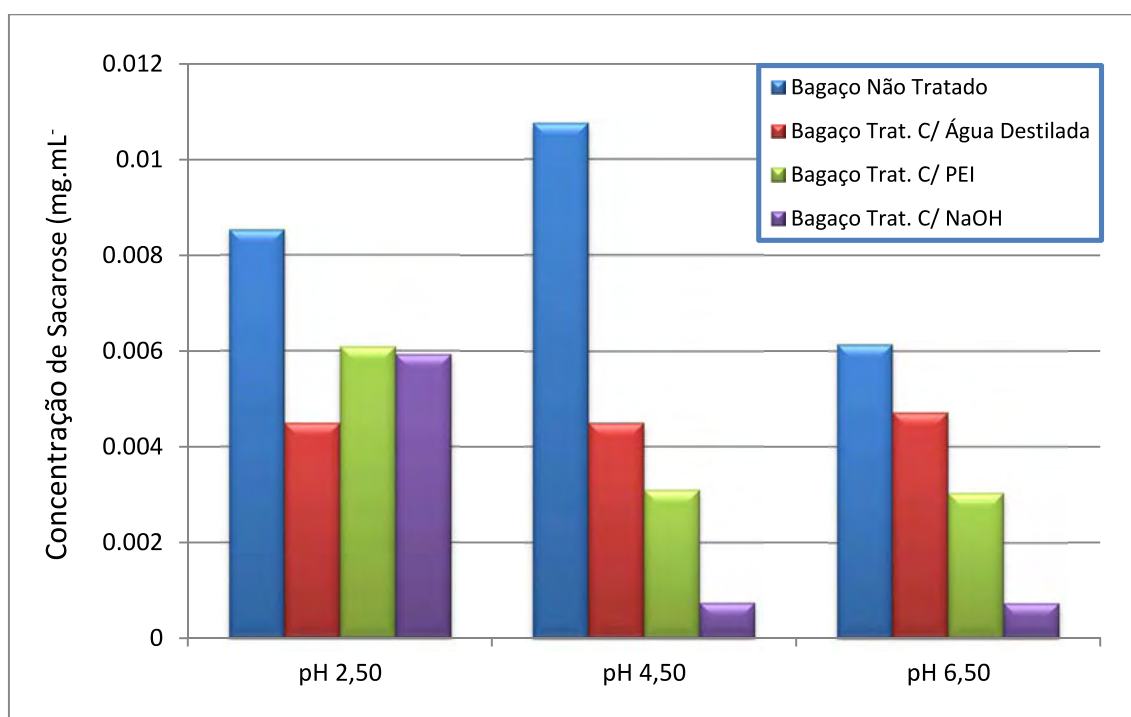


Figura 10: Concentração de sacarose remanescente (mg.ml^{-1}) presente em 6 mg de bagaço de cana sem tratamento, tratado com água destilada, tratado com PEI e tratado com NaOH. Ensaaios após o contato de 120 min com água destilada no pH 2,50, 4,50 e 6,50.

De acordo com os resultados obtidos, no pH 2,50 o tratamento apenas com água destilada reduziu em 50% a quantidade de sacarose presente no bagaço de cana. Já os tratamentos com PEI e NaOH, para este mesmo pH, reduziram em média 29% da sacarose presente. Observa-se também que o bagaço de cana tratado apresentou menores quantidades de sacarose em todos os valores de pH. O pH 6,50 foi o mais eficiente na remoção de açúcares utilizando-se bagaço de cana tratado com PEI e NaOH. Sendo que no tratamento com PEI, o pH 6,50 foi 50% mais eficiente em relação ao pH 2,50. Isto se deve a que o bagaço tratado com PEI e com NaOH possuem uma maior quantidade de cargas positivas. As cargas positivas, neste caso, contribuíram para a adsorção das moléculas de sacarose que seriam liberadas no meio. À medida que o pH aumenta de 4,50 para 6,50 estas cargas positivas foram também ocupadas por íons OH^- presentes na solução que competem com a sacarose. Sendo assim, o tratamento do bagaço apenas com autolavagem já contribui para uma diminuição de 25% da quantidade de sacarose presente no bagaço. A redução de moléculas de sacarose no bagaço de cana é importante já que estas ocupam possíveis sítios de adsorção.

5.2. Análise da reta padrão de suspensão de leveduras

Através dos valores de absorvância analisados à 540 nm, uma reta padrão de concentração da suspensão de leveduras foi determinada como $\text{Absorvância}^{540\text{nm}} = 1,39895 + 0,10883 \cdot \text{Conc. Levedura}$, sendo que o valor de R para esta reta foi de 0,96587. Estes valores em duplicata apresentam um desvio padrão de 0,08625 e um P menor que 0.0001.

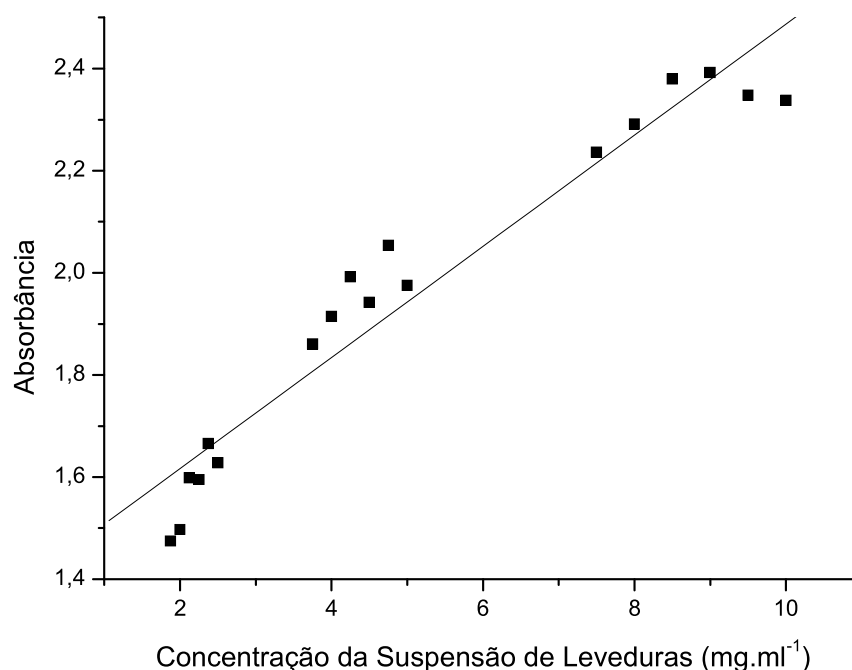


Figura 11: Relação entre os valores de concentração de *S. cerevisiae* com os resultados de absorvância obtidos para cada concentração.

5.3. Determinação das melhores taxas de imobilização celular.

De acordo com os dados coletados a suspensão de levedura testada com concentração de 1% apresentou em linhas gerais as melhores taxas de imobilização analisadas. O bagaço tratado com PEI também apresentou as melhores taxas de imobilização em todas as concentrações de suspensão de levedura analisadas. Este tratamento apresenta as melhores taxas de imobilização quando avaliamos a quantidade de biomassa de levedura imobilizada por mg de bagaço (Figura 12).

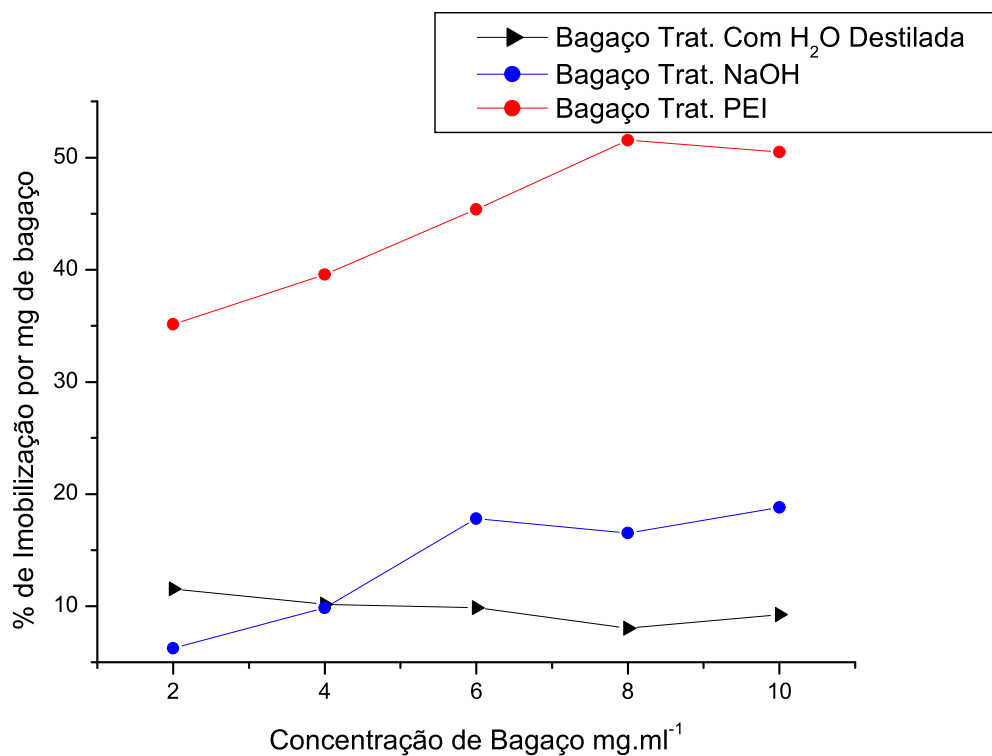


Figura 12: Porcentagem *S. cerevisiae* imobilizada partindo-se de uma suspensão de levedura na concentração 1 %. Resultados avaliados entre a porcentagem de leveduras imobilizadas por mg de bagaço em relação à quantidade de bagaço (mg) em solução utilizada nos ensaios de imobilização.

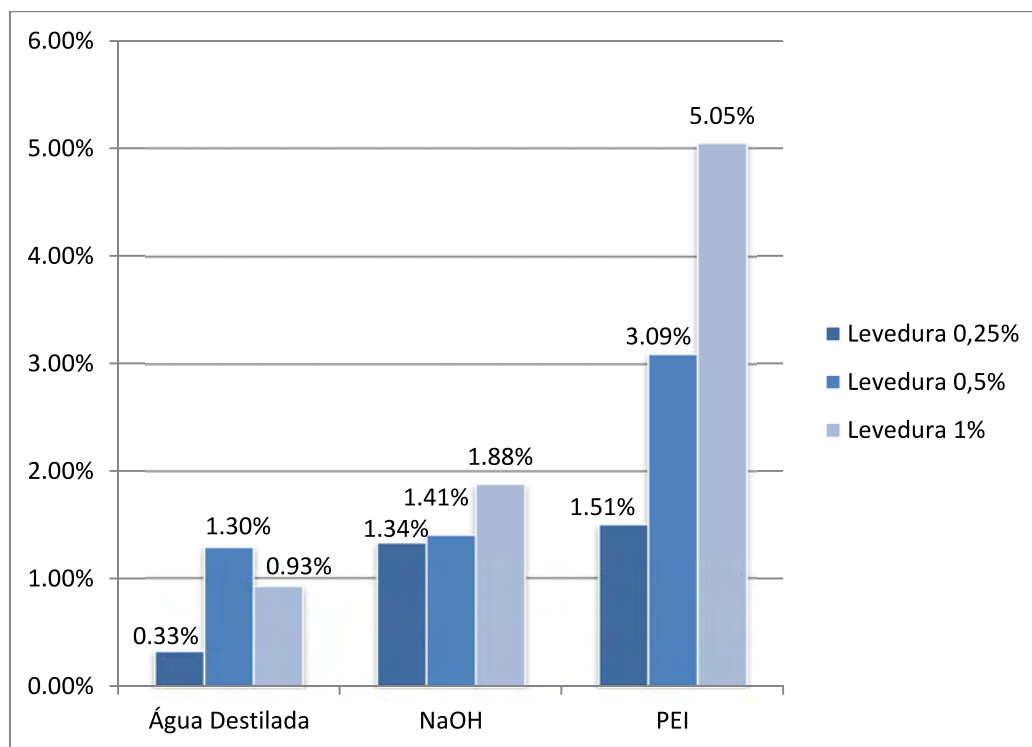


Figura 13: Gráfico da porcentagem de imobilização de suspensões estoque de levedura à 0,25, 0,5 e 1% em 10 mg.ml⁻¹ de bagaço. Valores expressos em porcentagem por mg de bagaço na solução.

Quando se avalia apenas a quantidade total de biomassa imobilizada, isto é, sem levar em conta a quantidade de bagaço de cana tratado que foi adicionada, nota-se que a tendência dos valores é proporcional à concentração do bagaço utilizado (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de porcentagem de imobilização celular partindo-se de uma solução de levedura à 0,25, 0,5 e 1% em contato com 2, 4, 6, 8 e 10mg de bagaço de cana de açúcar tratado com PEI, NaOH e água destilada.

Suspensão Estoque de Levedura	Tratamento do Bagaço	% de Imobilização (mg bagaço).(ml de solução) ⁻¹				
		2	4	6	8	10
1%	Água Destilada	11,55	10,16	9,87	8,04	9,26
	NaOH	6,26	9,85	17,81	16,53	18,81
	PEI	35,13	39,57	45,37	51,55	50,49
0,5%	Água Destilada	7,64	14,57	7,93	17,10	12,97
	NaOH	14,62	13,13	8,13	9,94	14,08
	PEI	23,44	30,89	38,11	28,77	30,94
0,25%	Água Destilada	7,87	15,67	14,91	16,68	3,32
	NaOH	24,59	22,25	16,77	17,55	13,37
	PEI	45,96	27,82	20,67	21,80	15,08

Embora alguns testes com bagaço de cana na concentração de 2 mg.ml⁻¹ apresentam uma maior taxa de imobilização celular na concentração 0,25%, nas demais concentrações de bagaço esta suspensão estoque mostrou resultados não tanto satisfatórios de imobilização (Tabela 2). Sendo assim, para os testes de biossorção com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bagaço de cana tratado decidiu-se utilizar a suspensão estoque de levedura na concentração de 1%.

5.4. Reta padrão do corante Acid Black 48

Através dos resultados obtidos por meio das varreduras espectrais determinou-se que o corante Acid Black 48 é de pH estável e que possui um comprimento de onda máximo em 663 nm. No que se diz respeito aos dados da reta padrão, foram obtidos os seguintes valores apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Dados da Reta Padrão de AB48 nos valores de pH 2,50, 4,50 e 6,50.

Dados	pH 2,50	pH 4,50	pH 6,50
A =	0,00272	0,00167	0,000442857
B =	0,004421	0,00442	0,00445
R =	0,999911	0,99997	0,99994

Em todas as condições de pH analisadas, o valor de R foi muito próximo de 1, o que determina uma precisão bastante elevada e uma confiabilidade na utilização destas retas para os cálculos de remoção do corante e descoloração. Em relação à estabilidade do corante, as três diferentes retas apresentam valores de inclinação similares, o que indica que o corante é estável à mudanças de pH.

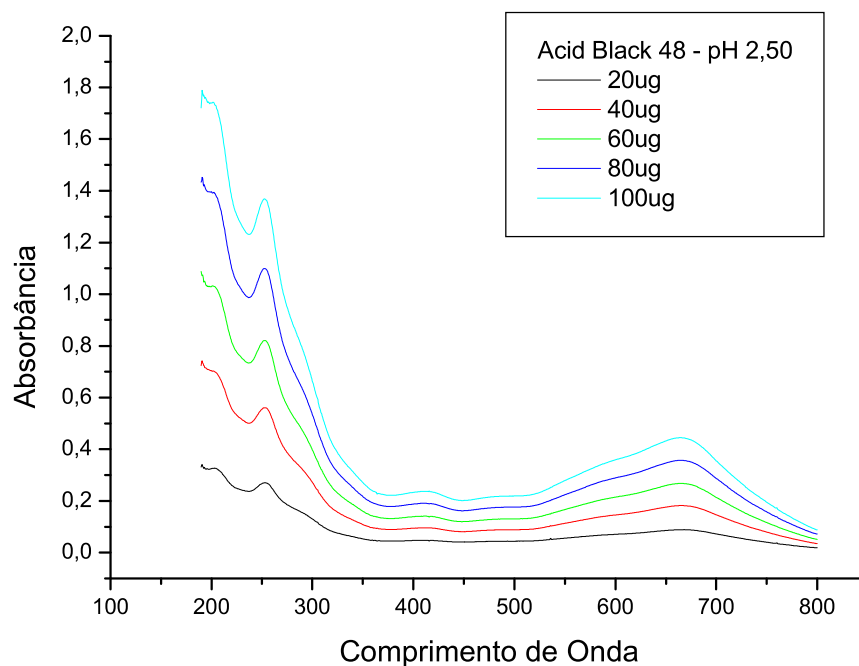


Figura 14: Varredura espectral das concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ do corante Acid Black 48 no pH 2,50. Absorbância $^{663\text{nm}} = 0,00272 + 0,004421 \cdot \text{Conc do corante}$. Resultados obtidos em cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm.

5.5. Determinação dos valores de peso seco após a imobilização

De acordo com os dados obtidos após os ensaios de imobilização, o cálculo de umidade foi de 18% para o bagaço tratado com água destilada contendo levedura imobilizada, 13,01% com NaOH e 7,96% com PEI. Portanto, para os cálculos de capacidade adsorptiva, os valores em peso úmido de 2, 4, 6, 8 e 10 de bagaço adicionados nos testes de remoção do corante com levedura imobilizada foram modificados para os valores de peso seco conforme a tabela 4.

Tabela 4: Valores de peso seco obtidos após os ensaios de imobilização com bagaço tratado com água destilada, PEI e NaOH. Os resultados foram expressos comparando-se os valores de peso úmido iniciais.

Peso úmido Utilizado nos Testes de Biossorção com Levedura Imobilizada (mg.ml ⁻¹)	Peso Seco para o Bagaço Tratado com Água Destilada (mg.ml ⁻¹)	Peso Seco para o Bagaço Tratado com PEI (mg.ml ⁻¹)	Peso Seco para o Bagaço Tratado com NaOH (mg.ml ⁻¹)
2	0,360	0,159	0,260
4	0,720	0,318	0,521
6	1,080	0,478	0,781
8	1,440	0,637	1,041
10	1,800	0,796	1,302

5.6. Testes de remoção do corante

5.6.1. Teste apenas com bagaço de cana tratado

Após os testes de adsorção com bagaço de cana tratado observa-se que as taxas mais altas de remoção do corante, em todos os pHs analisados, foram obtidas com as maiores concentrações de bagaço, isto é, 10 mg.ml⁻¹. O pH 2,50, partindo-se de uma concentração inicial de 100µg de corante, foi o pH mais eficiente para a adsorção do corante em todos os tratamentos avaliados. À medida que o pH da solução decresce, tornando o meio mais ácido, o número de sítios adsorventes de ânions aumenta, favorecendo a adsorção dos ânions do corante devido à atração eletrostática (SAAD et al., 2010). No pH 2,50 obteve-se os resultados apresentados na figura 15.

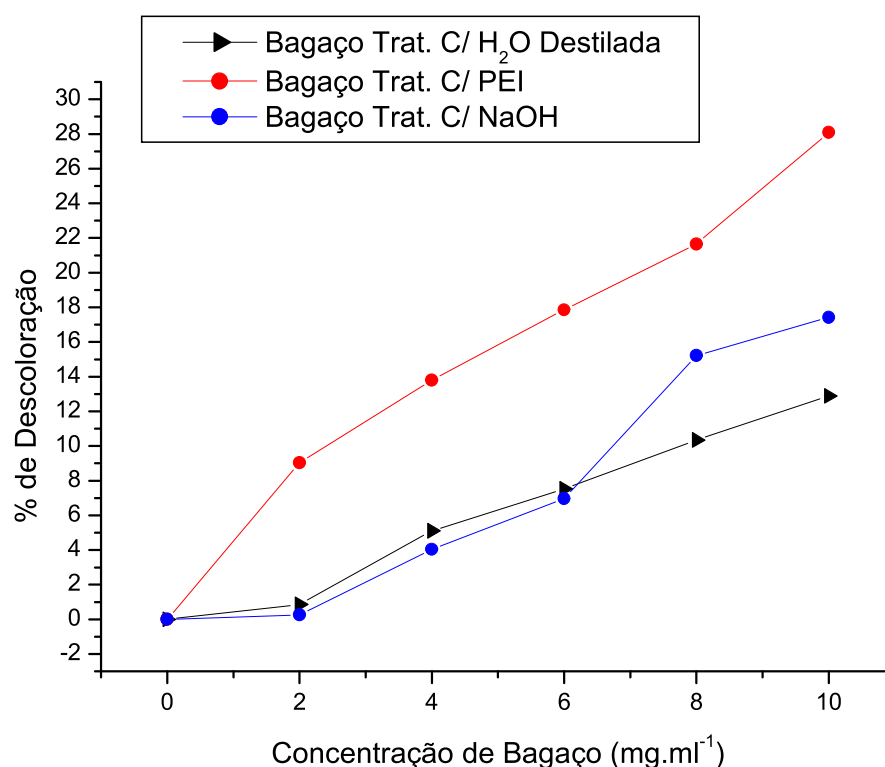


Figura 15: Porcentagem de Descoloração do corante AB48 em pH 2,50 após o contato com bagaço de cana de açúcar tratado com PEI, Água Destilada e NaOH por 120min à 30°C. Absorbância^{663nm} = 0,00272 + 0,004421*Conc. do corante. Resultados obtidos utilizando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm.

De acordo com os dados obtidos, o bagaço de cana tratado com PEI apresentou as melhores taxas de remoção do corante em todos os valores de pH analisados, já que este apresenta os maiores valores de porcentagem de descoloração em todas as concentrações de bagaço em que a solução de AB48 a 100 µg.ml⁻¹ foi submetida. Em um pH ácido, o PEI é altamente protonado, formando (PEI-H⁺) (AMARA e KERDJOU DJ, 2003). A protonação do PEI revestido no bagaço de cana aumenta a quantidade de sítios ativos disponíveis para as cargas negativas do corante no adsorvente. Os valores de concentração remanescente do corante após o contato com o bagaço tratado com NaOH apresentaram valores intermediários entre os tratamentos com PEI e água destilada.

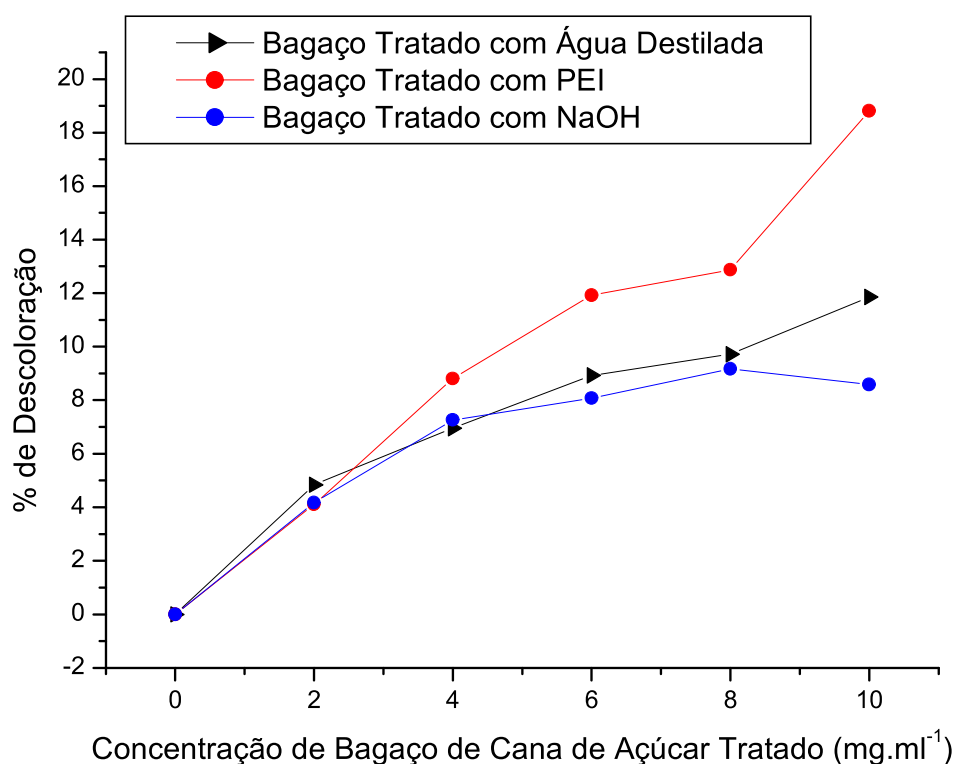


Figura 16: Porcentagem de descoloração do corante Acid Black 48 em pH 4,50 após o contato com bagaço de cana de açúcar tratado com PEI, Água Destilada e NaOH por 120min à 30°C. Resultados obtidos utilizando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm.

Quando são analisados os valores no pH 4,50, observa-se que as maiores taxas de remoção do corante ocorrem ainda no bagaço tratado com PEI, porém o Bagaço tratado somente com água destilada não apresenta muita diferença do que o tratado com NaOH (Figura 16). O bagaço tratado com NaOH foi autoclavado e logo lavado com água destilada em pH neutro, porém existe a possibilidade de ainda existir NaOH contido no bagaço. A presença de NaOH pode gerar um aumento no número de OH⁻ adsorvidos no bagaço que competem com os ânions presentes na molécula do corante.

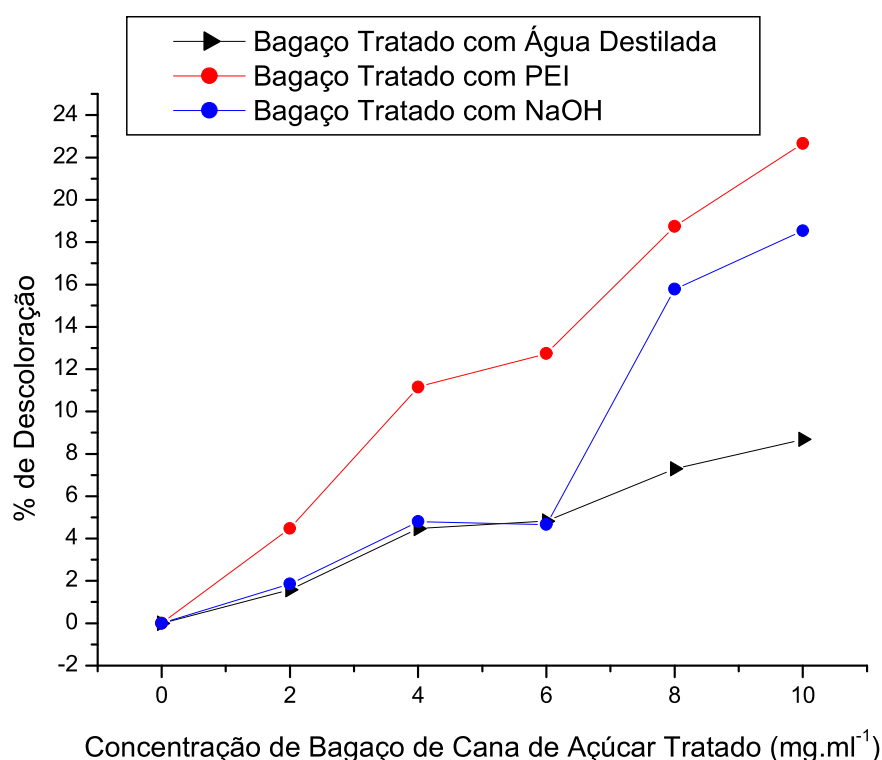


Figura 17: Porcentagem de descoloração do corante Acid Black 48 em pH 6,50 após o contato com bagaço de cana de açúcar tratado com PEI, Água Destilada e NaOH por 120min à 30°C. Resultados obtidos utilizando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm.

No pH 6,50 por sua vez, o bagaço tratado apenas com água destilada se mostra menos eficiente na remoção do corante entre os valores de pH 2,50 e 4,50. Estes resultados já haviam sido observados em Mitter et al. (2012), em que os autores estudaram a adsorção do corante Acid Alizarin Violet N em bagaço de cana de açúcar tratado apenas com água destilada. Porém, quando o AB48 esteve em contato com bagaço de cana tratado com PEI e NaOH no pH 6,50 estes valores foram tão eficientes quanto no pH 4,50. Amin (2008) avaliou a eficiência de adsorção do Reactive Orange em carvão ativado elaborado através do miolo de bagaço quimicamente modificado e observou que as maiores taxas de descoloração do corante foram obtidas em pH 2,50, porém, a eficiência de remoção entre os pHs 4,50 e 6,50 foram equivalentes. Resultados similares também foram obtidos em Akar et al. (2010) na utilização de *Pyracantha coccinea* para a adsorção de Acid Red 44. Segundo estes autores a porcentagem de descoloração foi severamente afetada pela mudança de pH, sendo que a partir do pH 4,00 os valores de descoloração permaneceram estáveis.

5.6.2. Testes Com *S. cerevisiae* imobilizada

Na utilização da suspensão de levedura a 1% nos ensaios de imobilização celular para os testes de remoção do corante, o bagaço de cana de açúcar tratado com PEI novamente apresentou as maiores taxas de imobilização de células. Observa-se também que o tratamento do bagaço teve grande influência para a imobilização celular. A porcentagem de leveduras imobilizadas no bagaço de cana foi de 31,34% para o tratamento com PEI, 22,54% para o tratamento com NaOH e 8,56% para o tratamento apenas com água destilada. Coelho (2007) realizou experimentos semelhantes com imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) para a produção de xilitol e também observou que no tratamento do suporte com PEI ocorre um revestimento permitindo uma maior interação entre as células e o suporte. Huang et al. (2009) avaliaram a eficiência da imobilização de células de *E. coli* K12 em BSP e observaram que a polietilenoimina além de aumentar as taxas de imobilização também aumenta a densidade em que as células se encontram imobilizadas.

Portanto, assim como nos testes de adsorção, os testes de bagaço de cana tratado com levedura imobilizada apresentaram a mesma tendência. Isto é, os menores valores de concentração remanescente para todos os tratamentos foram obtidos no pH 2,50, sendo que o bagaço tratado com PEI apresentou os melhores resultados. No pH 2,50 as taxas de descoloração foram maiores na medida em que se aumentou a concentração de bagaço com células imobilizadas (Figura 18). Tazhibaeva et al. (2003) avaliaram o efeito da mudança do pH na superfície de células de leveduras. Estes autores determinaram que as cadeias de carboidratos encontrados na superfície celular das células de leveduras possuem múltiplas ligações fosfodiéster, resultando em inúmeras cargas negativas. Em condições de pH neutro esta superfície permanece carregada negativamente, o que favorece a imobilização celular já que o suporte se encontra carregado positivamente. Porém, em condições de pH fortemente ácidos, a superfície do biossorvente, assim como a superfície das células imobilizadas ficam carregadas positivamente e então permitem forças de atração com as moléculas de carga negativa do corante.

Quando o pH da solução aumenta, o número de sítios carregados negativamente aumenta. Baixas taxas de biossorção são observadas em pH alcalino por causa da

competição pelos locais de adsorção entre o excesso de íons hidroxilas (OH^{-1}) com os íons negativos do corante (AKAR et al., 2009).

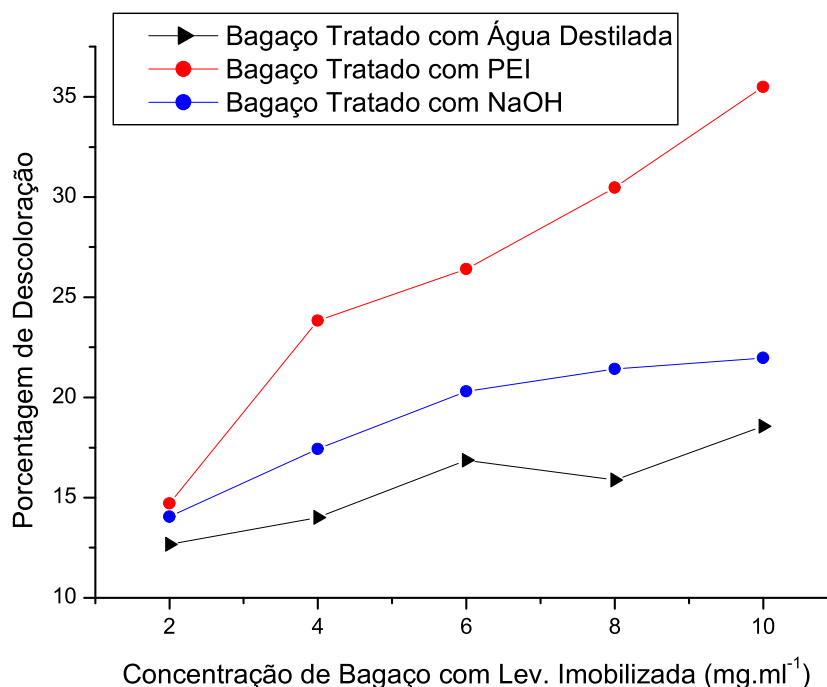


Figura 18: Porcentagem de descoloração do corante Acid Black 48 em pH 2,50 após o contato com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bagaço de cana de açúcar tratado com PEI, Água Destilada e NaOH por 120min à 30°C. Resultados obtidos utilizando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm.

Analisando-se apenas os dados obtidos dos pHs 4,50 e 6,50, assim como nos ensaios de adsorção apenas com o bagaço de cana tratado, a remoção do corante foi tão efetiva no pH 4,50 quanto no pH 6,50 para todos os tratamentos. Dentre os tratamentos, o bagaço tratado com PEI apresentou as maiores taxas de descoloração do corante. O bagaço tratado com NaOH apresentou taxas mais eficientes do que o bagaço de cana tratado apenas com água destilada. Isto se deve a que apesar de o método de imobilização celular também possuir a inconveniência da dessorção, ou seja, o desprendimento das células no suporte (MARTIN, 1998), este resultado já era esperado uma vez que o bagaço tratado com NaOH apresentou maiores taxas de imobilização celular em relação ao tratamento com água destilada.

5.6.3. Testes com *S. cerevisiae* livre

Para os testes de leveduras na forma livre, o pH 2,50 apresentou as melhores taxas de descoloração do Acid Black 48. Resultados semelhantes também foram obtidos na literatura (EL-RAHIN et al., 2009; ALMEIDA, 2008; VICTOR e CORSO, 2009). Na concentração de 0,05 mg de levedura por ml obteve-se 72,8 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de concentração remanescente de corante e porcentagem de descoloração de 27,2% nos testes de pH 2,50. Nesta mesma concentração de suspensão de levedura, a taxa de descoloração foi de apenas 3,02% para o pH 4,50 e 1,36% para o pH 6,50. As agrupações amino ($-\text{NH}_2$) encontradas principalmente nas moléculas de proteínas da biomassa podem ser protonadas na forma de $-\text{NH}_3^+$ (WON et al., 2004). A formação de $-\text{NH}_3^+$ por sua vez resulta na formação de sítios ativos para a ligação dos ânions do corante.

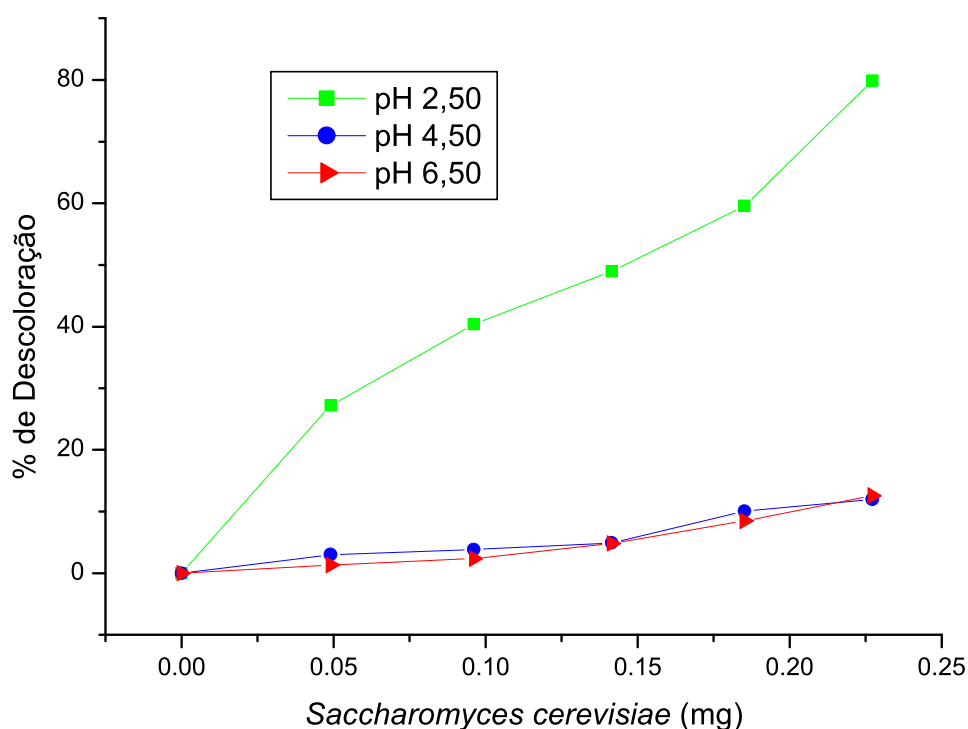


Figura 19: Determinação da porcentagem de descoloração do corante Acid Black 48 em pH 2,50, 4,50 e 6,50 após o contato com *Saccharomyces cerevisiae* livre por 120min à 30°C. Resultados obtidos utilizando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm.

5.6. Cálculos de capacidade adsortiva

Após a determinação dos valores de peso seco, uma vez estabelecida a imobilização, foram realizados os cálculos de capacidade adsortiva nos diferentes ensaios de remoção do corante (tabela 5). De acordo com os dados coletados, obteve-se que as melhores taxas de adsorção do AB48, isto é, a maior quantidade de corante que se aderiu na biomassa, foi obtida com células livres de levedura.

Tabela 5: Capacidade adsortiva do bagaço de cana tratado, *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bagaço de cana tratado e *Saccharomyces cerevisiae* livre partindo-se de uma solução inicial de corante Acid Black 48 de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Resultado obtido a partir de 6 mg dos diferentes adsorvente e expresso em μg de corante por mg de bagaço.

pH	Levedura Imobilizada em Bagaço Tratado com Água Destilada.	Levedura Imobilizada em Bagaço Tratado com PEI.	Levedura Imobilizada em Bagaço Tratado com NaOH.	Levedura Na Forma Livre	Bagaço de Cana Tratado com Água Destilada	Bagaço de Cana Tratado com PEI	Bagaço de Cana Tratado com NaOH
2,50	19,45	74,84	33,46	420,21	3,72	5,90	3,46
4,50	6,58	37,51	2,55	39,92	1,12	3,78	1,10
6,50	1,03	14,18	0,77	24,63	0,72	2,05	0,60

No pH 2,50 1 mg de células livres de levedura seria capaz de remover 420,21 μg do corante. Segundo Chen e Lin (2007), a descoloração de corantes com células imobilizadas é menos sensível a mudanças de pH, o que sugere que a matriz de suporte das células impede o transporte de íons H^+ . À medida que diminui a entrada de íons H^+ no suporte, consequentemente diminui a taxa de adsorção do corante. Rodrigues (2010) avaliou o uso de células de *S. cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio para a remoção dos corantes Acid Red 151 e Acid Blue 40 e determinou que os melhores resultados foram obtidos no uso de células livres para ambos os corantes.

As taxas mais baixas de capacidade adsortiva, por sua vez, foram obtidas utilizando-se apenas do bagaço tratado. Observa-se também que existe uma grande diferença quando se compara quantidades equivalentes de biomassa de levedura e de bagaço de cana na remoção de corantes têxteis. Sendo que, a levedura se mostra aproximadamente 100 vezes mais eficiente no pH 2,50 e de 10 a 40 vezes no pH 4,50.

Já que a capacidade de adsorção avalia a remoção do corante por mg de biomassa, espera-se que a biomassa com maior quantidade de células de levedura seja a mais eficiente. Portanto, os testes com leveduras na forma livre tiveram uma capacidade de adsorção do corante maior do que os testes com levedura imobilizada no bagaço. Porém, o uso de levedura imobilizada aumenta a capacidade adsortiva de 6 a 12 vezes em relação ao uso de apenas o bagaço de cana tratado no pH 2,50.

No pH 2,50, o bagaço tratado com PEI contendo leveduras imobilizadas foi de 2 a 4 vezes mais eficiente que o tratamento com água destilada e NaOH. Porém, a capacidade adsortiva de células de *Saccharomyces cerevisiae* livres foi até 5 vezes mais eficiente que as células imobilizadas em bagaço de cana tratado com PEI.

O tratamento com NaOH demonstrou ser mais eficiente que o tratamento com água destilada apenas para o pH 2,50 nos testes com levedura imobilizada. Porém, analisando-se apenas a adsorção do corante no bagaço de cana tratado observa-se que o tratamento com NaOH diminuiu a capacidade adsortiva do bagaço. Isto se deve à que a quantidade remanescente de NaOH no bagaço possivelmente pode dissociar-se, ocorrendo a ligação de íons OH^{-1} no bagaço, ocupando os possíveis sítios de ligação para o corante.

A acidez do meio também demonstrou tornar a adsorção e biossorção mais eficiente. Observa-se que existe uma grande diferença na capacidade adsortiva do pH 2,50 em relação aos demais valores de pH analisados, porém esta diferença não é tão pronunciada comparando-se apenas os valores no pH 4,50 e 6,50. De acordo com Won et al. (2008), existe uma variedade de faixas de pH em que os corantes têxteis podem ser adsorvidos mais facilmente de acordo com a estrutura química do corante estudado e a composição do material de adsorção.

Na figura 20 é possível visualizar a capacidade adsortiva dos diferentes métodos utilizados para a remoção do corante Acid Black 48.

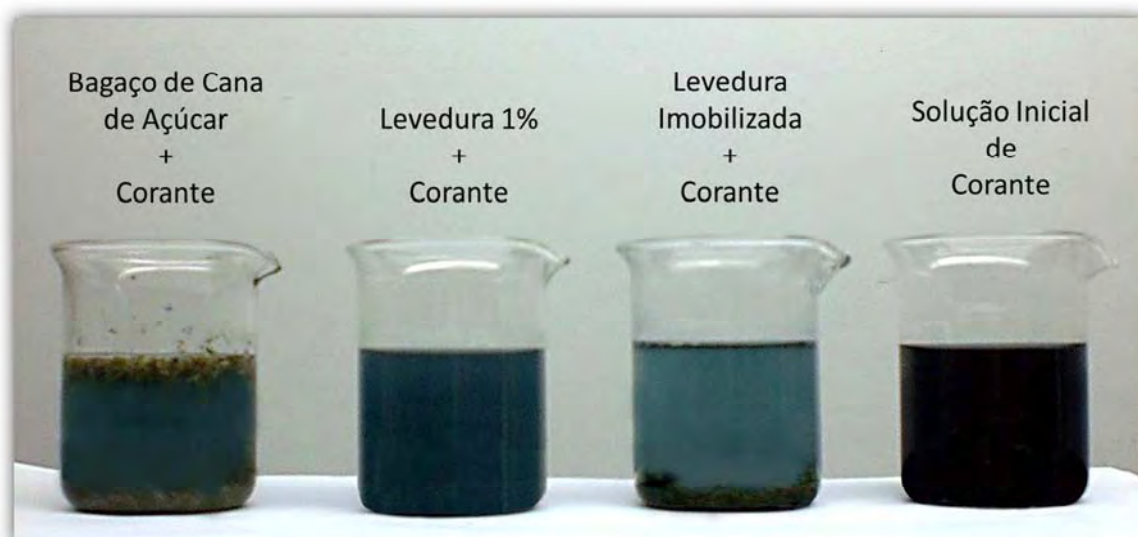


Figura 20: Comparação da capacidade biossortiva do bagaço de cana de açúcar tratado com polietilenoimina, solução de levedura 1%, *S. cerevisiae* imobilizada em bagaço de cana tratado com PEI e a solução inicial do corante. Testes realizados no pH 2,50 e após o período de 2 horas.

5.7. Análise dos testes de biodegradação do Corante

5.7.1. Análise por espectrofotômetro UV-Vis

Através da análise da varredura do corante Acid Black 48 na concentração de 100µg, foi possível estimar os comprimentos de onda referente ao pico de onda máximo do grupo cromóforo (663nm) e o correspondente ao pico secundário (413nm).

A diminuição dos valores de absorbância no pico de onda máximo durante a descoloração de corantes têxteis se dá predominantemente por adsorção e por biodegradação. No caso quando ocorre adsorção, todos os picos decrescem na mesma proporção. Na biodegradação ocorre um decréscimo do pico de onda máximo ou existe a formação de novos picos no espectro, provavelmente resultante das absorbâncias de metabólitos ou fragmentos da molécula do corante após a degradação (Daneshvar et al. 2007). Cao et al. (1999) determinaram que na biodegradação o pico de onda máximo relativo ao grupo cromóforo também pode mudar para outro comprimento de onda de maior intensidade dependendo do corante avaliado.

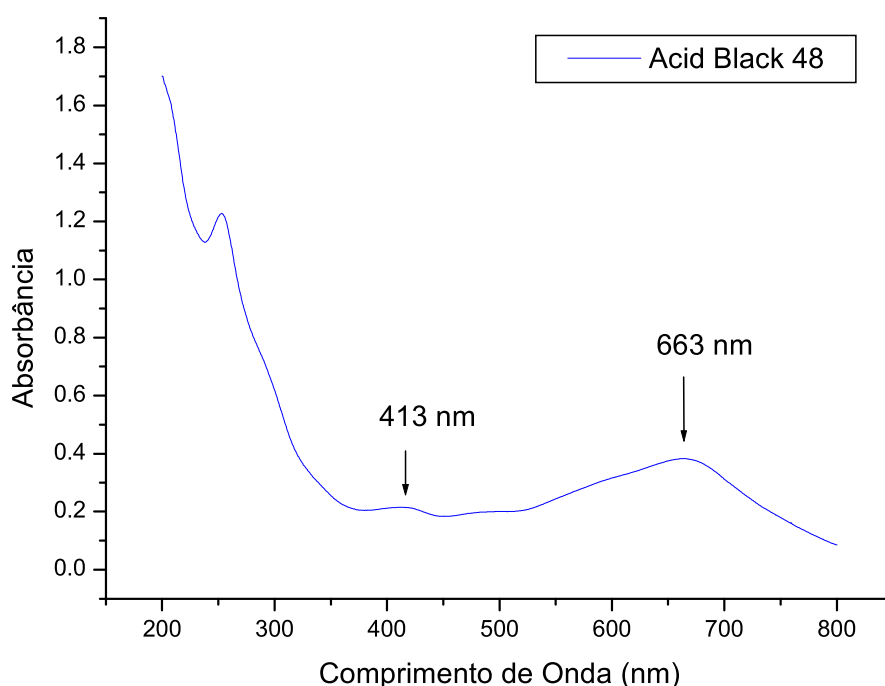


Figura 21: Varredura do Corante Acid Black 48, na concentração de $100\mu\text{g.mL}^{-1}$, com indicações dos picos de comprimento de onda máximo e secundário no pH 2,50 e. Leitura em espectrofotômetro UV-Vis com cubeta de quartzo de caminho óptico de 5mm.

Após as análises dos valores de absorbância relativa para o tratamento com *S. cerevisiae* imobilizada e livre, determinou-se que existe diferença estatística para ambos os tratamentos em relação ao controle. Os resultados do teste de Kruskal-Wallis indicam 2 graus de liberdade $p=0,0002$. Para que ocorra diferença estatística nos tratamentos o valor de p deve ser menor que 0,05, portanto ambos os testes analisados apresentam diferença estatística. A figura 22 indica as comparações através do método de Dunn em relação aos postos médios do controle e os dois tratamentos em que o corante foi submetido.

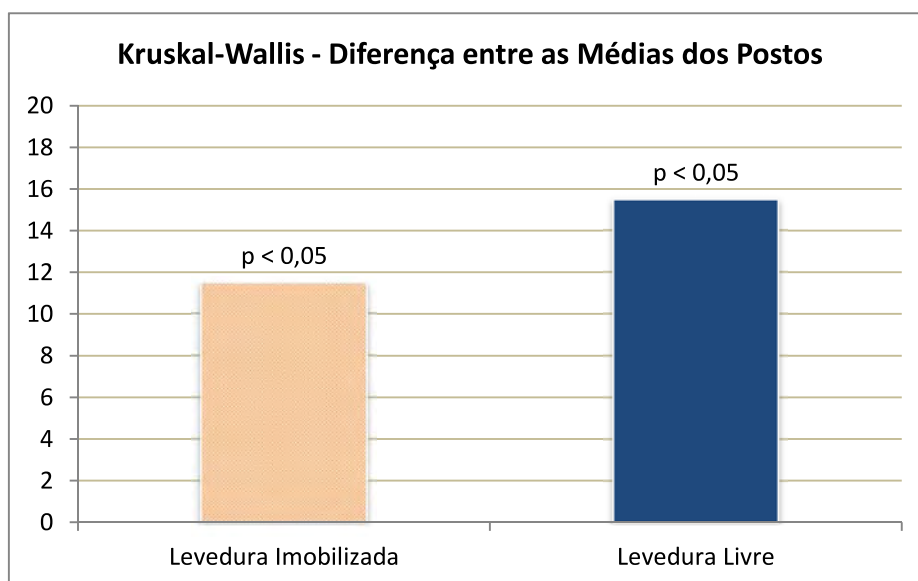


Figura 22: Teste de Kruskal-Wallis (método de Dunn). Comparações dos valores de absorbância relativa A^{663}/A^{413} após o contato de *S. cerevisiae* livre e imobilizada com o Corante Acid Black 48. Graus de Liberdade = 2, $p=0,0002$.

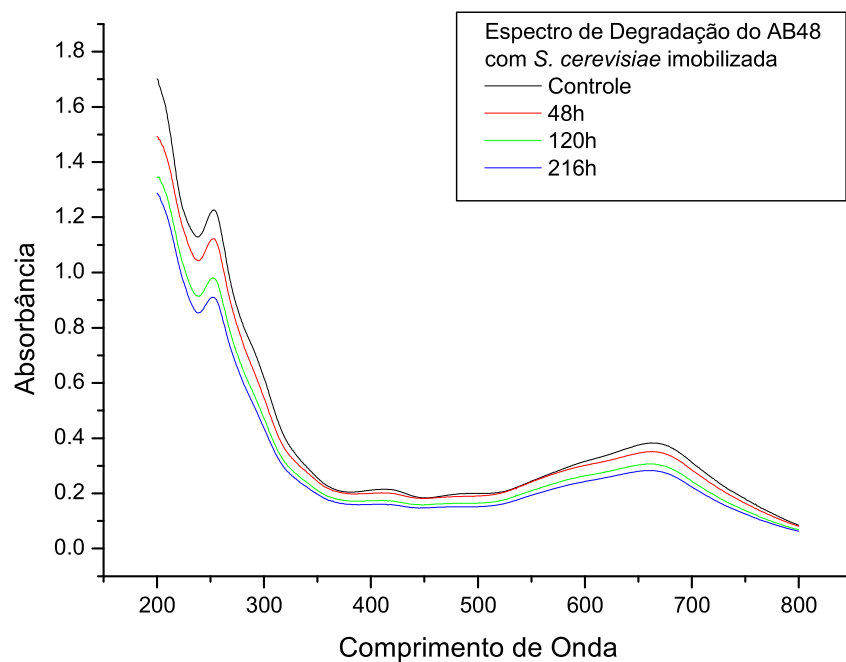


Figura 23: Espectro de absorbância do corante Acid Black 48 em solução aquosa no pH 2,50, após a interação com *S. cerevisiae* imobilizada em bagaço de cana de açúcar à uma temperatura de 30°C. Varreduras avaliadas após 48, 120 e 216 horas.

Analisando-se apenas as varreduras espectrais de degradação do Acid Black 48 após 48, 120 e 216h para o teste com *S. cerevisiae* imobilizada não é possível observar diferenças significativas. Porém quando analisamos os dados de absorbância relativa A^{663}/A^{413} em relação à solução controle, observa-se uma grande variação ao longo do tempo (Figura 24).

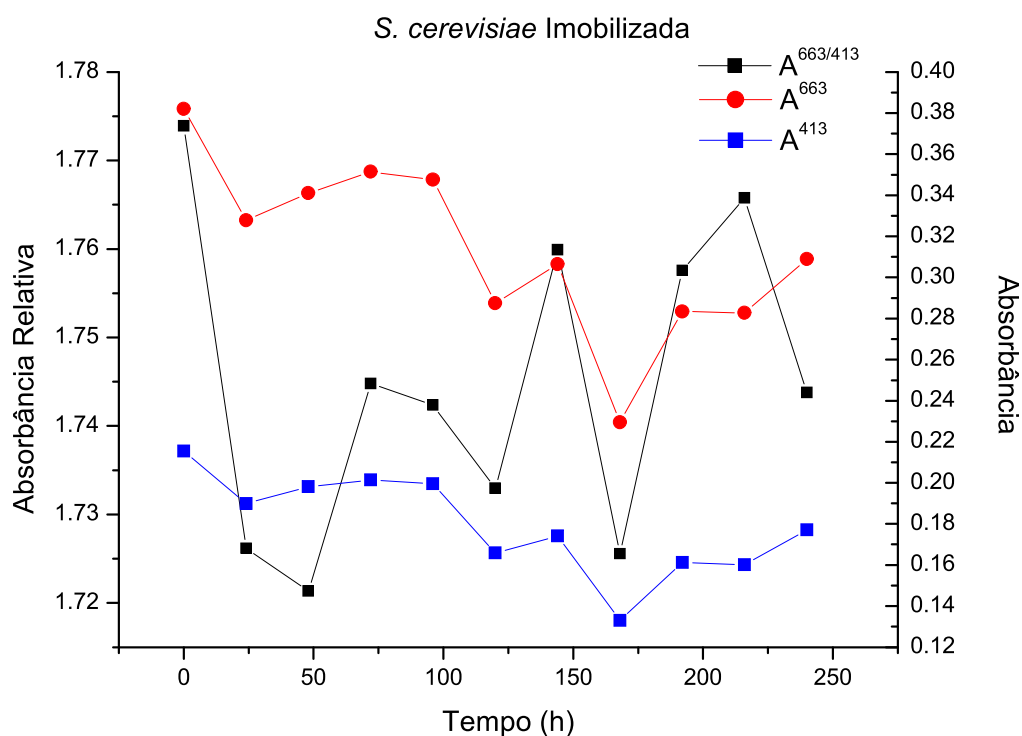


Figura 24: Absorbâncias dos grupos cromóforo (663nm) e secundário (413nm) e os valores de absorbância relativa a cada 24 horas, após o contato do corante com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada com bagaço de cana tratado com PEI.

A descoloração do corante foi observada, e conseqüentemente ocorreu uma diminuição dos valores de absorbância do grupo cromóforo, esta se deve a adsorção, biossorção e biodegradação. Estes resultados estão em concordância com Glenn e Gold (1983), que determinam que quando ocorrem diferenças significativas nos valores de absorbância relativa existe processo de degradação do corante.

Na análise da varredura do corante Acid Black 48 após o contato com *S. cerevisiae* livre, também se pode constatar uma possível ocorrência de processos

biodegradativos (Figura 25). Nestes ensaios ocorreu uma alta redução tanto nos picos de onda relativos ao grupo cromóforo tanto como no secundário.

Barreto et al. (2011) avaliaram a degradação por espectrofotômetro UV-Vis de um consórcio de corantes (Amarelo Procion, Azul Procion, e Vermelho Procion) através do fungo *Ganoderma sp.* Estes autores identificaram a perda degradativa da absorbância dos picos de onda máximo de cada corante indicando uma degradação significativa. Neste trabalho, os autores utilizaram ensaios de 12, 24, 48 e 72h.

Daneshvar et. al (2007) analisaram através de espectrofotometria UV-Vis a degradação do corante Verde de Malaquita utilizando algas como fonte de biomassa. Neste trabalho os autores observaram a diminuição do pico de onda máximo (613 nm) porém também determinaram a ocorrência de três novos picos na região de 200 nm, 300 nm e 400 nm.

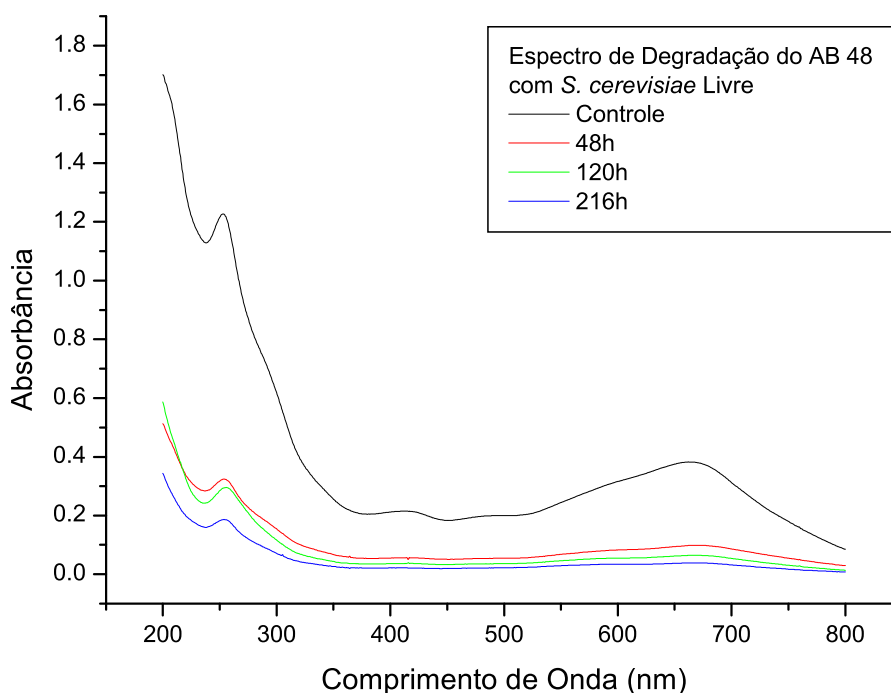


Figura 25: Espectro de absorvância do corante Acid Black 48 em solução aquosa no pH 2,50, após a interação com *S. cerevisiae* livre à uma temperatura de 30°C. Varreduras avaliadas após 48, 120 e 216 horas.

Analisando-se os valores absorbância relativa A^{663}/A^{413} nos testes utilizando *Saccharomyces cerevisiae* livre, estes apresentam uma maior variação em relação ao teste anterior indicando também a ocorrência de biodegradação.

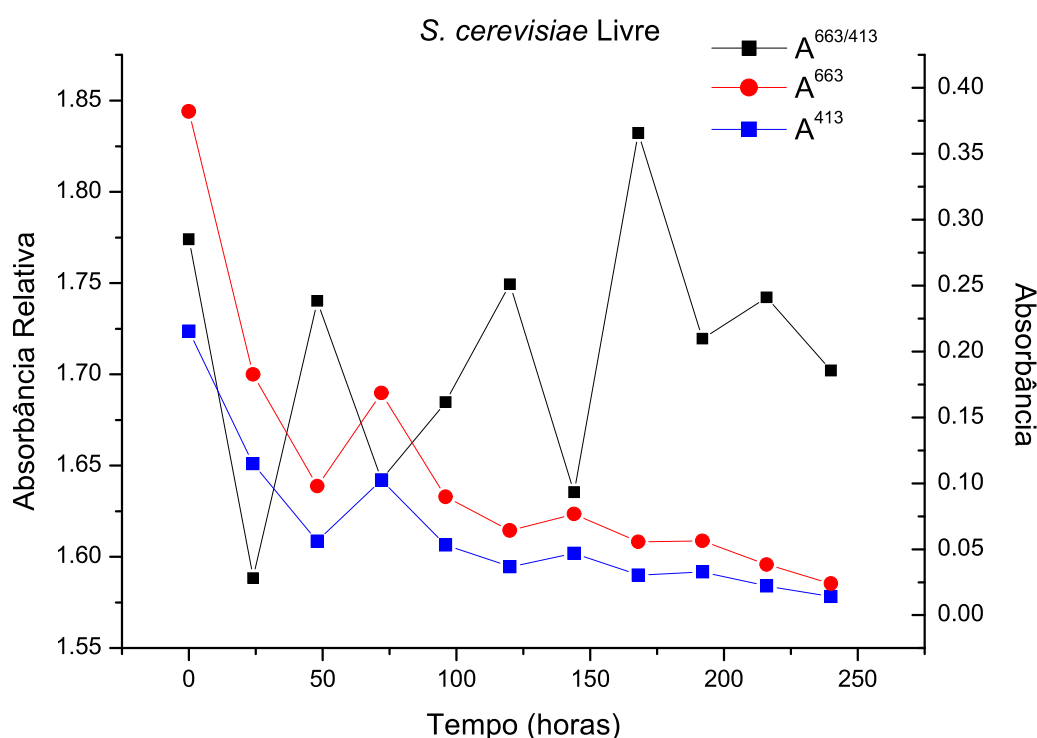


Figura 26: Absorbâncias dos grupos cromóforo (663nm) e secundário (413nm) e os valores de absorbância relativa a cada 24 horas, após o contato do corante com *Saccharomyces cerevisiae* livre.

Apesar dos valores de absorbância relativa indicarem a ocorrência de processos de biodegradação, não foi possível observar a formação de novos metabólitos através da espectrometria por UV-Vis. Portanto, para uma análise mais específica das quebras de ligações ocorridas na molécula do corante utilizou-se o espectrofotômetro FT-IR.

Segundo Santos (2011) e Rodrigues (2010), a avaliação da biodegradação de corantes através de espectrofotômetro UV-Vis e comparação dos valores de absorbância relativa pode apresentar indícios de degradação, porém esta é uma técnica que deverá ser confirmada com espectrofotometria em FT-IR.

5.7.2 Análise por espectrofotômetro FT-IR

A espectroscopia de FT-IR é essencialmente uma técnica para micro amostras. O FT-IR promove o exame visual e documentação da área que foi exposta à radiação IR (EVORA et al., 2002). Diferentemente das radiações nas regiões de UV-Vis, que ao incidirem sobre uma molécula causam transições eletrônicas, a radiação infravermelha causa alteração nos modos rotacionais e vibracionais das moléculas. O espectro na região de 4000 à 400 cm^{-1} é a região mais importante quando se trata de caracterizar compostos orgânicos, normalmente apresentando bandas de adsorção em vez de linhas, isso por que, para cada mudança de nível vibracional, está associada uma série de transições rotacionais (BARBOSA, 2007).

5.7.2.1. Caracterização do espectro do corante Acid Black 48

Através da figura 27 é possível identificar as bandas de maior relevância referente a caraterização do Acid Black 48. A tabela 6 expressa a estrutura correspondente de acordo com a literatura de cada banda detectada.

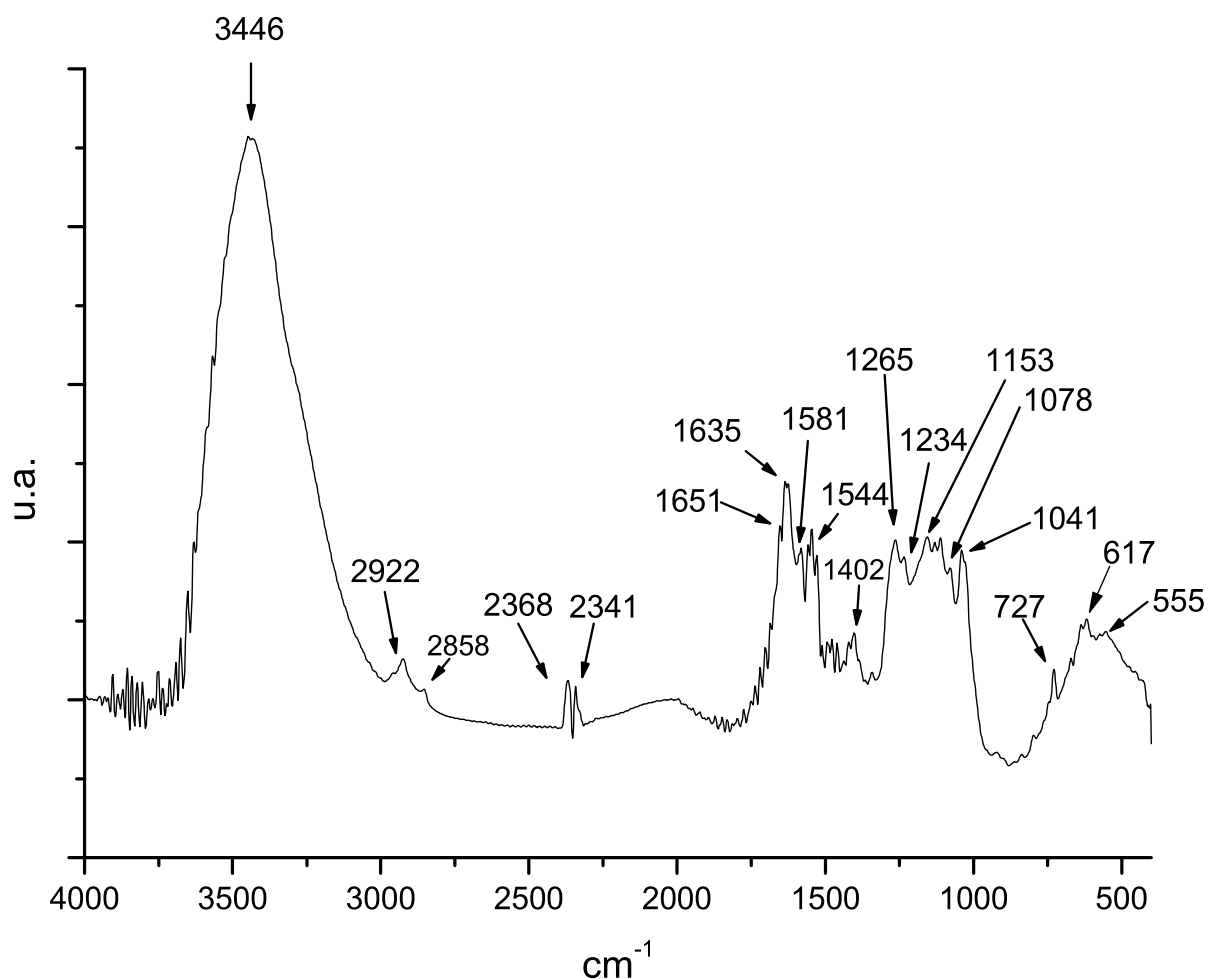


Figura 27: Espectro em FT-IR do corante Acid Black 48 na região de 4000 à 400 cm^{-1} através da leitura de pastilhas elaboradas com KBr.

Tabela 6: Bandas correspondentes ao Acid Black 48 controle e suas respectivas identificações na literatura.

Bandas AB48	Estrutura correspondente de acordo com a literatura.
3446	Amina primária na região de (3500-2500 cm^{-1}) (EVORA et al., 2002). Aminas primárias livres (SILVERSTEIN et al., 1979).
2922	Grupo funcional CH_2 , modo vibracional Va. (ROMÃO, 2003)
2858	Grupo funcional CH_2 , modo vibracional Vb. (ROMÃO, 2003)
2368 e 2341	CO_2 residual (BARBOSA, 2007)
1651	$\text{C}=\text{O}$ (ROMÃO, 2003); Vibração da ligação $\text{C}=\text{C}$ com a vibração da ligação simples $=\text{C}-\text{C}$ em compostos aromáticos (BARBOSA, 2007).
1635	Ligações (C-O) (FARSANI et al., 2009); Deformação axial de C-N

	(ALMEIDA, 2008); Dobramento de aminas primárias NH_2 (STUART, 2004).
1581	NH_2 , modo vibracional δ (ROMÃO, 2003)
1544	Estiramento ($\text{C}=\text{C}$) (ARJUNAN et al., 2004). Estiramento $\text{C}-\text{N}$ e dobramento de aminas secundárias $\text{N}-\text{H}$ $1560\text{-}1530\text{ cm}^{-1}$ (STUART, 2004).
1402	Grupo sulfônico (BARBOSA, 2007); Aminas Livres (WHARFE et al., 2010).
1265	Vibração de $\text{C}-\text{N}$ (DEVI e GAYARTHRI, 2010); $\text{C}=\text{O}$ (DUTRA et al., 1995); Amino Benzeno (SILVERSTEIN et al., 1979).
1234	Vibrações $\text{C}=\text{O}$ (EL-KABBANY et al., 2010).
1153	$\delta\text{ C}-\text{H}$, referente ao anel aromático (CHERDOUD-CHIHANI et al., 2003) e referente ao grupo sulfonatos (SO_3) (SILVERSTEIN et al., 1994). Bandas de aminas $1200\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ (STUART, 2004).
1078	Característica aromática do corante (DHANVE et al., 2009) e vibração ($\text{C}-\text{C}$), ($\text{C}-\text{O}$) e ($\text{C}-\text{N}$) (ALIPRANDINI, 2010; DEVI et al., 2010).
1041	Ligação $\delta\text{ C}-\text{H}$ do anel aromático (ABBAS et al., 2008; CHERDOUD-CHIHANI et al., 2003). Alongamento de $\text{S}=\text{O}$, $1060\text{-}1020$ (STUART, 2004).
727	NH_2 , NH e CH_2 (EVORA et al., 2002; ROMÃO, 2003; SILVERSTEIN et al., 1994). Característica de aminas secundárias ($750\text{-}700\text{ cm}^{-1}$) (BARBOSA, 2007).
617	Banda de deformação angular fora do plano de $\text{N}-\text{H}$ para aminas secundárias (BARBOSA, 2007).
555	$\text{H}-\text{C}-\text{C}$ e $\text{C}-\text{C}-\text{C}$ do esqueleto da molécula do corante (CHERDOUD-CHIHANI et al., 2003).

A molécula do corante Acid Black 48 apresenta aminas alifáticas primárias e secundárias. Sendo assim, de acordo com a literatura seria esperado o surgimento de duas bandas de fraca intensidade na região de $3550\text{-}3330\text{ cm}^{-1}$ e outra em $3450\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$. No espectro do corante Acid Black 48, figura 27, a maior banda observada é em 3437 cm^{-1} , o que caracteriza o grupo amina, porém não é comum em aminas alifáticas

primárias a presença de bandas de grande intensidade. Segundo Barbosa (2007), quando o espectro é obtido com a amostra em estado sólido, pode ocorrer a formação de ligações de hidrogênio, o que pode resultar no alargamento e superposição dessas bandas levando à observação de apenas uma banda entre $3450\text{-}4250\text{ cm}^{-1}$.

Outro grupo bastante importante no corante analisado é o grupo carbonila (C=O), que apresenta uma ampla faixa de número de ondas que vai de aproximadamente 1850 cm^{-1} a 1610 cm^{-1} (BARBOSA, 2007). Para o AB 48 duas bandas foram observadas em 1651 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} ambas referente à ligação (C-O).

5.7.2.2. Análise na influência do Polietilenoimina e do bagaço de cana de açúcar no espectro do corante

Antes de iniciar a avaliação dos testes utilizando *S. cerevisiae* livre e imobilizada, avaliaram-se as possíveis bandas que poderão surgir nos gráficos de FT-IR após o contato com o PEI e com o bagaço de cana de açúcar. O objetivo desta análise foi determinar novas bandas que não estavam presente no espectro do corante e que não são resultantes dos possíveis metabólitos nos testes de degradação com a levedura.

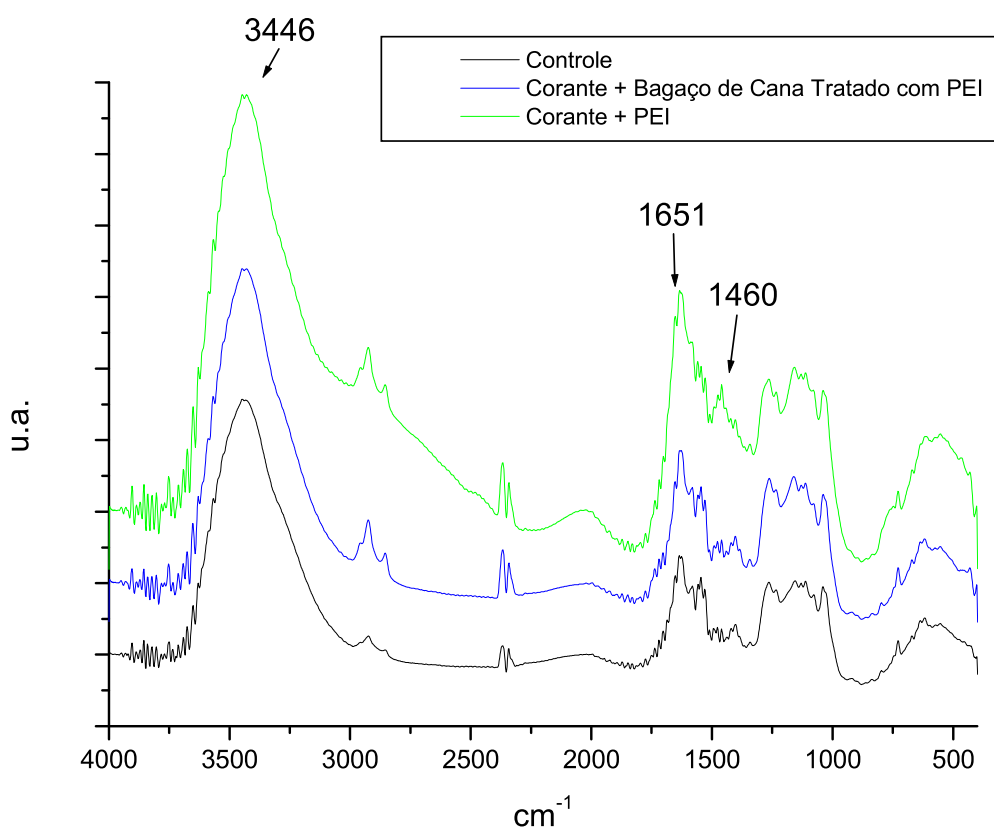


Figura 28: Espectro em FT-IR do corante Acid Black 48 na região de 4000 à 400 cm^{-1} após o contato por 24h com bagaço de cana de açúcar tratado com polietilenoimina e somente polietilenoimina. Leitura na forma de pastilhas na proporção de 1 mg de amostra (peso seco) para 149 mg de KBr.

Comparando-se o espectro do controle de Acid Black 48 puro com o corante em contato com bagaço de cana e em contato com o PEI (Figura 28), observa-se apenas o surgimento e deslocamento de novas bandas no tratamento com PEI, para o espectro do corante apenas em contato com bagaço de cana tratado houve apenas a diminuição de intensidade de algumas bandas. A banda em 3446 cm^{-1} original do controle referente a amins primárias teve um aumento significativo no espectro do corante com PEI. Estas mudanças se devem principalmente interação do grupo amino com as moléculas de água presentes na solução e da interação do polietilenoimina na solução em que o corante foi submetido.

Segundo Silverstein et al. (1994), as amins secundárias, 50% da molécula de polietilenoimina, mostram uma única banda na região de 3.350 e 3.310 cm^{-1} . Estas duas

correspondências de estrutura confirmam as moléculas presentes no PEI, que é um polímero de cadeia longa contendo 25% de sua composição com aminas primárias.

A banda referente às ligações C=O (BARBOSA, 2007) em 1651 cm^{-1} teve um aumento de intensidade. Estas alterações se devem principalmente às mudanças que ocorreram nas ligações C=O presentes nos anéis aromáticos da molécula do corante com polietilenoimina, uma das alterações pode ter sido a interação do oxigênio altamente eletronegativo com a molécula do PEI.

Outra banda em 1460 cm^{-1} , referente ao espectro do corante em contato com o PEI, que corresponde a deformação angular do (C-H) presente na molécula do corante ou do polietilenoimina teve um aumento em relação ao controle (SILVERSTEIN et al., 1994).

Quando o corante foi submetido a uma solução de polietilenoimina, observa-se um aumento das bandas referentes a grupos aminos, principalmente em 3446 cm^{-1} . Porém, após o contato do corante com o bagaço de cana tratado observamos que em relação ao controle, o espectro para este tratamento não apresentou deslocamentos e/ou alterações de bandas, o que indica que não ocorrem alterações na molécula do corante apenas com o contato com o bagaço de cana.

5.7.2.3. Análise de degradação do corante Acid Black 48 após o contato com *S. cerevisiae* imobilizada e livre por 72 horas.

Ao analisar os espectros do corante em contato com levedura imobilizada e livre em relação ao controle contendo o corante apenas, observou-se que somente ocorreram alterações após 72 horas na região de $2000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$. Nas demais regiões, o espectro do corante não sofreu alterações.

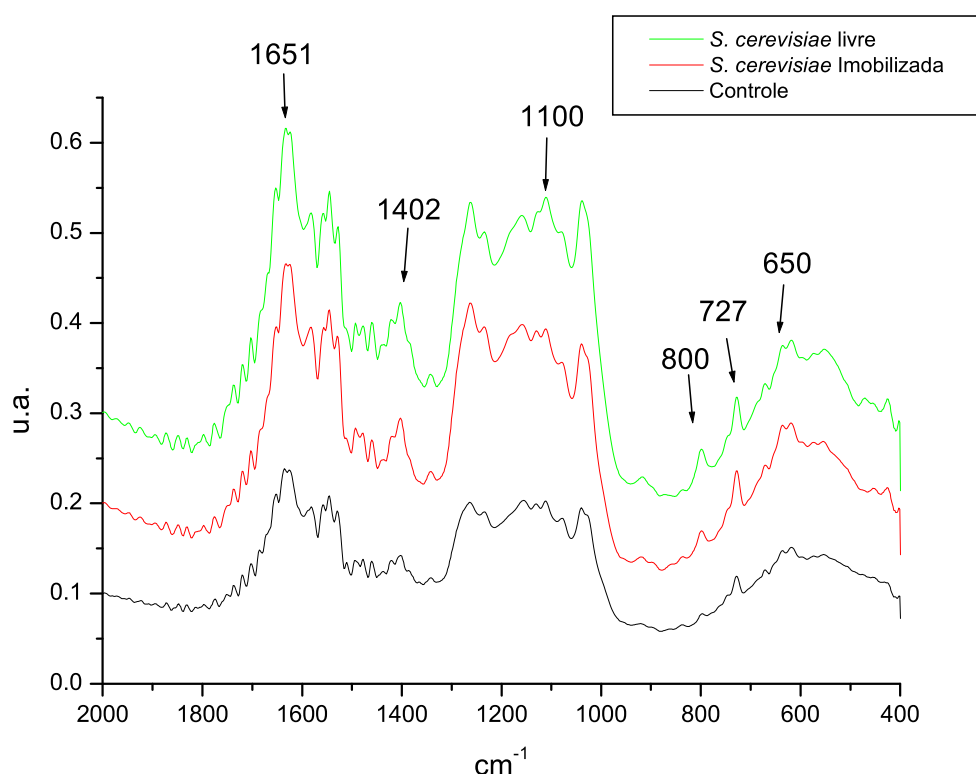


Figura 29: Espectro em FT-IR do corante Acid Black 48 na região de 2000 à 400 cm^{-1} após 72 horas de contato com *S. cerevisiae* livre e imobilizada em bagaço de cana tratado com PEI. Leitura na forma de pastilhas na proporção de 1 mg de amostra (peso seco) para 149 mg de KBr.

Na figura 29, é possível observar um leve aumento de intensidade da banda em 1651 cm^{-1} no espectro do corante em contato com a levedura livre. De acordo com Romão (2003) a banda em 1651 cm^{-1} é um indicador uma vibração de (C=O), o e neste caso a alteração da intensidade desta banda poderia indicar modificações nesta ligação.

O aumento de intensidade da banda em 1402 cm^{-1} , para o espectro do corante após o contato com *S. cerevisiae* livre, indica alterações nas ligações referentes ao grupo sulfônico (SO_3). Segundo Silverstein et al. (1994) o aumento ou diminuição desta banda está diretamente relacionado com a interação dos grupos sulfônicos com cloro. Já que o pH do meio foi ajustado com HCl, existe a possibilidade de que os grupos sulfônicos presentes no corante tenham interagido com o Cl^- presente no meio. O aumento desta banda é observado em ambos os espectros provenientes da interação de *S. cerevisiae* com o corante. Porém, segundo Dyer (1969), bandas na região de 1410-1310 podem apresentar indícios de presença de fenóis. Como na molécula original do

corante ocorre a presença de grupos C=O no anel aromático, existe a possibilidade destas ligações terem sido quebradas resultando na formação de fenóis.

Outra banda que houve um leve aumento de intensidade no espectro do corante em contato com *S. cerevisiae* livre e imobilizada foi em 1100 cm^{-1} , esta que segundo Fanchiang e Tseng (2009) indica a presença de grupos aminos. Portanto, na molécula do AB 48 encontra-se uma amina secundária ligando duas sequências de três anéis aromáticos. Sendo assim, o surgimento dessa banda possivelmente seria um indicador da quebra da ligação da amina secundária formando novas aminas primárias.

A banda representada em 800 cm^{-1} de acordo com Barbosa (2007) também se refere à presença de aminas primárias. De acordo com Stuart (2004) a região de $850\text{--}750\text{ cm}^{-1}$ indica a torção do NH_2 . Na molécula do AB 48 encontra-se uma amina secundária que ligando duas sequências de três anéis aromáticos. Sendo assim, o surgimento dessa banda possivelmente seria outro indicador da formação de novas aminas primárias. Assim como nas bandas em 800 cm^{-1} , a banda em 727 cm^{-1} da molécula original do corante também sofreu um aumento, indicando alterações nas ligações de NH_2 , NH e CH_2 (EVORA et al., 2002; SILVERSTEIN et al., 1994; ROMÃO, 2003), o que novamente são indicadores de possíveis alterações nas aminas presentes no corante.

Segundo Silverstein et al. (1979) a banda em 650 cm^{-1} indica a presença de grupos fenólicos, esta que teve um pequeno aumento em relação ao espectro do controle. Portanto assim como a banda em 1402 cm^{-1} , a banda em 650 cm^{-1} também indica uma possível alteração nas ligações C=O presentes na molécula original do corante dando origem a compostos fenólicos.

Bandas que surgiram ou que foram alteradas após o contato de *S. cerevisiae* livre e imobilizada com o corante Acid Black 48 por 72 horas:

1651 cm⁻¹: indicador uma vibração de (C=O) (ROMÃO, 2009).

1402 cm⁻¹: alterações nas ligações referentes ao grupo sulfônico (SILVERSTEIN et al. 1994) ou fenóis (DYER, 1969).

1100 cm⁻¹: grupo amino (FANCHIANG e TSENG, 2009).

800 cm⁻¹: aminas primárias (BARBOSA, 2007; STUART, 2004).

727 cm⁻¹: grupo amino (EVORA et al., 2002; ROMÃO, 2003; SILVERSTEIN et al., 1994).

650 cm⁻¹: grupos fenólicos (SILVERSTEIN et al., 1979).

Sendo assim, os espectros dos ensaios de degradação do Acid Black 48 após 72 horas indicam possíveis quebras de ligações da molécula inicial do corante tanto para os ensaios utilizando *Saccharomyces cerevisiae* livre como imobilizada. A partir de 72 horas já se pode determinar prováveis alterações na molécula do corante indicando possíveis formações de fenóis e aminas primárias.

5.7.2.4. Análise de degradação do corante Acid Black 48 após o contato com *S. cerevisiae* imobilizada e livre por 144 horas.

Após 144 horas, novamente não houve alteração no espectro de ambos os ensaios de degradação na região de 4000 à 2000 cm⁻¹, porém entre 2000 à 400 cm⁻¹ houveram alterações significativas nos espectros referentes aos dois ensaios em que o corante foi submetido (Figura 30).

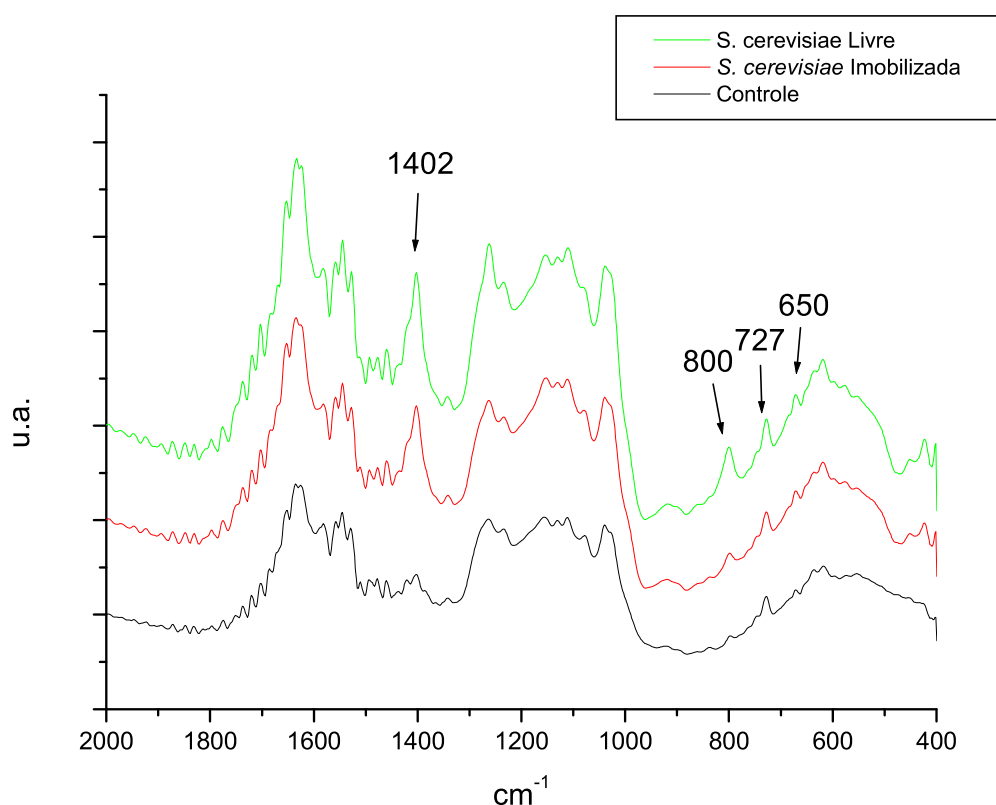


Figura 30: Espectro em FT-IR do corante Acid Black 48 na região de 2000 à 400 cm^{-1} após 144 horas de contato com *S. cerevisiae* livre e imobilizada em bagaço de cana tratado com PEI. Leitura na forma de pastilhas na proporção de 1 mg de amostra (peso seco) para 149 mg de KBr.

Nos espectros de infravermelho após 144h observa-se um aumento ainda mais intenso da banda em 1402 cm^{-1} no espectro para ambos os tratamentos, porém mais acentuado para o tratamento com *S. cerevisiae* livre, o que é um possível indicador da presença de compostos fenólicos (DYER, 1969). Estes resultados já haviam sido identificados para o tratamento com levedura livre após 72 horas.

A análise dos espectros após 144 horas permite concluir um possível aumento da interação das enzimas sintetizadas pela levedura nos processos de degradação. Porém a diferença de intensidade da banda em 1402 cm^{-1} entre os espectros com *S. cerevisiae* possivelmente está em que a imobilização da levedura no bagaço de cana de açúcar faz com que parte das células de levedura esteja ligada ao suporte e, portanto não tenha o contato necessário com o corante. As células livres por sua vez, possuem toda a sua superfície em contato com a solução corante.

Apesar dos ensaios contendo *S. cerevisiae* apresentarem possíveis evidências de degradação através dos espectros após 144h. As bandas em 727 e 650 cm^{-1} apresentaram apenas um pequeno aumento em relação aos espectros após 72 horas. No entanto, a banda em 800 cm^{-1} , referente à presença de amins primárias no composto (BARBOSA, 2007), teve um aumento significativo de intensidade apenas nos testes com levedura livre. Este aumento é novamente um provável indicador do aumento das enzimas degradativas da *S. cerevisiae* livre.

Bandas que surgiram ou que foram alteradas após o contato de *S. cerevisiae* livre e imobilizada com o corante Acid Black 48 por 144 horas:

1402 cm^{-1} : alterações nas ligações referentes ao grupo sulfônico (SILVERSTEIN et al. 1994) ou fenóis (DYER, 1969).

800 cm^{-1} : amins primárias (BARBOSA, 2007; STUART, 2004).

727 cm^{-1} : grupo amino (EVORA et al., 2002; ROMÃO, 2003; SILVERSTEIN et al., 1994).

650 cm^{-1} : grupos fenólicos (SILVERSTEIN et al., 1979).

5.7.2.5. Análise de degradação do corante Acid Black 48 após o contato com *S. cerevisiae* imobilizada e livre por 240 horas

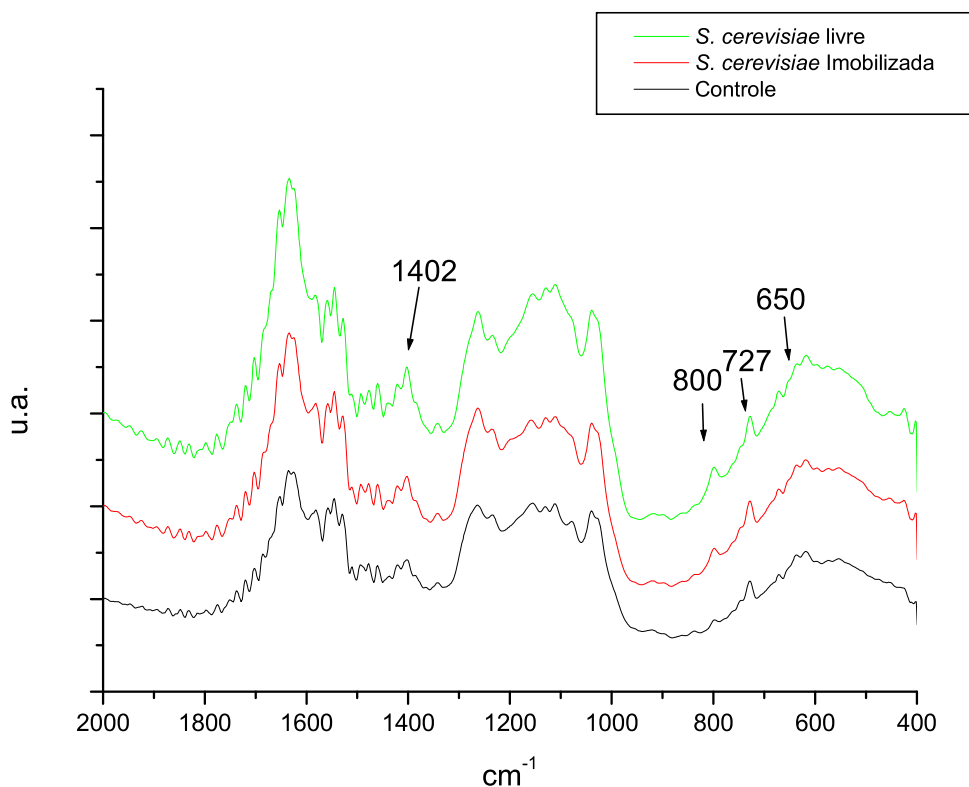


Figura 31: Espectro em FT-IR do corante Acid Black 48 na região de 2000 à 400 cm⁻¹ após 240 horas de contato com *S. cerevisiae* livre e imobilizada em bagaço de cana tratado com PEI. Leitura na forma de pastilhas na proporção de 1 mg de amostra (peso seco) para 149 mg de KBr.

Após 240 horas, assim como nos testes após 144 horas, é possível identificar mudanças significativas na região de 2000 à 400 cm⁻¹ em relação ao controle para ambos os ensaios contendo *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 31). Porém em relação aos testes após 72 e 144h não ocorrem grandes diferenças nos espectros de ambos os tratamentos após 240 horas. Isto indica que a obtenção de novos metabólitos de moléculas ainda menores deve ocorrer após um intervalo de tempo maior.

5.7.2.6. Provável via de biodegradação do corante Acid Black 48.

Através dos espectros de FT-IR analisados anteriormente fica evidente que ocorreram alterações na molécula do corante Acid Black 48. Estas alterações indicam possíveis processos de degradação das enzimas sintetizadas pela levedura. Sendo assim, a partir da molécula inicial do corante e as alterações observadas no espectro, é possível estimar a formação de novos compostos nos processos degradativos. (Figura 32).

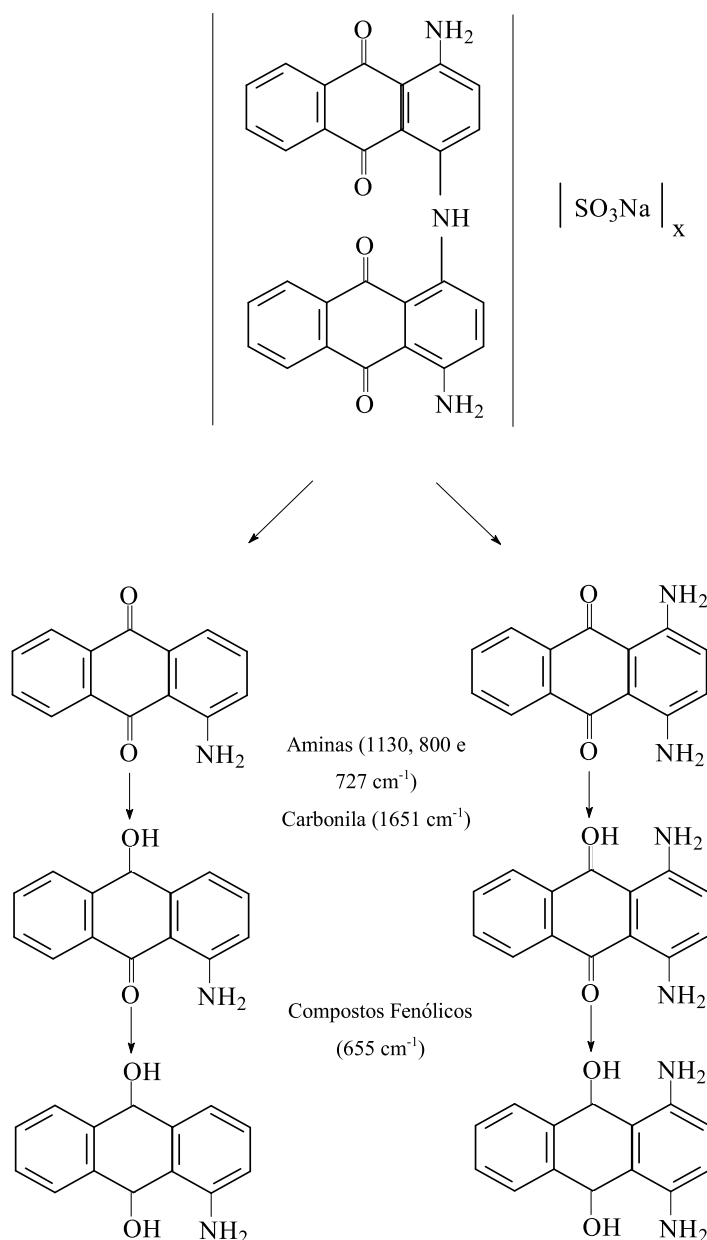


Figura 32: Possíveis moléculas formadas a partir do corante Acid Black 48 nos processos degradativos utilizando-se *S. cerevisiae*.

6. CONCLUSÕES

Os três tratamentos (água destilada, NaOH e polietilenoimina) foram eficientes para a remoção de açúcar remanescente do bagaço de cana. O tratamento com PEI, por sua vez, se mostrou o mais promissor para a remoção da quantidade de sacarose remanescente do bagaço assim como na imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*.

Quando se avalia a quantidade de biomassa de levedura por mg de bagaço, as melhores taxas de imobilização celular foram obtidas através 50 ml de uma suspensão de levedura na concentração de 1% em 0,5 g de bagaço de cana de açúcar. Sendo que uso de polietilenoimina no tratamento de bagaço de cana foi mais eficiente nas taxas de imobilização de levedura em relação aos tratamentos com NaOH e água destilada.

Os processos biossorbitivos do corante Acid Black 48, para o tratamento com *S. cerevisiae* livre e imobilizada, e adsortivos, para o tratamento apenas com o bagaço de cana, foram satisfatórios em todos os valores de pH analisados (2,50, 4,50 e 6,50). Porém a remoção do corante foi mais eficiente no pH 2,50 utilizando-se *S. cerevisiae* livre e imobilizada em bagaço de cana tratado com PEI. Quando se avalia a capacidade adsortiva do corante, o pH 2,50 apresenta-se também como o mais eficiente por uma

grande diferença entre os demais pHs avaliados. Os tratamentos que envolvem o uso de levedura para remoção do corante apresentam também maior capacidade adsortiva em relação aos demais tratamentos.

Sendo assim, o uso de bagaço de cana para remoção de corantes têxteis ainda se mostra menos eficiente em relação ao uso de células livres de *Saccharomyces cerevisiae*, porém a utilização de células imobilizadas aumenta cerca de 20 a 40% em relação ao simples uso do bagaço.

A utilização do espectrofotômetro UV-Vis e FT-IR se mostrou bastante eficiente para a análise dos ensaios degradativos utilizando *S. cerevisiae* livre e imobilizada em bagaço de cana tratado com PEI no pH 2,50.

As análises UV-Vis apresentaram valores significativos de absorbância relativa indicando a ocorrência de biodegradação em ambos os tratamentos avaliados. Estes resultados foram comprovados novamente através dos espectros de FT-IR, através dos quais foram detectadas bandas indicando prováveis alterações na molécula do corante, assim como a possível formação de novas aminas primárias e compostos fenólicos. A formação destes compostos, tóxicos e carcinogênicos, deve ser controlada nos tratamentos industriais de biodegradação do corante Acid Black 48, que requer de um período maior de retenção para a remoção completa dos novos metabólitos formados.

Portanto o uso de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bagaço de cana é bastante promissor para a bioissorção e biodegradação no tratamento de efluentes têxteis.

Apesar dos melhores resultados de bioissorção e biodegradação terem sido observados utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae* livre, a alta capacidade de remoção do corante com células imobilizadas em bagaço de cana tratado é de interesse industrial, uma vez que as células livres permanecem em suspensão por um longo período de tempo, já as células imobilizadas são de fácil decantação e remoção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, C. O.; REUFA, C.; DUPUY, N.; KISTER, J. FTIR-Multivariate curve resolution monitoring of photo-feton degradation of phenolic aqueous solutions comparison with HPLC as reference method. *Talanta*, v. 77, p. 200-209, 2008.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 5, n. 26, p. 52-55, 2002.

AKAR S. T.; ÖZCAN, A. S.; AKAR, T.; ÖZCAN, A.; KAYNAK, Z. Biosorption of a reactive textile dye from aqueous solutions utilizing an agro-waste. *Desalination*, v. 249, p. 757-761, 2009.

AKAR, S. T.; GORGULU, A.; AKAR, T.; CELIK, S.;. Decolorization of Reactive Blue 49 contaminated solutions by *Capsicum annuum* seeds: Batch and continuous mode biosorption applications. *Chemical Engineering Journal*, v. 168, p. 125-133, 2011.

AKAR, T.; CELIK, S.; AKAR, S. T. Biosorption performance of surface modified biomass obtained from *Pyracantha coccinea* for the decolorization of dye contaminated solution. *Chemical Engineering Journal*, v. 160, p. 466-472, 2010.

AKSU K.; KARABAYIR, G. Comparison of biosorption properties of different kinds of fungi for the removal of Gryfalan Black RL metal-complex dye. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 7730-7741, 2008.

AKSU, Z. Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1347-1444, 2003.

ALIPRANDINI, P. *Primer de poli(5-amino-1-naftol) obtido por eletrossíntese*. 2010. 54f. Monografia (Trabalho de Diplomação em Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

ALMEIDA, A. C. M. *Estudo da biodegradação de corantes azóicos por inóculo proveniente de biodigestor anaeróbio de alimentos*. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2008.

AMARA, M.; KERDJOU DJ, H. Modification of cation-exchange membrane properties by electro-adsorption of polyethyleneimine. *Desalination*, v. 155, p. 79-87, 2003.

AMIN, N. K. Removal of reactive dye from aqueous solutions by adsorption onto activated carbons prepared from sugarcane bagasse pith. *Desalination*, v. 223, p. 152-161, 2008.

ANDERSON, M. M.; HATTI-KAUL, R. Protein stabilising effect of polyethyleneimine. *Journal of Biotechnology*, v. 72, p. 21-31, 1999.

ARJUNAN, V.; SUBRAMANIAN, S.; MOHAN, S. FTIR and FTR spectral studies of 2-amin-6-bromo-3-formylchromone. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 60, n. 5, p. 995-1000, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUM), *Corantes e pigmentos – Definição*, 2012. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/corantes/cor.asp>>. Acesso em: 24 jan. 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL (ABIT), *Comércio Exterior*, 2012. Disponível em: <<http://www.abit.org.br>>. Acesso em: 24 jan. 2012.

AZHAR, S. S.; LIEW, G.; SUHARDY, D.; HAFIZ, K. F.; HATIM, M. D. Dye Removal from Aqueous Solution by using Adsorption on Treated Sugarcane Bagasse. *American Journal Of Applied Sciences*, v. 2, n. 11, p. 1499-1503, 2005.

BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. O emprego de fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae*, na síntese de feromônios. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 421-431, 2004.

BARBOSA, L. C. A. Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos, Editora UFV, 2007, 189 p.

BARRETO, J. W.; BERNARDINO N. D.; AFONSO, R. Biodegradação de uma mistura de corantes têxteis usando o fungo *Ganoderma sp*: um estudo cinético. *Química Nova*, v. 34, n. 4, p. 568-572, 2011.

BERGMEYER, H. U. Methods of Enzymatic Analysis. London: VCH Publishers (UK), 1988. 90p.

BIBI, I.; BHATTI, H. N.; ASGHER, M.; Comparative study of natural and synthetic phenolic compounds as efficient laccase mediators for the transformation of cationic dye. *Biochemical Engineering Journal*, v. 56, n. 3, p. 225-231, 2011.

BIDDICK, R.; YOUNG, E. T. The disorderly study of ordered recruitment. *Yeast*, v. 26, p. 205-220, 2009.

BIER, C.; DUSENBURY, M. M. Textiles. Encyclopedia of Archeology. Washington, 2007. p. 2119-2125.

BROCARD-MASSON, C.; DUMAS, B. The fascinating world of eteroids: *S. cerevisiae* as a model organism for the study of hydrocortisone biosynthesis. *Biotechnology Genetics Engineering Reviews*, v. 22, p. 213-252, 2006.

BURGESS, R. R. Use of polyethyleneimine in purification of DNA-binding proteins. *Methods in Enzymology*, v. 208, p. 3-10, 1991.

CAO, J.; WEI, L.; HUANG, Q.; WANG, L. HAN, S. Reducing degradation of azo dye by zero-valent iron in aqueous solution. *Chemosphere*, v. 38, n. 3, p. 565-571, 1999.

CARDOSO, M. das G. Análises físico-químicas de aguardente. *Produção de aguardente de cana-de-açúcar*. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 445p.

CHACKO, J. T.; SUBRAMANIAM, K. Enzymatic degradation of azo dyes – A review. *International Journal of Environmental Sciences*, v. 1, n. 6, p. 1250-1260, 2011.

CHEN, J.; LIN, Y. Decolorization of azo dye by immobilized *Pseudomonas luteola* entrapped in alginate–silicate sol–gel beads. *Process Biochemistry*, v.42, p. 934-942, 2007.

CHEN, Y.; PAN, B.; ZHANG, S.; LI, H.; LV, L.; ZHANG, W. Immobilization of polyethylenimine nanoclusters onto a cation exchange resin through self-crosslinking for selective Cu(II) removal. *Journal of Hazardous Materials*, v. 190, p. 1037-1044, 2011.

CHENG, J.; WANOGHO, S. O.; WATSON, N. D.; CADDY, B. The Extraction and classification of dyes from cotton fibres using different solvent systems. *Journal of the Forensic Science Society*, v. 31, p. 31-40, 1991.

CHERDOUD-CHIHANI, A.; MOUZALI, M.; ABADIE, M. J. M. Study of crosslinking acid copolymer/dgeba systems by FTIR. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 87, p. 2033-2051, 2003.

CHRISTIE, R. M. *Color Chemistry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001. 206 p.

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

COELHO, T. C. *Avaliação das condições de imobilização de células de Candida Guilhermondii FTI 20037 em bucha vegetal (Luffa cylindrica) visando a produção de xilitol*. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena. 2007.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). *Acervo do Acompanhamento da Safra Brasileira – Cana de Açúcar*. Brasília, 2012.

CORSO, C. R.; ALMEIDA, A. C. M. Bioremediation of dyes in textile effluents by *Aspergillus oryzae*. *Microbial Ecology*, v. 57, p. 384-390, 2009.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

DALLAGO, R. M.; SMANIOTTO, A.; OLIVEIRA, L. C. A. Resíduos sólidos de curtumes como adsorventes para a remoção de corantes em meio aquoso. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 433-437, 2005.

DANESHVAR, N.; KHATAEE, A. R.; RASOULIFARD, M. H.; POURHASSAN, M. Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: Optimization of effective parameters using Taguchi method. *Journal of Hazardous Materials*, v. 143, p. 214-219, 2007.

DANESHVAR, N.; RABBANI, M.; MODIRSHAHLA, N.; BEHNAJADY, M. A. Critical effect of hydrogen peroxide concentration in photochemical oxidative degradation of C.I. Acid Red 27 (AR27). *Chemosphere*, v. 56, n. 10, p. 895-900, 2004.

DELLAMATRICE, P. M.; *Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuárias de Americana-SP*. 2005. 137 p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, USP, Piracicaba, SP. 2005.

DEVI, G.; DEVI, T. S. R.; GUNASEKARAN, S. FTIR spectroscopy study and cancerous human breast tissues – A run chart analysis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v. 2, n. 2, p. 73-77, 2010.

DEVI, T. S. R.; GAYATHRI, S. FTIR and FT-Raman spectral analysis of paclitaxel drugs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v. 2, n. 2, p. 106-110, 2010.

DHANVE, R. S.; KALYANI, D. C.; PHUGARE, S. S.; JADHAV, J. P. Coordinate action of exiguobacterial oxidoreductive enzymes in biodegradation of reactive yellow 84A dye. *Biodegradation*, v. 20, p. 245-255, 2009.

DIAS, A. A.; LUCAS, M. S.; SAMPAIO, A.; PERES, J. A.; BEZERRA, R. M. F. Decolorization of Azo Dyes by Yeasts. In: ERKUT, H. A. *Biodegradation of Azo Dyes*. Hidelberg: Springer-Verlag, 2010. p. 183-193.

DOS SANTOS, A. B.; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B.; Review paper on current Technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2369-2385, 2007.

DOS SANTOS, J. R. A.; GUSMÃO, N. B.; GOUVEIA, E. R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 12, n. 1, p. 75-80, 2010.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidation enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatments: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, n. 28(2), p. 83–99, 2000.

DUTRA, R. C. L.; TAKAHASHI, M. F. K.; DINIZ, M. F. Importância da preparação de amostras em espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) na investigação de constituintes em materiais compostos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Jan/Mar, p. 41-47, 1995.

DYER, J. R. Aplicações de Espectroscopia de Absorção aos Compostos Orgânicos. São Paulo: Edgard Blucher, 1969.155 p.

EL-KABBANY, F.; TAHA, S.; HAFEZ, M. IR spectroscopic analysis of polymorphism in diphenyl carbazide. *Journal of American Science*, v. 6, n. 8, p. 263-270, 2010.

EL-RAHIN, W. M. A.; EL-ARDY, O. A. M.; MOHAMMAD, F. H. A. The effect of pH on bioremediation potential for the removal of direct violet textile dye by *Aspergillus niger*. *Desalination*, v. 249, p. 1206-1211, 2009.

EVORA, M. C.; GONÇALEZ, O. L.; DUTRA, R. C. L.; DINIZ, M. F.; WIEBECK, H.; SILVA, L. G. A. Comparação de técnicas FTIR de transmissão, reflexão e fotoacústica na análise de poliamida-6-reciclada e irradiada. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 12, n. 1, p. 60-68, 2002.

FANCHIANG, J. M.; TSENG, D. H. Degradation of anthraquinone dye C. I. Reactive Blue 19 in aqueous solution by ozonation. *Chemosphere*, Oxford, v. 77, n. 2, p. 214-221, 2009.

FARSANI, R. E.; RAISSI, S.; SHOKUHFAR, A.; SEDGHI, A. FT-IR study of stabilized pan fibers for fabrication of carbono fibers. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, v. 50, p. 430-433, 2009.

FEIST, W. C.; BAKER, A. J.; TARKOW, H. Alkali Requirements for Improving Digestibility of Hardwoods by Rumen Micro-Organisms. *Journal of Animal Science*, v. 30, p. 832-835, 1970.

FERRAZ, E. R. A. *Comparação da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 utilizando o teste de mutagenicidade com Salmonella*. 2008. 32f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008.

GALGIANI J. N.; STEVENS, D. A. Turbidimetric Studies of Growth Inhibition of Yeasts with Three Drugs: Inquiry into Inoculum-Dependent Susceptibility Testing, Time of Onset of Drug Effect, and Implications for Current and Newer Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 13, n. 2, p. 249-254, 1978.

GANGULY, R.; DWIVEDI, P.; SINGH, R. P. Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2–10. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1246–1251, 2007.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 1741-1747, 1983.

GOSZCZYNSKI, S.; PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M. B.; CRAWFORD, R. L.; CRAWFORD, D. L. New Pathway for Degradation of Sulfonated Azo Dyes by Microbial Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Journal of Bacteriology*, v. 176, n. 5, 1994.

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

GUOQIANG, D.; LALI, A.; BO-MATTIASON, R. K. Affinity thermoprecipitation of lactate dehydrogenase and pyruvate kinase from porcine muscle using Eudragit bound Cibacron Blue. *Journal of Biotechnology*, v. 37, p. 23-31, 1994.

- HOMAGAI, P. L.; GHIMIRE, K. N.; INOUE, K. Adsorption behavior of heavy metals onto chemically modified sugarcane bagasse. *Desalination*, v. 101, p. 2067-2069, 2010.
- HUANG, J.; JIN, N.; KATSUDA, T.; FUKUDA, H. YAMAJI, H. Immobilization of Escherichia coli cells using polyethyleneimine-coated porous support particles for l-aspartic acid production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 46, p. 65-68, 2009.
- HUNGER, K. W. H. Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications. Frankfurt: Wiley-VHC, 2003. p 648.
- IQBAL, M. Textile Dyes. Karachi: Rehbar Publishers Karachi, 2008. p. 167.
- IQBAL, M.; EDYVEAN, R. G. J. Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of Phanerochaete chrysosporium. *Minerals Engineering*, v. 17, p. 217-223, 2004.
- JADHAV, J. P.; KALYANI, D. C.; TELKE, A. A.; PHUGARE, S. S.; GOVINDWAR, S. P. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 165-173, 2010.
- JUNTER, G. A.; JOUENNE, T; Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome in leader or the cart before the horse. *Biotechnology Advances*, New York, v. 22, n. 8, p. 633-658, 2004.
- KIMURA, I. Y.; GONÇALVES JR. A. C.; STOLBERG J.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVARE, V. T. Efeito do pH e do Tempo de Contato na Adsorção de Corantes Reativos por Microesferas de Quitos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Julho/Set, 1999.
- KOULLAS, D. P.; KOURIOS, E. G. Effect of Physical Pretreatments on The Prepyrolytic Behaviour of Lignocellulosics. *Biomass and Bioenergy*, v. 1, n. 4, p. 199-206, 1991.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N.; Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. *Química Nova*, v. 25, n.1, p. 78-82, 2002.

- LAING, D. K.; DUDLEY, R. J.; HARTSHORNE, A. W.; HOME, J. M.; RICKARD, R. A.; BENNETT, D. C. The extraction and Classification of Dyes from Cotton and Viscose Fibres. *Forensic Science International*, v. 50, n.1, p. 23-35. 1991.
- LEAL, C. C. A.; ROSSITER SA DA ROCHA O.; DUARTE, M. M. M. B.; DANTAS, R. F., DA MOTTA, M., MEDEIROS DE LIMA, N. M.; DA SILVA, V. L. Evaluation of the Adsorption Process of Remazol Black B Dye In Liquid Effluents by Green Coconut Mesocarp. *Afinidad*, v. 66, n.546, p. 136-142, 2010.
- LOPEZ-MIRABAL, H. R.; WINTHER, J. R. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochemica et Biophysica Acta*, v. 1783, p. 629-640, 2008.
- LU, X.; LIU, R. Treatment of Azo Dye-Containing Wastewater Using Integrated Processes. In: ERKUT, H. A. *Biodegradation of Azo Dyes*. Hidelberg: Springer-Verlag, 2010. p. 133-155.
- MARCANTI-CONTATO, I. *Emprego de Aspergillus niger paramorfogênico para avaliação de o grau de interferência dos aditivos químicos na bioissorção de corantes têxteis de efluentes industriais*. 1995. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1995.
- MARCHETTO, M.; FILHO, S. S. F. Interferência do processo de coagulação na remoção de compostos orgânicos causadores de gosto e odor em águas de abastecimento mediante a aplicação de carvão ativado em pó. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 10, n. 3, p. 243-252, 2005.
- MARTIN, M. *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*. London: Blackie Academic and Professional, 1998. 556 p.
- MARTÍN-LARA, M. A.; RICO, I. L. R.; VICENTE, I. C. A.; GARCÍA, G. B.; HOCES, M. C. Modification of the sorptive characteristics of sugarcane bagasse for removing lead from aqueous solutions. *Desalination*, v. 256, p. 58-63, 2010.
- MAURYA, N. S.; MITTAL, A. K.; CORNEL, P.; ROTHER, E. Biosorption of dyes using dead macro fungi: Effect of dye structure, ionic strength and pH. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 512-521, 2006.

- MCKAY, G.; FELLOW, M.; GEUNDI, E. L.; NASSAR, M. M. Pore Diffusion during the Adsorption of Dyes onto Bagasse Pith. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 74, n. 4, p. 277-288, 1996.
- MELO, J. S.; KUBAL, B. S.; D'SOUZA, S. F. Production of inverted sucrose syrup using yeast cells adhered to polyethylenimine treated cotton threads. *Food Biotechnology*, v. 6, p. 175-186, 1992.
- MEYER, U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: BROWN, A.W.A. *Ecology of pesticides*. New York: John Willey, 1978. 525 p.
- MISHRA, G. AND TRIPATHY, M., A. Critical review of the treatments for decolourization of textile effluent. *Colourage*, v. 40, p. 35-38, 1994.
- MITTER, E. K.; SANTOS, G. C.; ALMEIDA, E. J. R.; MORÃO, L. G.; RODRIGUES, H. D. P.; CORSO, C. R. Analysis of Acid Alizarin Violet N Dye Removal Using Sugarcane Bagasse as Adsorbent. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 223, n. 2, p. 765-770, 2012.
- MUTHUKUMAR, M.; SARGUNAMANI, D.; SENTHILKUMAR, M.; SELVAKUMAR, N. Studies on decolouration, toxicity and the possibility for recycling of acid dye effluents using ozone treatment. *Dyes and Pigments*, v. 64, p. 35-44, 2005.
- NASHEUER, H. P.; SMITH, R.; BAUERSCHMIDT, C.; GOSSE, F.; WEISSHART, K. Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, n. 72, p. 41-94, 2002.
- NAUMANN, D.; HELM, D.; LABISCHINSKI, H. Microbial Characterizations by FT-IR Spectroscopy. *Nature*, v. 351, p. 81-82.
- NIGAM, P.; ARMOUR, G.; BANAT, I. M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresource Technology*, v. 72, p. 219-226, 2000.
- OGUGBUE, C. J.; SAWIDIS, T. Bioremediation and detoxification of synthetic wastewater containing triarylmethane dyes by *Aromonas hydrophila* isolated from industrial effluents. *Biotechnology Research International*, v. 2011, p. 1-11, 2011.

- OLIVEIRA, M. M.; PIMENTA, M. E. S. G.; CAMARGO, A. C. S.; FIORI, J. E.; PIMENTA, C. J. Silagem de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com ácido fórmico análise bromatológica, físico-química e microbiológica. *Ciências Agrotecnicas de Lavras*, v. 30, n. 6, p. 1218-1223, 2006.
- ORLANDO, F. J.; CARMELO, Q. A. C.; PEXE, C. A.; GLORIA, A. M. Adubação de soqueira de cana-de-açúcar sob dois tipos de despalha: cana crua x cana queimada. *STAB- Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v. 12, n. 4, p. 7-11, 1994.
- PAN, J.; KONG, X.; LI, C.; XU, J.; IMANAKA, T. Crosslinking of enzyme coaggregate with polyethyleneimine: A simple and promising method for preparing stable biocatalyst of *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Molecular Catalysis*, v. 68, p. 256-261, 2011.
- PANAGIOTOPOULOS, I. A.; BAKKER, R. R.; VRIJE, T.; KOUKIOS, E. G.; CLAASSEN, P. A. M. Pretreatment of sweet sorghum bagasse for hydrogen production by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 7738-7747, 2010.
- PASSOS, C. T. *Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de Aspergillus sp.* 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2006.
- PASTI-GRIGSBY, M.B.; PASZYNSKI, A.; GOSZYNSKI, S.; CRAWFORD, R.L.; CRAWFORD, D.L.; Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Process Biochemistry*, v.40, p. 1923-1929, 2005.
- PEARCE, C.I.; LLOYD, J.R.; GUTHRIE, J.T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments*, v. 58, p. 179-196, 2003.
- PERUZZO, L. C. *Influência de agentes auxiliares na adsorção de corantes de efluentes da indústria têxtil em colunas de leito fixo.* 2003. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.
- POONKUZHALI, K.; SATHISHKUMAR, P.; BOOPATHY, R.; PALVANNAN, T. Aqueous state laccase thermostabilization using carbohydrate polymers: Effect on toxicity assessment of azo dye. *Carbohydrate Polymers*, v. 85, p. 341-348, 2011.

PRETORIUS, I. S.; TOIT, M.; RENSBURG, P. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. *Food Technology and Biotechnology*, v. 41, n. 1, p. 3-10, 2003.

RACHAKORNKIJ, M.; RUANGCHUAYA, S.; TEACHAKULWIROJ, S. Removal of reactive dyes from aqueous solution using bagasse fly ash. *Indian Journal of Science and Technology*, v. 26, n. 1, p. 13-24, 2004.

RAJAGURU, P.; KALAISELVI, K.; PALANIVEL, M.; SUBBURAM, V. Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 54, p. 268-273, 2000.

REIS JR, R. A.; MONNERAT, P. H. Diagnose Nutricional Da Cana-De-Açúcar Em Campos Dos Goytacazes-RJ. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 26, p. 367-372, 2002.

RODRIGUES, H. D. P. *Potencial Bioassortivo e Biodegradativo das células de "Saccharomyces cerevisiae" Livres e Imobilizadas em Alginato de Cálcio na Remoção de Corantes Têxteis*. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2010.

ROMÃO, B. M. V.; DINIZ, M. F.; AZEVEDO, M. F. P.; LOURENÇO, V. L.; PARDINI, L. C.; DUTRA, R. C. L.; BUREL, F. Caracterização por FT-IR de agentes de cura utilizados em resinas epoxídicas-II- polimercaptana, poliaminoamida e amida modificada. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n. 3, p. 173-180, 2003.

ROYER, B. *Remoção de Corantes Têxteis Utilizando Casca de Semente de Araucaria angustifolia como Bioassorvente*. 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2008.

SAAD, S. A.; ISA, K, Md.; BAHARI, R. Chemically modified sugarcane bagasse as a potentially low-cost biosorbent for dye removal. *Desalination*, v. 264, p. 123-128, 2010.

SAFARÍKOVÁ, M.; PTÁČKOVÁ, L.; KIBRIKOVÁ, I.; SAFARÍK, I. Biosorption of water-soluble dyes on magnetically modified *Saccharomyces cerevisiae* subsp. Warrum cells. *Chemosphere*, v. 59, p. 831-835, 2005.

SANDHYA, S. Biodegradation of azo dyes under anaerobic-aerobic condition: role of azoreductase. In _____. *Biodegradation of Azo Dyes*. Springer-Verlag, Heidelberg, 1st Edition, 2010. Cap. 2, p. 39-59.

SANIN, L. B. B. A Indústria Têxtil e o Meio Ambiente. *Química Têxtil*, p. 13-34, 1997.

SANTOS, G. C. Análise comparativa da capacidade de remoção do corante direct blue 71 em solução pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus oryzae*. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2011.

SENTHURAN, A.; SENTHURAN, V.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. *Journal of Biotechnology*, v. 73, p. 61-70, 1999.

SHAUL, G. M.; HOLDSWORTH, T. J.; DEMPSEY, C. R.; DOSTAL, K. A. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere*, v. 22, n. 1-2, p. 107-119, 1991.

SILVA, A. J.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe*, London, v. 12, n. 2, p. 93-98, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, 387p.

SMITH, A. R.; JOHNSON, H. E.; HALL, M. Metabolic Fingerprinting of Salt-Stressed Tomatoes. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, Special Issue, 153-163, 2003.

SOARES, J. L. *Remoção de Corantes Têxteis por Adsorção em Carvão Mineral Ativado com Alto Teor de Cinzas*. 1998. 84 f. Tese (Mestrado Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1998.

SOLMAZ, S. K. A.; BIRGÜL, A.; ÜSTÜN, G. E.; TASDEMİR, Y. Colour and COD removal from textile effluent by coagulation and advanced oxidation processes. *Coloration Technology*, v. 122, p. 102-109, 2006.

SONG, S. H.; CHOI, S. S.; KYUNGMOON, P.; YOO, Y. J. Novel hybrid immobilization of microorganisms and its applications to biological denitrification. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 37, n. 6, p. 567-573, 2005.

STUART, B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons, Ltd, 2004, 203 p.

SUKSOMBAT, W. Comparison of Different Alkali Treatment of Bagasse and Rice Straw. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, v. 17, n. 10, p. 1430-1433, 2004.

SUMBU, Z. L. THONART, P.; BECHET, J. Action of Patulin on a Yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 45, n. 1, p. 110-115, 1983.

TAZHIBAeva, S. M.; MUSABEKOV, K. B.; ORAZYMBETOVA, A. B.; ZHUBANOVA, A. A. Surface properties of yeast cells. *Colloid Journal*, v. 65, n. 1, p. 122-124, 2003.

TERAMOTO, M.; NISHIBUE, H.; OGAWA, H.; KOZONO, H.; MORITA, K.; MATSUYAMA, H. Effect of addition of water-soluble cationic polymers on thermal stability and activity of glucose dehydrogenase. *Colloids and Surfaces*, v. 7, p. 165-171, 1996.

TIMMINS, E. M.; HOWELL, S. A.; ALSBERG, B. K.; NOBLE, W. C.; GOODACRE, R. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 367-374, 1998.

VITOR, V.; CORSO, C. R. Decolorization of textile dye by *Candida albicans* isolated from industrial effluents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 11, p. 1353-1357, 2008.

VRIJE, T.; HAAS, G. G.; TAN, G. B.; KEIJSERS, E. R. P.; CLAASSEN, P. A. M. Pretreatment of Miscanthus for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1381-1390, 2002.

WARNING, D. R.; HALLAS, G. The Chemistry and Application of Dyes. New York: Plenum Press, 1994. 410 p.

WHARFE, E. S.; JARVIS, R. M.; WINDER, C. L.; WHITELEY, A. S.; GOODACRE, R. Fourier transform infrared spectroscopy as a metabolite fingerprinting tool for monitoring the phenotypic changes in complex bacterial communities capable of degrading phenol. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 12, p. 3253-3263, 2010.

WINDER, C. L.; GOODACRE, R. Comparison of diffuse-reflectance absorbance and attenuated total reflectance FT-IR for the discrimination of bacteria. *The Analyst*, v. 129, p. 1118-1122, 2004.

WINUGROHO, M.; IBRAHIM, M. N. M.; PEARCE, G. R. A Soak-and-Press Method for the Alkali Treatment of Fibrous Crop Residues: Calcium Hydroxide and Sodium Hydroxide Treatments of Rice Straw. *Agricultural Wastes*, Victoria, v. 9, p. 87-99, 1984.

WON, S. W.; CHOI, S. B.; CHUNG, B. W.; PARK, D.; PARK, J. M.; YUN, Y. S. Biosorptive Decolorization of Reactive Orange 16 Using the Waste Biomass of *Corynebacterium glutamicum*. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 43, p. 7865-7869, 2004.

WOON, S. W.; HAN, M. H.; YUN, Y. Different binding mechanisms in biosorption of reactive dyes according to their reactivity. *Water Research*, v. 42, p. 4847-4855, 2008.

ZAMBELLO, E.; AZEREDO, D.F. Adubação na região centro-sul. In: ORLANDO FILHO, J. (Coord.). Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil. Piracicaba: planalsucar, 1983. p.289-313.

ZOLLINGER, H. Color Chemistry : Syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. 3 ed. New York: VCH Publishers Inc, 1991. 550 p.