

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIO ANTUNES MIQUELANTE

PROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS HALOTOLERANTES PARA USO
NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

CURITIBA

2011

FLÁVIO ANTUNES MIQUELANTE

PROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS HALOTOLERANTES PARA
USO NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Jaime Paba Martínez

CURITIBA

2011

Miquelante, Flávio Antunes

Prospecção de fungos filamentosos halotolerantes para uso na descoloração de corantes têxteis / Flávio Antunes Miquelante – Curitiba, 2011.

76 f. : il.

Orientador: Jaime Paba Martinez.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, 2011.

I. Fungos Halotolerantes. 2. Descontaminação. 3. Corantes têxteis. I. Jaime Paba. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica. III. Título.

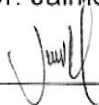
TERMO DE APROVAÇÃO

FLÁVIO ANTUNES MIQUELANTE

PROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS HALOTOLERANTES PARA USO NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

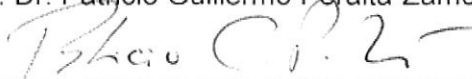
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Jaime Paba Martínez (Orientador)



Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-Zamora



Departamento de Química - UFPR

Prof. Dr. David Alexandre Mitchell



Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Curitiba, 25 de fevereiro de 2011

Aos meus pais, que se dedicam, participam e investem em minha educação.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Wanda Antunes e Walter Miquelante, que dentre vários bons ensinamentos concedidos, me ofereceram sempre as melhores oportunidades de estudo, me apoiando e incentivando todas as minhas decisões. Obrigado por todo amor, carinho e apoio incondicional à minha formação. Sou muito grato a toda minha família, meus irmãos Fabiano, Adriano e André, e queridos avôs.

Ao professor Jaime Paba, pela orientação ao longo do desenvolvimento deste estudo, pela amizade, confiança e ensinamentos recebidos.

À todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pela enorme contribuição à minha formação acadêmica. Em especial, aos professores Wanderson Rocha, Sílvia Cadena e David Mitchell, pelo acesso aos equipamentos de seus laboratórios e ao último também pelas sugestões na correção do pré-projeto e pela disponibilidade de ser avaliador desta dissertação.

Aos colegas que já passaram pelo Laboratório de Biodegradação, Rafael Domingues e Camile Fontana, e aos que permanecem, Carol Niebisch, Danilo Carneiro e Daniele, pelos momentos de convivência e descontração.

Aos colegas da Turma de Mestrado 2009/2011 e funcionários do departamento pelo ótimo convívio.

À “thruma” de oceanografia de 2003 (CEM/UFPR), pelos momentos inesquecíveis. Hoje cada um num mar pelo mundo, tenho enormes saudades das nossas refeições, dos finais de semana “pacatos”, como o mar de Pontal, valeu Cássio, Tiago, Marcelo, Alê, Lua, Lizi, Marcela, Paula, Júzinha, Serginho e André.

Obrigado de coração a todos que direta ou indiretamente tornaram plausível a realização desta pesquisa e em especial à Micheli Thomas, agradeço-te muito pelos sorrisos, beijos e abraços, mas principalmente pela confiança, amor e dignidade.

Por último, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo fomento da bolsa de mestrando e, a coordenação do programa de pós-graduação em Ciências (Bioquímica) da UFPR. Ao coordenador, prof. Miguel Nosedá, pessoa queridíssima e muito atenciosa a qualquer dúvida, e a profa. Sílvia Cadena (vice-coordenadora) por quem tenho grande admiração, principalmente, pela sua enorme simpatia e serenidade.

Muito obrigado também as pessoas que farão uso desta dissertação.

Agradeço.

*“Nunca consideres o estudo como uma obrigação,
mas sim, como uma oportunidade de penetrar o belo e maravilhoso mundo do saber”*

Albert Einstein

“A natureza não faz nada em vão”

Aristóteles

*“Fala-se tanto da necessidade de deixar um planeta melhor para os nossos filhos e,
esquece-se da urgência de deixarmos filhos melhores para o nosso planeta”*

RESUMO

Cinquenta e duas espécimes de fungos filamentosos halotolerantes isolados da Baía das Laranjeiras (Paranaguá, Brasil) foram avaliados por seu potencial de descoloração de três corantes têxteis reativos: reativo azul (RB220), vermelho (RR195) e amarelo (RY135). Embora a maioria dos isolados apresentasse atividade de descoloração, onze foram selecionados para estudos adicionais. Eles pertencem aos seguintes gêneros: *Aspergillus* sp (3 isolados), *Penicillium* sp (1), *Trichoderma* sp (1), *Acremonium* sp (1), *Paecilomyces* sp (1), *Cladosporium* sp (1) e três não-identificados (NI). Nenhuma enzima esteve envolvida no processo de descoloração, sendo a biosorção o único mecanismo utilizado para a descoloração do corante. Pré-tratamentos do micélio em autoclave, homogeneização do tamanho de partículas (< 250 mm) e exposição ao HCl aumentou drasticamente a capacidade biosortiva. As condições de cultivo influenciando a produção de biosorvente foram otimizadas para quatro isolados em função do conteúdo de carbono e nitrogênio, concentração salina, agitação, tempo de cultura e pH inicial. O isolado mais promissor (*Acremonium* sp) foi usado como organismo modelo para caracterização do processo de biosorção. Verificou-se que uma solução de corante de 200 mg/L foi quase totalmente descolorada em 90 minutos de contato com o biosorvente, através de uma carga de biomassa de 2 gramas por litro. Além disso, 50% da capacidade biosortiva máxima do micélio foi obtido em apenas cinco minutos de contato. O processo permaneceu inalterado em valores de pH variando entre 2 e 6, e uma redução de 12 para 40% em eficiência foi observada nos valores de pH entre 7-10, respectivamente.

ABSTRACT

Fifty two specimens of halotolerant fungi isolated from the Laranjeiras Bay (Paranaguá, Brazil) were assessed for their ability to decolorize three reactive textile dyes: reactive blue (RB220), red (RR195) and yellow (RY135). Although all the isolates displayed decolorization activity, eleven were selected for additional studies. They belonged to the following genera: *Aspergillus* sp (3 isolates), *Penicillium* sp (1), *Trichoderma* sp (1), *Acremonium* sp (1), *Paecilomyces* sp (1), *Cladosporium* sp (1) and three non-identified (N.I). No enzymes were involved in the process and biosorption was the only mechanism for dye destaining. Pre-treatment of mycelia by autoclaving, homogenization of particle size (< 250 µm) and exposure to HCl drastically increased the biomass biosorptive capacity. Culture conditions were optimized for four isolates according to carbon and nitrogen content; salt concentration; agitation, culture time and initial pH. Using the *Acremonium* sp. isolate as a model, the biosorption process was characterized. A dye solution of 200 mg/L was almost completely destained in 90 minutes by using a biomass load of 2 g per liter. Furthermore, 50% of the maximum mycelia biosorptive capacity was obtained in only five minutes of contact. The process remained unaltered in pH values ranging among 2 to 6 but a 12 to 40% reduction in efficiency was observed for initial pH values among 7 to 10 respectively.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL	3
2.2 CORANTES TÊXTEIS	4
2.2.1 Caracterização dos corantes	4
2.2.2 Mercado mundial e brasileiro	5
2.2.3 Aspectos ecológicos e toxicológicos	6
2.3 TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS TÊXTEIS.....	7
2.4 APLICAÇÃO DE FUNGOS NA REMEDIAÇÃO DE EFLUENTES	10
2.4.1 Mecanismo de biodegradação.....	11
2.4.2 Mecanismo de biosorção	14
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 METODOLOGIAS	18
4.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL GERAL.....	18
4.2 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS	19
4.3 CORANTES UTILIZADOS.....	20
4.4 PROCEDIMENTO DE INOCULAÇÃO DAS CULTURAS.....	21
4.5 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS	21
4.5.1 Análises de absorbância	21
4.5.2 Ensaios de atividade descorante.....	22
4.6 TRIAGEM INICIAL DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO	23
4.7 DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA E DO PROCESSO MEDIADOR	23
4.8 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DO BIOSORVENTE	25

4.8.1	Influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio	25
4.8.2	Influência do pH, salinidade, agitação e idade da cultura.....	26
4.9	EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA CAPACIDADE BIOSORTIVA.....	28
4.10	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA NO PROCESSO DE BIOSORÇÃO	29
4.10.1	Efeito da quantidade de massa micelial no processo de biosorção	29
4.10.2	Efeito do tempo de contato e pH no processo de biosorção.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS	31
5.2	TRIAGEM DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DOS ISOLADOS.....	32
5.3	DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA E DO PROCESSO MEDIADOR	36
5.4	EFEITO DO TAMANHO DA PARTÍCULA NA CAPACIDADE BIOSORTIVA.....	41
5.5	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DO BIOSORVENTE	42
5.5.1	Influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio	42
5.5.2	Influência do pH, salinidade, agitação e idade da cultura.....	45
5.6	EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA CAPACIDADE BIOSORTIVA.....	49
5.7	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA NO PROCESSO DE BIOSORÇÃO	52
6	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
	ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

Os corantes têxteis são desenvolvidos para resistir ao desbotamento procedente da umidade, luz e muitos compostos químicos, incluindo agentes oxidantes. O descarte de corantes sintéticos em corpos de água receptores constitui uma ameaça aos ecossistemas e, conseqüentemente, à saúde pública. A coloração da superfície da água já dificulta a atividade fotossintética da vida aquática, decorrente da obstrução da entrada de luz solar (BANAT *et al.*, 1996; AKSU; TEZER, 2000). Além disso, muitos corantes são conhecidos por serem tóxicos e agentes mutagênicos e carcinogênicos em diversos organismos (MOLLER; WALLIN, 2000; MATHUR *et al.*, 2005; MATHUR; BHATNAGAR, 2007; EL-RAHIM *et al.*, 2008).

Dentre os focos geradores de poluição ambiental, a indústria têxtil ocupa um lugar de destaque, devido aos grandes volumes de água utilizados nos processos e à complexidade dos dejetos com ela eliminados. Estima-se que, durante o processo de tingimento, em torno de 15% do corante empregado seja descarregado em efluentes, devido a perdas ocorridas no processo de fixação (ZANONI; CARNEIRO, 2001). Pelo fato dos corantes serem de origem sintética e possuírem complexas estruturas aromáticas, que os torna mais estáveis e recalcitrantes, as águas residuais que contém estes compostos estão entre as mais difíceis de serem tratadas (FU; VIRARAGHAVAN, 2001).

A escolha da estratégia a ser empregada no tratamento de efluentes contendo corantes depende de vários fatores, como o tipo de corante presente, a composição do efluente e o destino dos subprodutos formados. Cada técnica tem as suas limitações e o uso individual de um determinado processo pode não ser suficiente para se obter a descoloração completa (CARDOSO; RAMALHO, 2004). Na maioria das vezes, o processo de tratamento está fundamentado na combinação de sistemas físico-químicos, seguido do biológico por meio de lodo ativado. Este último método, além de gerar grandes quantias de resíduos sólidos e ter elevado custo, é bastante suscetível à composição do efluente (KUNZ *et al.*, 2002; CORSO; ALMEIDA, 2009), fatores que muitas vezes inviabilizam a sua aplicação.

A capacidade de suportar a variabilidade de composição dos efluentes têxteis, bem como, a geração de uma mínima quantidade de rejeitos, pouco consumo de reagentes químicos e ao, ao mesmo tempo, apresentar baixo custo operacional, são

fatores que devem ser considerados na escolha do procedimento de remediação mais sustentável a se adotar industrialmente. Neste contexto, técnicas de biosorção e biodegradação, utilizando microrganismos, são alternativas promissoras para complementar ou substituir os tratamentos convencionais (AKAR *et al.*, 2009; SARATALE *et al.*, 2009).

Apesar de diversos microrganismos possuírem capacidade de descolorir efluentes por biosorção ou biodegradação (GOU *et al.*, 2009), os fungos basidiomicetos da podridão branca da madeira são mais frequentemente considerados para este propósito. Isto se deve, principalmente, às suas excepcionais habilidades oxidativas de despolimerização e mineralização da lignina. As enzimas modificadoras de lignina (oxidases e peroxidases), graças à sua falta de especificidade ao substrato, são capazes de degradar uma vasta variedade de xenobióticos, incluindo os corantes sintéticos (WESEBERG *et al.*, 2003; MUNARI *et al.*, 2008).

Mesmo o estudo sobre degradação enzimática de corantes ser quase sempre reportado com fungos basidiomicetos da podridão branca, outros grupos fúngicos também possuem excelentes capacidades degradativas (ALI *et al.*, 2008). Alguns ascomicetos e zygomycetos já foram citados como produtores de oxidases mediadoras de biodegradação (BALDRIAN; SNAJDR, 2006; SADHASIVAM *et al.*, 2008), no entanto, a maior parte das espécies destes grupos são mencionadas como sendo biosortivas (KAUSHIK; MALIK, 2009). Os fungos derivados de ambientes marinhos têm despertado enorme interesse biotecnológico em virtude de suas aptidões em produzir metabólitos secundários e enzimas extracelulares diferentes daquelas produzidas por seus homólogos terrestres, pois estão adaptados à condições extremas encontradas nos ecossistemas marinhos, como por exemplo, a alta salinidade (BUGNI; IRELAND, 2004; CHENG *et al.*, 2009). No entanto, apenas recentemente este grupo de microrganismos tem atraído a atenção como potencial fonte para triagem de novos produtos para biorremediação de efluentes industriais, que, geralmente, contêm altos índices de sais inorgânicos (D'SOUZA *et al.*, 2006; da SILVA *et al.*, 2008; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010).

Neste contexto, o presente estudo teve como propósito a realização de uma triagem na busca de fungos filamentosos halotolerantes com potencial para descoloração de corantes textéis, bem como avaliar e caracterizar o mecanismo pelo qual este processo é realizado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL

A indústria têxtil, com todos os seus segmentos, representa para muitos países um extraordinário objeto econômico e social. No Brasil, se destaca entre os oito setores industriais mais importantes, ocupando os primeiros lugares em geração de renda e emprego (CONCHON, 1999). São empregados mais de 1,6 milhões de pessoas e o setor sozinho é responsável por cerca de 3% do PIB nacional, segundo dados da Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (ABIT, 2008).

Em contrapartida, as indústrias têxteis são responsáveis pela produção de grande volume de efluentes de carga orgânica elevada e forte coloração (GUARATINI; ZANONI, 2000; YANG *et al.*, 2008). O algodão, que é a fibra mais usada no mundo, é também o substrato que requer mais água em seu processamento. O tingimento de um quilograma de algodão com corantes reativos demanda de 70 a 150 litros de água, aproximadamente 600 gramas de cloreto de sódio e cerca de 30 a 60 gramas de corante (ALLEGRE *et al.*, 2006).

Três etapas são fundamentais no processo de tingimento das fibras têxteis. A montagem é a fase na qual o tecido entra em contato com a solução de corante (banho de tingimento) ou é impregnado com corantes através de forças mecânicas (estamparia). A fase de fixação tem como objetivo a reação entre o corante e o tecido e, finalmente, o tratamento final envolve procedimento de lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante não fixado à fibra nas etapas precedentes. São nestas etapas onde entre 2 a 50% do corante é transferido para as águas residuais. Esta quantidade perdida depende da classe à qual o corante pertence, sendo de 2% para os classificados como básico e 50% para os reativos (O'NEILL *et al.*, 1999; McMULLAN *et al.*, 2001).

O processo de tingimento representa um dos fatores fundamentais no sucesso comercial dos produtos têxteis. A intensidade da coloração e o elevado grau de fixação em relação à luz, lavagem e transpiração, tanto inicialmente quanto após uso prolongado, são algumas das principais características exigidas (GUARATINI; ZANONI, 2000). Para contemplar toda esta demanda, existe mais de oito mil tipos de corantes têxteis sintéticos (WESENBERG *et al.*, 2003).

2.2 CORANTES TÊXTEIS

2.2.1 Caracterização dos corantes

Os corantes sintéticos têm uma considerável diversidade estrutural. A maior parte deles destina-se ao setor têxtil, porém indústrias de artefatos de couro ou papel, alimentícias, de cosméticos, tintas, impressão e plásticos também são importantes consumidores (AKSU; DÖNMEZ, 2003; RAMALHO, 2005). Os corantes têxteis são compostos orgânicos cuja finalidade é conferir cor a uma determinada fibra. Sua molécula pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo, que confere cor a substância, e o grupo funcional, responsável pela fixação à fibra, denominado de auxocromo (KUNZ *et al.*, 2002). Este último grupamento age, também, como doador ou removedor de elétrons, alterando a densidade eletrônica do cromóforo e influenciando assim o comprimento de onda absorvido (ZEE, 2002).

Tendo em vista que muitos corantes são compostos complexos, muitas vezes é muito inconveniente nomeá-los por sua fórmula química. Por esse motivo, a nomenclatura correta raramente é usada, em contrapartida, prefere-se utilizar nomes comerciais. No entanto, os mesmos corantes podem ser comercializados com diferentes denominações. Por isso, para diferenciar e classificá-los, utiliza-se o Colour Index (C.I.), um catálogo da Associação Americana de Química Têxtil e Coloristas e da Sociedade Britânica de Corantes e Coloristas (WESENBERG *et al.*, 2003).

A caracterização dos corantes pode ser de acordo com sua estrutura química ou com o método de fixação à fibra. Ao se utilizar a estrutura química como critério de classificação, os corantes podem ser subdivididos em várias classes de cromóforos: azo (mono, di, tri e poliazó), nitrofenol, nitrosofenol, triarilmetano, antraquinônico, pirimidina, vinilsulfônico e triazina, entre outros (TWARDOKUS, 2004). Na classificação segundo o modo de aplicação, os corantes são divididos principalmente nas seguintes categorias: ácidos, básicos, dispersos, à cuba, sulfurosos e reativos (GUARATINI; ZANONI, 2000).

2.2.2 Mercado mundial e brasileiro

Os corantes reativos correspondem a aproximadamente 55% do mercado mundial, seguidos pelos corantes dispersos, com 35%. O Brasil é responsável por 2,6% da demanda mundial de corantes têxteis, sendo a sua utilização concentrada principalmente nos corantes reativos, que, sem dúvida, é a classe mais importante para a tintura da fibra de algodão (FREITAS, 2002; GUARATINI; ZANONI, 2000). Os corantes desta classe normalmente possuem cromóforos azo, antraquinona e triarilmetano, combinados com diferentes tipos de grupos reativos, como, vinil sulfona, clorotriazina e tricloropirimidina. Eles diferem de todas as outras classes na maneira como se interagem com às fibras têxteis, por meio de ligações covalentes (AKSU, 2005).

Com relação aos corantes classificados segundo a sua estrutura química, as duas principais classes agrupam corantes contendo na sua molécula grupos azo e/ou o antraquinona (Figura 1). A primeira, a dos azocorantes, é uma importante classe de corantes têxteis, representando cerca de 60 a 80% dos corantes registrados no Colour Índex (ZILLE, 2005) e 60% da utilização mundial (KUNZ *et al.*, 2002). Seus integrantes se caracterizam pela presença de um ou mais grupos cromóforos (azo) em suas moléculas (-N=N-) (PLUMB *et al.*, 2001). Devido a sua estabilidade química frente a agentes externos, como luz, temperatura, umidade e atmosfera oxidante, e facilidade de síntese, são muito utilizados em indústrias alimentares, de cosméticos, farmacêuticas e têxteis (PATEL; SURESH, 2008).

O segundo grupo de corantes (antraquinônicos) dominou o mercado de corantes reativos até o final da década de 70. Apesar de seu alto custo e pequena capacidade de coloração, é extremamente eficaz na capacidade de fixação à fibra. Os mais comumente usados são os derivados do ácido bromoamínico que, através da variação dos substituintes do anel aromático, apresentam colorações variando do violeta azulado ao azul esverdeado (SUWANRUJI, 2004).

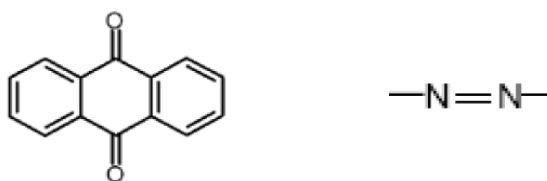


Figura 1 – Grupo antraquinona (esquerda) e agrupamento azo (direita).

2.2.3 Aspectos ecológicos e toxicológicos

A principal via pela qual os corantes ingressam no ambiente é através das águas residuais (ZEE, 2002). É estimado que aproximadamente 100 toneladas ao ano de corantes sejam descarregados nessas águas pelas indústrias têxteis (WONG *et al.*, 2003). A presença de uma mínima quantidade de corante na água já afeta sua transparência. O bloqueio à entrada de luz solar na água intervém no processo de fotossíntese e, como consequência, afeta a concentração de gases dissolvidos, ocasionando sérios prejuízos no desenvolvimento dos organismos aquáticos (BANAT *et al.*, 1996).

Em relação aos riscos associados à saúde humana, estes estão diretamente relacionados ao tempo e modo de exposição. Estudos de exposição crônica de corantes e seus produtos intermediários têm demonstrado o surgimento de dermatite de contato (GIUSTI *et al.*, 2002; SMITH; GAWKRODGER 2003) e o aumento da incidência de câncer de bexiga em trabalhadores da indústria têxtil (MASTRANGELO *et al.*, 2002). É estimado que as indústrias têxteis gerem resíduos com alto potencial genotóxico e uma moderada atividade mutagênica em comparação a outras descargas industriais (HOUK, 1992; MATHUR *et al.*, 2005).

Diversos organismos têm sido manejados como modelo para avaliação da toxicidade dos efluentes da indústria têxtil. Alguns corantes apresentam genotoxicidade em ensaios usando *Salmonella* (MATHUR; BHATNAGAR, 2007), são teratogênicos em embriões de rã (*Xenopus laevis*) (BIRHANLI; OZMEN, 2005), dificultam a germinação de sementes de plantas (MOAWAD *et al.*, 2003) e induzem o aparecimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos (LIMA, 2007).

Os principais corantes que apresentam potencial carcinogênico são os que possuem em sua estrutura o cromóforo azo (SPADARO *et al.*, 1992). Ao serem metabolizados pelo intestino, podem levar à formação de amina aromáticas, benzidinas, entre outros produtos conhecidos por serem cancerígenos (GUARATINI; ZANONI, 2000). Um segundo grupo de corantes potencialmente carcinogênicos é composto por corantes reativos. Embora sua alta solubilidade tenha sido discutida como uma forma de minimizar sua absorção no organismo, os corantes reativos são configurados para reagirem eficientemente com substâncias portadoras de grupos amina e hidroxila, presentes nos tecidos e em todas as proteínas e enzimas dos organismos (VENKATARAMAN, 1974).

2.3 TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS TÊXTEIS

No que diz respeito à remoção de cor dos efluentes industriais, as legislações ambientais estão se tornando cada vez mais rigorosas em relação aos limites de concentração de corantes no ambiente (ANJANEYULU *et al.*, 2005). O governo brasileiro tem adotado várias medidas que regulamentam o lançamento de efluentes em corpos receptores. Dentre as leis, destaca-se a Resolução nº. 357 do CONAMA, instituída em 17 de março de 2005, que estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes nos corpos receptores. Embora não estabeleça valores máximos para o parâmetro de cor, está instituído que os efluentes não podem modificar as características originais dos corpos receptores.

Adicionalmente, a lei Federal nº 9433 de 1997, que instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos, prevê a cobrança pelo uso das águas superficiais e subterrâneas, tornando assim o seu consumo, bem como a qualidade dos efluentes líquidos lançados, fatores importantes na determinação de custos finais. Neste caso, as indústrias precisam implementar tecnologias de tratamento que visam o reuso da água no processo de produção, para assim gerar menores volumes de efluentes, além de diminuir a captação de água bruta.

A indústria têxtil é uma das principais produtoras de efluentes líquidos. A descoloração e/ou degradação de muitos corantes (ácidos e reativos), quando não tratados antes de serem descarregados nos corpos receptores, não acontecerá no tratamento aeróbico de água dos sistemas convencionais municipais (WILLMOTT *et al.*, 1998). A dificuldade no tratamento de seus efluentes deriva da multiplicidade de seus componentes. A carga de poluição da cadeia produtiva têxtil não é precedente apenas da variada natureza química dos corantes. Os aditivos químicos, de diversas composições, utilizados nos processamentos (umectantes, antiespumantes, dispersantes, amaciantes, ajustadores de pH) dificultam ainda mais o processo de tratamento do efluente industrial com apenas um procedimento (RAMALHO, 2005). Além disso, estes efluentes apresentam grande flutuação em termos de quantidade e carga de poluição, pH e temperatura, dependendo do tipo de material têxtil fabricado (PRIGIONE *et al.*, 2008). A Tabela 1 mostra um resumo dos principais componentes encontrados nos efluentes de indústrias têxteis.

Tabela 1 – Principais poluentes encontrados nas águas residuais têxteis, os tipos químicos e os processos dos quais originam.

Poluentes	Principais substâncias	Processo de origem
Matéria orgânica	Amidos, enzimas, gorduras, graxas, surfactantes e ácido acético	Limpeza, lavagem e tingimento
Cor	Corantes	Lavagem e tingimento
Nutrientes (N, P)	Sais de amônia, uréia, tampões e surfactantes	Tingimento
pH e sais	Hidróxido de sódio, ácidos minerais e orgânicos, cloreto de sódio, silicatos, sulfatos e carbonatos	Limpeza, alvejamento, tingimento e neutralização
Enxofre	Sulfatos, sulfitos, hidrosulfitos e ácido sulfúrico	Tingimento
Compostos tóxicos	Metais pesados, agentes oxidantes e redutores, biocidas e sais de amônio quaternário	Limpeza, alvejamento, tingimento e finalização
Outros compostos orgânicos	Surfactantes, corantes, resinas, organoclorados e solventes	Limpeza, lavagens, alvejamento, tingimento, neutralização e finalização

FONTE: modificado de Ramalho (2005)

Há uma variedade enorme de tecnologias desenvolvidas para remoção de poluentes das águas e de efluentes têxteis. Usualmente a remediação de efluentes contendo corantes é fundamentada em processos de tratamento físico-químico, que incluem floculação combinado com flotação, eletroflotação, filtração por membrana, coagulação eletrocinética, ozonização, oxidação, precipitação, troca iônica, irradiação e destruição eletroquímica (FU; VIRARAGHAVAN, 2001; ROBINSON *et al.*, 2001). Algumas destas técnicas têm mostrado serem eficazes, embora apresentem limitações (CRINI, 2006). Suas aplicações são variavelmente restringidas devido aos altos custos operacionais, formação de subprodutos tóxicos e limitada adaptabilidade a uma vasta gama de águas residuárias têxteis existentes. O requerimento excessivo de reagentes químicos e energia são, também, demandas inerentes a alguns destes processos (BANAT *et al.*, 1996; AKSU, 2005; PADMESH *et al.*, 2005).

O tratamento biológico de águas residuais têxteis aparece como uma ótima alternativa econômica para ser utilizada em substituição aos métodos físico-químicos

ou aplicada conjugadamente a estes. O processo biológico utilizado com maior frequência para o tratamento de efluentes têxteis é o sistema de lodo ativado. Este consiste na agitação dos efluentes, na presença de um consórcio de microrganismos, durante um período necessário para oxidação da matéria orgânica. Em seguida, uma grande parte da matéria orgânica passa por floculação, no qual o lodo ativado é decantado para que este seja retirado e reinserido em outro tratamento. Este processo apresenta uma grande inconveniência de ser bastante susceptível à composição do efluente, além de produzir grande volume de lodo que exigirá cuidados na disposição final ou tratamento (KUNZ *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, outras abordagens biotecnológicas estão sendo sugeridas como de potencial interesse na remediação de efluentes têxteis de forma mais ecoeficiente. A utilização de bactérias, algas e fungos tem mostrado excelentes resultados (McMULLAN *et al.*, 2001; AKSU; TEZER, 2005; LUCAS *et al.*, 2007; KAUSHIK; MALIK, 2009; SARATALE *et al.*, 2009). Dentre estes estudos, se tem conhecimento de que muitas bactérias, sob condições anaeróbias, reduzem corantes azo por meio de redutases citoplasmáticas solúveis não específicas. A atividade destas enzimas tem resultado na produção de aminas aromáticas tóxicas e mutagênicas aos animais (ROBINSON *et al.*, 2001). Como alguns tipos de corantes, especialmente os da classe azo, são raramente degradados por bactérias aeróbias, alguns estudos têm proposto como alternativa um tratamento bacteriano seqüencial anaeróbio, para descoloração, e aeróbio, para desintoxicação do meio (HAI *et al.*, 2008).

É interessante notar neste contexto que, ao contrário das bactérias, os fungos aeróbios da podridão branca podem degradar uma ampla variedade de compostos poluentes, inclusive corantes têxteis (HAI *et al.*, 2008). Os fungos ligninolíticos têm despertado grande interesse devido à sua capacidade de produção de enzimas ligninolíticas oxidativas que atuam sobre vários substratos de origem industrial, algumas possibilitando até completa mineralização do composto. Além desses, outros grupos fúngicos são reconhecidos por serem ótimos biosorventes de corantes sintéticos (AKAR *et al.*, 2009). Estes removem o corante do efluente em sua forma nativa e sem possibilidade de formação de compostos intermediários com efeitos tóxicos (SUMATHI; MANJU, 2000).

2.4 APLICAÇÃO DE FUNGOS NA REMEDIAÇÃO DE EFLUENTES

O papel dos fungos no tratamento de águas residuais e remoção de corantes têxteis é bastante investigado (BALDRIAN; SNAJDR, 2006; ASGHER *et al.*, 2008). Inicialmente a utilização de fungos tem vantagem sobre os demais microrganismos devido à produção de um grande número de enzimas extracelulares, que possibilitam um maior contato físico e enzimático com o meio. A natureza extracelular de suas enzimas também é vantajosa pelo fato de aumentar a sua tolerância a elevadas concentrações de substâncias tóxicas, visto que estas não precisam ser internalizadas para serem metabolizadas. Por estes motivos, muitos gêneros fúngicos são empregados em aplicações biotecnológicas, entre elas a descoloração de corantes têxteis.

Os mecanismos envolvidos na remoção de corantes pelos fungos podem ser agrupados em biodegradação e biosorção (COULIBALY *et al.*, 2003; KAUSHIK, MALIK, 2009). A biodegradação consiste na modificação estrutural do poluente via processo enzimático (GIANFREDA; RAO, 2004), enquanto a biosorção é um fenômeno passivo de seqüestro e separação do poluente da fase aquosa ou gasosa para uma fase sólida (ANJANEYA *et al.*, 2009). A aplicação de processos biológicos na remoção de compostos químicos recalcitrantes na natureza é designada biorremediação (GIANFREDA; RAO, 2004).

Diferentes grupos fúngicos são capazes de biodegradar poluentes através dos seus sistemas enzimáticos responsáveis pela degradação da lignina na natureza e, por isso, são designados fungos ligninolíticos (SANTOS *et al.*, 2004). Estes podem ser classificados em três grupos eco-fisiológicos, segundo o potencial de ataque de suas enzimas. O grupo dos fungos da podridão branca da madeira (“white-rot fungi”) compreende, na sua maioria, espécies pertencentes ao filo basidiomiceto, enquanto que, o grupo dos fungos da podridão marrom da madeira (“brown-rot fungi”) é exclusivamente composto por basidiomicetos. O terceiro grupo, denominado de fungos da podridão mole da madeira (“litter-rot ou soft-rot fungi”), abrange apenas espécies do filo ascomiceto (TUOMELA *et al.*, 2000).

Os fungos da podridão branca, membros do filo Basidiomycota, como *Funalia trogii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Lacteus Irpex* e *Lentinula edodes*, são considerados os microrganismos mais eficientes para a degradação de

corantes têxteis (POINTING *et al.*, 2001; WESENERG *et al.*, 2003). Por sua vez, o fungo *P. chrysosporium* é o organismo mais utilizado como sistema modelo para compreensão do processo de biodegradação da lignina e de alguns poluentes (BUMPUS; AUST, 2005).

Embora estudos com fungos não basidiomicetos que degradam corantes sejam bem menos freqüentes, está demonstrado que alguns fungos são tão eficazes quanto os da podridão branca para metabolizar uma grande variedade de compostos, especialmente por desmetilação e oxidação (CHA *et al.*, 2001). Espécies do filo Ascomycota, como *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* e *Pestalotiopsis guepinii*, e do filo Zygomycota, como *Cunninghamella elegans* e *Umbelopsis isabellina*, são alguns exemplos reportados de fungos capazes de degradar corantes têxteis (BERGSTEN-TORRALBA *et al.*, 2009). No entanto, a maioria dos estudos de descoloração de corantes realizados com fungos não basidiomicetos apresentam como principal mecanismo de descoloração a biosorção do corante pelo micélio (SUMATHI; MANJU, 2000). A seguir, serão apresentados, em duas subseções, detalhes sobre cada mecanismo de descoloração.

2.4.1 Mecanismo de biodegradação

As enzimas oxidases, oxidoredutases e peroxidases envolvidas, naturalmente, no processo de degradação e mineralização da lignina são denominadas de enzimas modificadoras de lignina (polímero estrutural da madeira das plantas). Por possuírem baixa especificidade ao substrato, estas enzimas são também responsáveis por degradar um amplo espectro de organopoluentes estruturalmente similares a lignina, dentre eles, os corantes têxteis. A base desta falta de especificidade encontra-se na formação de radicais livres, muito reativos e passíveis de interações com vários substratos (GIANFREDA; RAO, 2004). Em muitas espécies fúngicas, estas enzimas são freqüentemente expressas em mais de uma isoforma, e sua síntese e secreção, na maioria das vezes, são induzidas por níveis limitados de nutrientes (WESENERG *et al.*, 2003).

A degradação da lignina, bem como dos xenobióticos, é um processo complexo de oxidação, redução, metilação e hidroxilação, que envolve numerosos co-fatores de baixo peso molecular, os quais podem servir como mediadores de

óxido-redução (WESENBERG *et al.*, 2003). A natureza polimérica da lignina e o tamanho das enzimas ligninolíticas dificultam a interação direta e específica entre estas. Por isso, moléculas com baixa massa molar, ditas anteriormente, agem como mediadores redox, fornecendo alto potencial de óxido-redução para degradar a lignina e penetrar no complexo de ligninocelulose (LEONOWICZ *et al.*, 1999).

As principais enzimas fúngicas envolvidas na modificação da lignina e de compostos análogos incluem, lacase (Lac, EC 1.10.3.2), peroxidase manganês-dependente (MnP, EC 1.11.1.13) e lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) (D'SOUZA *et al.*, 2006). A Figura 2 mostra o ciclo catalítico destas três enzimas ligninolíticas. O sistema ligninolítico dos fungos não é homogêneo para todos, enquanto algumas espécies possuem capacidade de produzir todas as três principais enzimas envolvidas no processo, outras espécies produzem apenas uma ou duas delas (HATAKKA, 1994).

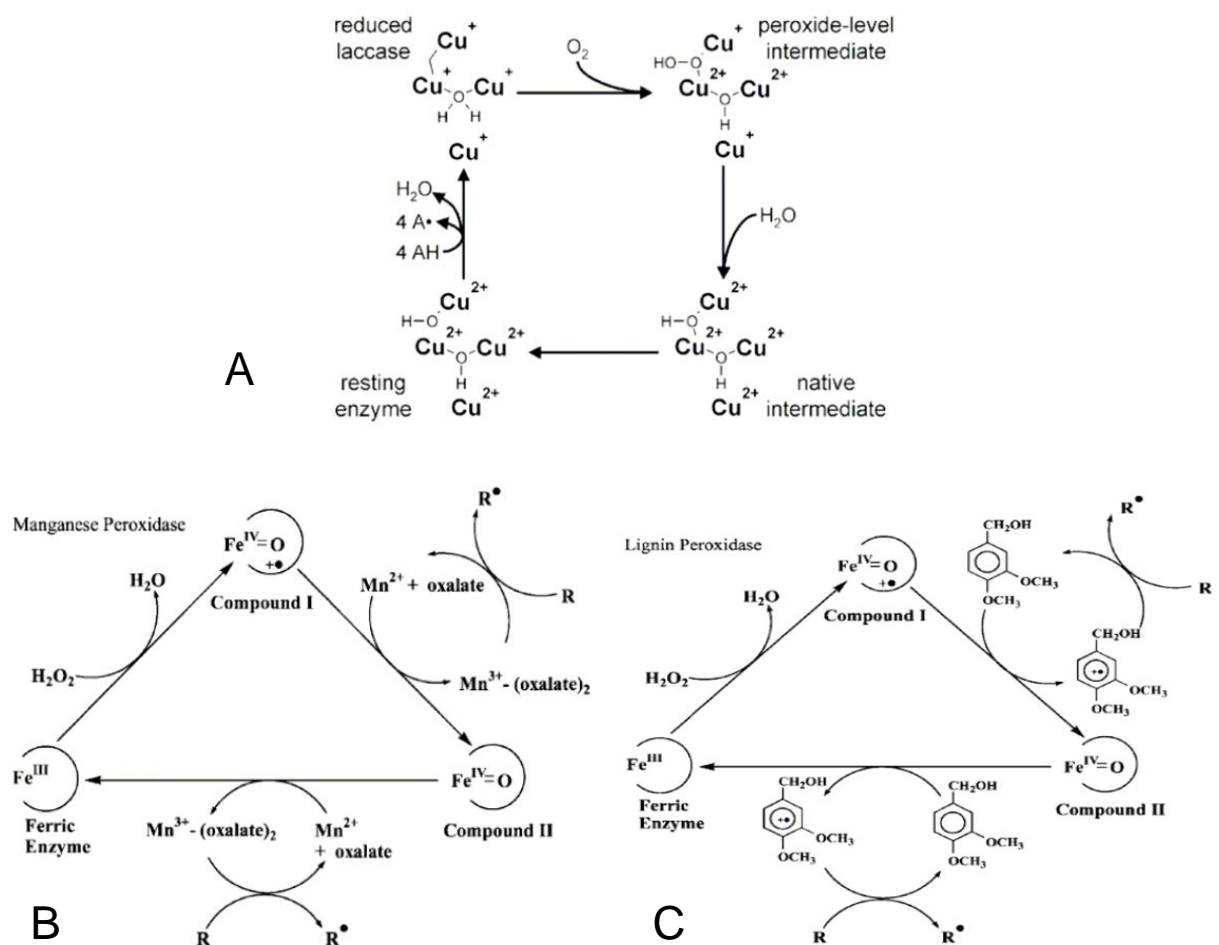


Figura 2 – Ciclo catalítico das principais enzimas modificadoras de lignina: (A) Lacase, (B) Peroxidase manganês e (C) Lignina peroxidase. Fonte: WESENBERG *et al.* (2003) e CAMERON *et al.* (2007).

Os sítios de ligação com os substratos são os principais fatores responsáveis pelas diferenças funcionais das peroxidases ligninolíticas (LEONOWICZ *et al.*, 1999). Ambas peroxidases necessitam da presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para oxidar lignina e compostos relacionados (MESTER; TIEN, 2000). A MnP requer também Mn^{+2} para oxidar fenóis mono aromáticos (CAMERON *et al.* 2000). A lacase representa uma família de polifenol oxidoreduases que catalisa a oxidação de uma variedade de doadores aromáticos de hidrogênio (WESENBERG *et al.*, 2003). Durante seu ciclo catalítico, as lacases não dependem nem de Mn^{+2} nem de H_2O_2 . Compostos aromáticos não fenólicos podem ser oxidados pela lacase através de mediadores, que são moléculas com a função de transportar elétrons entre as enzimas e os compostos não fenólicos (BAIOCCO *et al.*, 2003).

Para a completa degradação da lignina, outras enzimas intracelulares também são requeridas, tanto para a completa mineralização dos monômeros quanto para a geração de metabólitos secundários que suportam os mecanismos de ação das principais enzimas extracelulares ligninolíticas. Algumas desempenham o papel de produção de H_2O_2 , como a glioxal oxidase, aril álcool oxidase e superóxido dismutase (LEONOWICZ *et al.*, 1999).

Diferentes grupos fúngicos são relatados como produtores de enzimas ligninolíticas. Recentemente, fungos marinhos obrigatórios e facultativos de ambientes ricos em materiais lignocelulósicos, tais como manguezais e marismas, estão sendo investigados como novas fontes microbianas para produção destas enzimas (BUCHER *et al.*, 2004; MTUI; MASALU; 2007; RAGHUKUMAR *et al.*, 2008; D'SOUZA-TICLO *et al.*, 2009; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010). No entanto, esforços experimentais nestes organismos na verificação de enzimas para o tratamento de efluentes têxteis ainda são largamente inexplorados (VERMA *et al.*, 2010).

Fungos derivados de ambientes marinhos crescem e produzem enzimas de degradação em meios contendo água do mar (RAGHUKUMAR *et al.*, 2008) e, portanto, podem ser úteis no tratamento de efluentes. Uma linhagem de *Phlebia* (MG-60), basidiomiceto isolado de manguezal, mostrou capacidade de degradação de lignina e descoloração de Poly R-478 na presença de diferentes concentrações de sais (LI *et al.*, 2002). Uma lacase purificada a partir do fungo marinho NIOCC #2a não foi inibida na presença de NaCl (até 0,3 M) e, além disso, foi capaz de descolorir vários corantes sintéticos na presença de água do mar e também diferentes efluentes têxteis (D'SOUZA *et al.*, 2006).

Enzimas extracelulares (MnP e LiP) do fungo da podridão parda *Laetiporus sulphureus*, isolados de um bosque de mangue tropical, foram capazes de oxidar compostos modelos para degradação de corante (Remazol Azul Brilhante-R) e fenol (guaiacol). Sua cultura na forma imobilizada foi capaz de remover um máximo de 90 % da cor de um efluente têxtil (MTUI; MASALU, 2007). *Cerrena unicolor* MTCC 5159, um basidiomiceto também proveniente de manguezal, produziu lacase com inúmeras isoformas, das quais, pelo menos uma apresentou-se termoestável, halotolerante e altamente resistente a metais (D´SOUZA-TICLO *et al.*, 2009). Já Bonugli-Santos *et al.* (2010) explorando o potencial enzimático de ascomicetos (*Aspergillus sclerotiorum* e *Cladosporium cladosporioides*) e do zygomyceto *Mucor racemosus*, evidenciaram que o último possui uma alta atividade de Lac e MnP na presença de sal. Todas estas investigações com fungos de ambiente marinho são alguns exemplos que demonstram o potencial de aplicação biotecnológica destes organismos ou suas enzimas na descoloração de efluentes têxteis.

2.4.2 Mecanismo de biosorção

Dentre as várias tecnologias de tratamento de efluentes têxteis, a biosorção vem demonstrando ser uma alternativa potencialmente atrativa para destoxificação e remoção de corantes. Isto se deve, principalmente, a sua alta versatilidade de remoção de corantes estruturalmente diversificados e, também, pela facilidade de operação e eficiência da eliminação de cor em grandes volumes de água (SUMATHI; MANJU, 2000; XIONG *et al.*, 2010). O material sobre o qual ocorre a biosorção é denominado de biosorvente, e a substância removida é designada de biosorbato. A formação de uma camada biosorvida numa superfície não é um processo instantâneo, mas é geralmente governado pela velocidade de difusão da substância tensoativa através da solução, em direção à interface (PORPINO, 2009).

A biosorção é definido como sendo um processo no qual sólidos de origem natural, ou seus derivados, são utilizados na remoção de partículas e moléculas orgânicas e inorgânicas em solução, através de interações de natureza física ou química (MAURYA *et al.*, 2006; ANJANEYA *et al.*, 2009). Estes mecanismos diferem-se da bioacumulação, que abrange o acúmulo do poluente na região intracelular, envolvendo, para isso, processo biológico dependente de metabolismo

(GADD, 2009).

O carvão ativado é o biosorvente mais usado na remoção de compostos orgânicos não biodegradáveis de efluentes industriais aquosos (AKSU, 2005). No entanto, esta opção possui a desvantagem de ser cara e inviável quando aplicada em larga escala industrial, além de que, o adsorvente é consideravelmente perdido, não sendo passível de reutilização em processos subsequentes (HE *et al.*, 2004). Por isso, ainda há necessidade de biosorventes alternativos de baixo custo e que possam ser regenerados, para assim viabilizar o processo em larga escala e substituir o carvão ativado. Apesar de todo material biológico ter uma habilidade biosortiva, a aplicação industrial da biosorção tem sido principalmente direcionada a sistemas microbianos, incluindo algas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras (GADD, 1990). Dentre estes, a utilização de biomassa fúngica é a mais promissora (FU; VIRARAGHAVAN, 2001).

Devido à complexidade da estrutura dos microrganismos, o processo de biosorção implica na existência de muitas vias para as células capturarem o poluente (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997). Embora compreendido de forma limitada, os mecanismos responsáveis pela biosorção podem ser um ou uma combinação de troca iônica, complexação, coordenação, adsorção química e física, interação eletrostática, quelação e micro-precipitação (WANG; CHEN, 2009). A parede celular da biomassa microbiana é composta por polissacarídeos, proteínas e lipídeos que oferecem abundantes grupos funcionais, tais como, carboxilas, fosfatos, hidroxilas, sulfatos e grupos amino, que são os responsáveis pela interação com o biosorbato (GADD; WHITE, 1985).

O desempenho biosortivo do corante pela biomassa depende de vários fatores. Além do tipo de biomassa (espécie, idade) e o método de preparação da biomassa (condição de cultura, quantidade, tamanho e tratamentos químicos), várias características físico-químicas da solução (temperatura, pH, presença de ligantes orgânicos e inorgânicos concorrentes, e concentração inicial do corante) podem afetar a capacidade de biosorção (MAURYA *et al.*, 2006; AKSU; BALIBEK, 2010).

Diversos estudos estão investigando a aplicação de tratamentos físico-químicos na biomassa microbiana após cultura, com intuito de aperfeiçoar as características de superfície da biomassa em relação à sua capacidade biosortiva (BAYRAMOGLU *et al.*, 2006; LOW *et al.*, 2008). Dentre os tratamentos para aumentar a capacidade de biosorção, submeter à autoclave e reagentes ácidos,

como ácido nítrico e sulfúrico, e alcalinos, como hidróxido de sódio, estão entre os mais usualmente empregados (RAO; VIRARAGHAVAN, 2002). É assumido que estes pré-tratamentos levam a um aumento de carga na superfície das células microbianas ou apenas abrir locais disponíveis para a adsorção e melhora da troca iônica (BAYRAMOGLU; ARICA, 2007).

Os processos de tingimento e acabamento das indústrias têxteis utilizam grandes quantias de sal, a fim de reduzir a solubilidade do corante, por aumentar o grau de agregação das moléculas do corante. Alguns corantes necessitam entre 250 e 300 g/L de sal para aumentar o banho de exaustão do corante (AKSU; BALIBEK, 2010). Assim sendo, as enzimas ou os organismos a serem usados no processo de tratamento de tais efluentes devem apresentar resistência ou tolerância a ambientes ricos em sal, razão pela qual microorganismos halotolerantes teriam, pelo menos em teoria, alguma vantagem e assim potencial aplicação neste tipo de tratamento de efluentes.

Estudos com fungos provenientes de ambiente marinho aproveitados para biosorção de corantes são muito pouco explorados. Dentre a escassa literatura disponível, Khambhaty *et al.* (2010) analisaram o potencial de biomassas do fungo marinho *Aspergillus wentii*, inativadas quimicamente de diferentes formas, na capacidade biosortiva do corante Vermelho Básico (BR 2). Além dessa, outra espécie marinha, *Aspergillus niger*, tratada com NaOH e alta temperatura, mostrou alta capacidade para rápida descoloração de diferentes tipos de efluentes têxteis (ARAGHI; ASSADI, 1998; ASSADI *et al.*, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de descoloração de corantes têxteis reativos por fungos filamentosos halotolerantes e caracterizar o processo mediador da descoloração.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Selecionar espécies fúngicas halotolerantes com alto potencial de descoloração de corantes têxteis;
- 2) Determinar a fração participante (micélio ou extrato extracelular) e o processo mediador da descoloração (biodegradação ou biosorção);
- 3) Avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de carbono e nitrogênio na produção de biomassa com atividade descorante;
- 4) Avaliar o efeito de condições da cultura, em relação ao pH, salinidade, idade da cultura e velocidade de agitação, na produção de biomassa com atividade descorante;
- 5) Verificar o efeito de tratamentos químicos e físicos da biomassa micelial na capacidade de descoloração de corantes estruturalmente diferentes;
- 6) Verificar o efeito da concentração de biosorvente, tempo de contato e pH no processo de biosorção;

4 METODOLOGIAS

4.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL GERAL

A partir de uma triagem inicial utilizando fungos isolados de manguezal, crescidos em meios de cultura contendo diferentes corantes têxteis, foram escolhidos, para continuidade da caracterização, espécies que possuíram os melhores resultados de descoloração. Nas linhagens selecionadas, como apresentado no fluxograma geral das etapas experimentais (Figura 3), foi avaliado, em escala de bancada, o potencial de descoloração em curto período de tempo, utilizando a fração micelial ou a porção do sobrenadante das culturas, com intuito de identificar a fração ativa responsável pela eliminação de cor. Constatada qual fração possui a melhor atividade descorante, foi avaliado, para todos os fungos selecionados, se a descoloração ocorre por meio de processo enzimático oxidativo ou por biosorção. Ao testar comparativamente o efeito descorante utilizando a biomassa ativa (viva) e inativa (esterilização por autoclave), se buscou avaliar a influência do metabolismo fúngico no processo de descoloração. Linhagens cujo processo de descoloração foi realizado por processo de biosorção foram avaliadas em relação ao efeito de fontes e concentrações de carbono e nitrogênio, pH, concentração salina, tempo de cultura e velocidade de agitação, na produção de biomassa ativa.

Depois da obtenção das condições de cultivo que produz biomassa com melhor eficiência de descoloração, foram analisados diferentes tratamentos químicos (adição de soluções ácidas, básicas ou salinas) sobre a biomassa cultivada, com intuito de modificá-la estruturalmente e aumentar a capacidade de biosorção. Por último foi avaliada a influência das condições da solução de um corante modelo no processo de biosorção (dose de biosorvente, tempo de contato e pH).

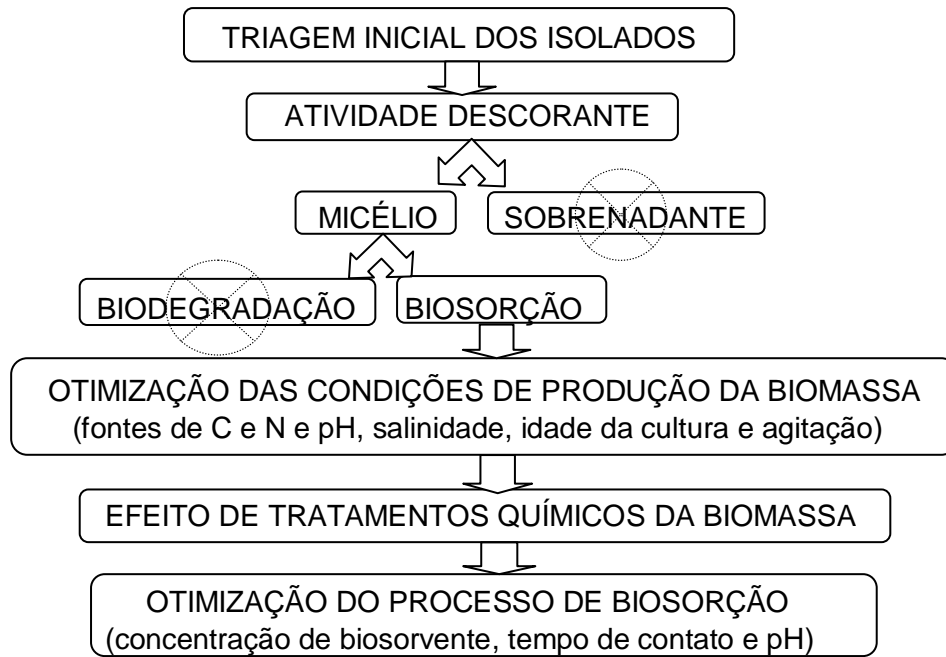


Figura 3 – Fluxograma geral das etapas experimentais do estudo.

4.2 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Em apenas uma amostragem (janeiro de 2008), durante período de baixamar, foi analisado a ocorrência e frequência de gêneros fúngicos filamentosos halotolerantes em 4 amostras de sedimento superficial de um manguezal localizado na Baía das Laranjeiras (Complexo Estuarino de Paranaguá, Litoral do Estado do Paraná, Brasil). As amostras foram transportadas em gelo para o laboratório de Microbiologia do CEM/UFPR, e os procedimentos de isolamento foram realizados dentro de 12 horas usando metodologia modificada de Gomes *et al.* (2008).

A identificação taxonômica dos fungos filamentosos isolados em meio Sabouraud-dextrose salino (40 g/L dextrose, 10 g/L peptona de carne, 15 g/L ágar, 24 g/L sal sintético em pH de 5,6) foi realizada via observação ao microscópio óptico das estruturas de reprodução, juntamente com as características macromorfológicas (BARNETT; HUNTER, 1972; ARX, 1974; LARONE, 1987; SILVEIRA, 1995). As estruturas reprodutivas foram obtidas através de técnica de micro-cultivo (KERN; BLEVINS, 1999), sendo fixadas e coradas em lactofenol com 0,05% de azul de algodão e lactofenol de Amann. As culturas de todos os fungos foram estocadas em geladeira (4°C) em meio inclinado e repicadas a cada três meses para conservação.

4.3 CORANTES UTILIZADOS

Os corantes utilizados neste estudo foram fornecidos pela empresa Siderquímica S/A, sediada em São José dos Pinhais (Paraná – BR). Todos os corantes pertencem à classe dos reativos e seus nomes comerciais, padronizados segundo “Colour Índex”, estão listados na Tabela 2, juntamente com o grupo cromóforo que caracteriza a estrutura química de cada corante individualmente.

Análises de espectrofotometria UV-Vis (200-800 nm) foram realizadas de soluções aquosas contendo, por separado, os corantes em estudo e, com base no espectro de absorção, foram selecionados os comprimentos de onda de absorbância máxima para cada corante testado. Para todos os experimentos as soluções de corante foram preparadas no dia de sua utilização para evitar evaporação e possível fotodegradação. A Figura 4 mostra as estruturas de dois dos corantes estudados.

Tabela 2 – Grupo cromóforo dos corantes em estudo e suas denominações comerciais e segundo o “Colour Index”.

Nome comercial	Nome “Colour Índex”	Cromóforo
Amarelo HE6G (sidercron)	Amarelo Reativo 135 (RY 135)	-
Amarelo HE4R (sidercron)	Amarelo Reativo 84 (RY 84)	Diazo
Vermelho BF3SR (sidercron)	Vermelho Reativo 195 (RR 195)	Monoazo
Azul VSBB (sidercron)	Azul reativo 220 (RB 220)	Antraquinona

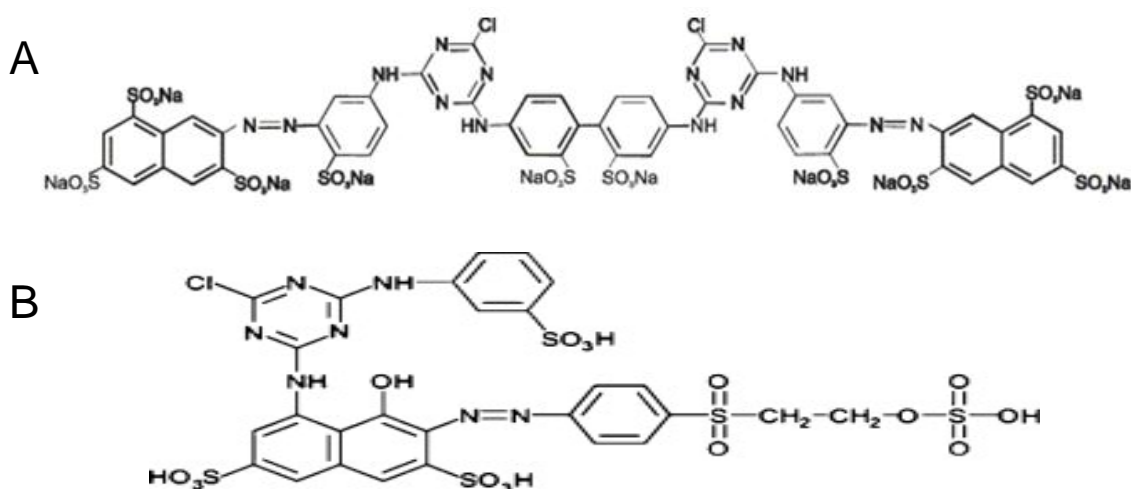


Figura 4 – Estrutura química dos corantes: (A) Amarelo Reativo 84 e (B) Vermelho Reativo 195. Fonte: NEAMTU *et al.*, (2004) e BELESSI *et al.* (2009).

4.4 PROCEDIMENTO DE INOCULAÇÃO DAS CULTURAS

Para utilização dos fungos em todos os experimentos, estes foram inoculados individualmente em placas de Petri contendo meio de cultura mínimo salino contendo (por litro de água bidestilada): 10 g dextrose; 6 g NaNO₃; 1,5 g KH₂PO₄; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO₄; 0,01 g FeSO₄.7H₂O; 0,02 g ZnSO₄.7H₂O; 15 g ágar e 24 g de sal sintético em pH calibrado para 5,6 (adicionando NaOH ou HCl 0,1 M). Após período de incubação (15 dias sob escuridão) à 28°C, inóculos padronizados de fragmento micelial foram retirados aleatoriamente da borda das placas utilizando um “punch” de biopsia estéril. Para o ensaio de triagem inicial, foi utilizado um único fragmento de 10 mm de diâmetro, enquanto que para os demais experimentos foram três frações de 5 mm de diâmetro cada. Após esta inoculação em frascos estéreis contendo 6 mL de meio mínimo líquido ou sólido (sua composição química vai variar de acordo com o experimento), os frascos foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente. Os ensaios de triagem inicial foram realizados em duplicada e os demais experimentos todos em triplicatas.

4.5 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

4.5.1 Análises de absorbância

O monitoramento da eficiência de descoloração no experimento de triagem inicial foi determinado através da diminuição da absorbância no comprimento de onda máximo para cada corante em relação à amostra controle (mesmo meio, porém sem inóculo). A eficiência de descoloração para o estudo de triagem inicial e nos experimentos subseqüentes foi expressa em termo de percentual de remoção de corante que foi calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de descoloração} = 100 \times \frac{(\text{Abs}_0) - (\text{Abs}_t)}{(\text{Abs}_0)} \quad (\text{A})$$

no qual abs_0 é a absorvância no tempo zero (ou amostra controle) e abs_t é a absorvância no tempo avaliado.

4.5.2 Ensaio de atividade descorante

Os ensaios de atividade descorante tinham por finalidade avaliar a capacidade dos sobrenadantes/eluídos ou da massa micelial em descorar uma solução padrão de corante em intervalo de tempo reduzido. A diminuição da absorvância no comprimento de onda máximo de cada corante foi avaliada e medida pelo decréscimo em relação à média dos controles no tempo zero. Nestes experimentos, o sobrenadante/eluído ou a biomassa foram retirados da cultura por separado e misturados em solução de MS contendo 100 mg/L do corante teste mais tampão citrato fosfato (50 mM; pH 4,0). Antes, a fração micelial passa por lavagem em MS por meio de centrifugação (5 min a 10 mil rpm) para retirada de partículas não miceliais. Tão logo as soluções reacionais eram misturadas, procedia-se com a aferição da absorvância em espectrofotômetro Spectrumlab (mod. 22PC), sendo novas medidas tomadas em intervalos de 30 min, até os 90 min, ou apenas em 90 minutos de reação.

Como controle experimental, para todo ensaio realizado foi analisado, em triplicata, amostras contendo a mesma solução reacional do ensaio, porém sem a biomassa ou sobrenadante/eluído, para estimar a possibilidade de remoção de corante por adsorção pela parede dos frascos.

4.6 TRIAGEM INICIAL DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO

Os 52 fungos filamentosos halotolerantes isolados foram inoculados em meio mínimo salino, em cultura submersa e no estado sólido, contendo na mesma proporção três corantes reativos diferentes (RY 135; RR 195 e RB 220) numa concentração final de 100 mg/L. A descoloração, após 15 dias de incubação a 28°C no escuro e sob condição estática, foi monitorada por espectrofotômetro de varredura (Shimadzu UV-160A), nos comprimentos de onda de 200 a 800 nm.

Para a obtenção da amostra das culturas líquidas contendo corantes, estas foram centrifugadas por 5 min a 10 mil rpm (Eppendorf, mod. 5415c) e, posteriormente, foi retirado o sobrenadante para imediata análise de absorvância. Para as culturas em estado sólido foi primeiramente realizado procedimento de eluição das substâncias contidas no meio, no qual consiste em rasgar o meio, adicionar 2 mL de meio de sais (MS) que contém a mesma composição do meio mínimo líquido, porém sem fontes de carbono e nitrogênio, e encaminhar à agitação em agitador orbital (Certomat MOB, Braun Biotech) por 30 min à 175 rpm. O processo foi repetido mais uma vez e os sobrenadantes analisados da mesma forma que as amostras obtidas da fermentação submersa.

4.7 DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA E DO PROCESSO MEDIADOR

Para determinar a fração responsável pelo processo de descoloração, foram realizados ensaios de atividade descorante, tanto da biomassa micelial, como do extrato de secreção oriundos de meio de cultura no estado líquido. Para isso, os fungos foram, primeiramente, cultivados em meio mínimo salino sem adição de corantes e, após coleta das frações por separado, estas foram submetidas ao teste de atividade descorante (já descrito na seção 4.5.2), utilizando como modelo o corante reativo Azul VSBB (RB 220). Entre os intervalos de leitura, as amostras foram mantidas em estufa a 28°C, sem iluminação e agitação.

Constatando-se que foi o sobrenadante/eluído a principal parcela ativa responsável pela descoloração, a presença de enzimas modificadoras de lignina foi

determinada pelo método de Jordaan e Leukes (2003) modificado. A presença destas enzimas foi apurada pelo monitoramento da oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)) a 420 nm, em intervalos de 5 min durante 15 min, em espectrofotômetro Spectrumlab (mod. 22PC). Foram preparados três conjuntos de ensaio (Tabela 3), cada um em duplicata e com seu respectivo controle (mesmo meio reacional, mas sem inóculo). Os componentes de cada ensaio foram preparados em soluções concentradas (10x), sendo 200 µL de cada um desses estoques adicionados no ensaio, com mais 950 µL de água destilada. Por último, 250 µL da amostra foi acrescentada, levando a um volume final de 2 mL. Tão logo a amostra foi adicionada, se fez a leitura de absorbância, correspondente ao tempo zero.

Ao ser averiguado que a biomassa micelial era a fração ativa do processo de descoloração, foi analisado se o mecanismo ocorre por meio de atividade enzimática ou mediante biosorção do corante pelo fungo. Para isso, foi verificada a possibilidade de enzimas aderidas ao micélio atuarem no processo. Assim sendo, foram realizados ensaios com inibidores de oxidorreduções para averiguação da influência destas enzimas no processo de descoloração (azida de sódio, 10 mM; catalase, 200 u/L e EDTA, 20 mM).

A seguir, foi investigado, através de ensaios de atividade descolorante, se o processo de descoloração ocorre através de mais de um mecanismo. Para isto, foi testado o potencial de descoloração frente ao corante modelo (RB 220), utilizando o micélio autoclavado (inativado a 121°C por 30 min) e o micélio fresco (viável; ativo metabolicamente). A implicação do metabolismo fúngico no processo de descoloração para cada fungo testado foi assim avaliada, uma vez que a biosorção ocorre tanto com a biomassa viva (viável) quanto morta (inviável metabolicamente) e a biodegradação advém apenas com a biomassa viável (não desnaturada).

Nestes experimentos, toda biomassa crescida nos 6 mL de meio (em 15 dias sob escuridão a 28°C) foi utilizada como extrato micelial para as atividades descolorantes. No final das análises de atividade descolorante, as biomassas testadas foram submetidas a secagem para obtenção do peso seco micelial através de análise gravimétrica (estufa à 50°C até peso constante, descontando o peso do corante sorvido). Dessa forma, foi possível determinar o quanto de corante foi removido (em mg) por peso de massa micelial seca (em g) para cada fungo analisado. A capacidade de biosorção (q_e) em mg/g foi calculada por meio da

equação do balanço de massas pela seguinte fórmula:

$$\text{Capacidade de biosorção } (q_e) = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{M} \quad (\text{B})$$

onde C_0 e C_e representam a concentração do corante (mg/L) na solução no tempo zero e no tempo pré determinado (min), respectivamente, V é o volume da solução (em litros) e M é a quantidade de biosorvente utilizado no ensaio (g). Estes resultados foram usados para selecionar quatro espécies com maior potencial de descoloração para se prosseguir nos ensaios de caracterização do processo de descoloração.

Tabela 3 – Composição dos três ensaios utilizados para caracterizar e medir a atividade enzimática.

	MnSO₄ 20mM	H₂O₂ 0,05mM	Catalase 200 U/L	EDTA 20mM	ABTS 0,05mM	Tampão Acetato (pH 5,0) 50mM
MnP	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
MiP	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Lacase	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim

FONTE: Modificado de Jordaan e Leukes (2003).

4.8 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DO BIOSORVENTE

4.8.1 Influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio

Determinado quais fungos possuem melhor atividade descolorante, qual foi a fração ativa e o mecanismo mediador do processo de descoloração, foi testado o efeito de várias fontes e concentrações de carbono e nitrogênio na produção de biomassa (rendimento por meio de peso seco) e atividade descolorante (eficiência de descoloração em 90 min.).

Foram avaliadas seis fontes de carbono (glicose, sacarose, maltose, amido, frutose e glicerol) e nitrogênio (nitrato de sódio, uréia, cloreto de amônia, tartarato de amônia, oxalato de amônia e peptona) em três concentrações distintas (1; 5 e 15 g/L). Inicialmente foi analisada a melhor fonte de carbono e em seguida, o efeito do

nitrogênio na produção de biomassa e atividade descorante. Neste último ensaio o meio de cultivo continha a melhor fonte de carbono obtida anteriormente, juntamente com as diversas fontes e concentrações de nitrogênio.

As amostras foram obtidas através de cultivo em meios mínimos líquidos salinos sem agitação (28°C na escuridão). A composição dos meios como já descrito possuem variação unicamente na fonte e teor de carbono e nitrogênio. Após o período de cultivo (15 dias) as culturas foram centrifugadas, o micélio separado, lavado e autoclavado (30 min em 121°C). Em seguida a biomassa foi seca em estufa à 50°C até peso constante e depois pesada em balança analítica.

Para todos os experimentos subseqüentes, o tratamento da biomassa passou por todas estas etapas, inclusive, por procedimento de maceração e passagem por peneiras para obtenção de partículas com diâmetros homogêneos e padronizados para todos os ensaios. Para a escolha do tamanho de partícula a ser empregado foi realizado um ensaio teste, no qual quatro diferentes diâmetros de biomassa (> 500 µm; 355-500 µm; 250-355 µm e < 250 µm) foram avaliados sobre o efeito na atividade descorante, sendo o melhor tratamento selecionado como padrão. Os diferentes tamanhos de partícula biosorvente foram obtidos com a introdução da biomassa macerada em peneiras granulométricas (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda) com malhas de 250, 355 e 500 µm. As partículas retidas nas malhas de peneiramento de 250, 355 e 500 µm foram consideradas como sendo biosorventes de diâmetros entre 250-355 µm, 355-500 µm e > 500 µm, respectivamente. Os menores tamanhos de partículas (< 250 µm) foram as que passaram pela malha de peneiramento de 250 µm.

4.8.2 Influência do pH, salinidade, agitação e idade da cultura

Para estes ensaios foram utilizadas as melhores fontes e concentrações de carbono e nitrogênio tanto para produção de quantidade de biomassa quanto para eficiência de descoloração. A influência dos parâmetros, idade de cultura, pH, velocidade de agitação e teor de sal, na produção de biomassa ativa, foi analisada por meio de um planejamento experimental estatístico. Para isto, foi proposto um desenho fatorial de Box-Behnken com três níveis para cada fator/variável (BOX; BEHNKEN, 1960) e Metodologia de Superfície de Resposta (BEZERRA *et al.*, 2008).

Estas análises foram desenvolvidas com utilização do *software* Design Expert 8.0.4. Trial (Stat-Ease, Inc.) e os níveis adotados para cada variável estão apresentados na Tabela 4.

O planejamento experimental fatorial (método multivariado) é uma ferramenta estatística usada para se obter as melhores condições operacionais de um sistema sob estudo com um número menor de experimentos quando comparado com o método univariado de otimização de processos (“um fator por vez”). Por ser uma análise em que todas as variáveis/fatores são analisadas simultaneamente, o planejamento experimental estatístico, ao contrário do univariado, possibilita com precisão determinar quais variáveis/fatores possuem efeitos mais relevantes na resposta e, ainda, permite medir as interações entre os diferentes fatores e seus níveis.

Tabela 4 – Níveis das variáveis do planejamento experimental. Os níveis estão representados através de códigos (-1; 0 e +1) e pelos valores reais.

Fatores / variáveis	Níveis dos fatores		
	Baixo	Ponto central	Alto
pH	4,2 (-1)	5,6 (0)	7,0 (+1)
Salinidade (g/L)	2 (-1)	13 (0)	24 (+1)
Idade da cultura (dias)	10 (-1)	15 (0)	20 (+1)
Velocidade de agitação (rpm)	0 (-1)	75 (0)	150 (+1)

O desenvolvimento experimental foi realizado com 29 combinações de variáveis de acordo com a matriz de planejamento proposta na Tabela 5. Destes 29 ensaios, cinco foram repetições no ponto central para cálculo de erros experimentais. Estes ensaios foram realizados em duplicata e a média analisada estatisticamente no *software* Design Expert citado acima. Os resultados foram analisados através do coeficiente de determinação (R^2), análise de variância (ANOVA) e resposta de superfície. Um método de regressão não linear foi utilizado para ajustar o polinômio de segunda ordem aos dados experimentais e identificar os termos do modelo em questão.

Tabela 5 – Matriz do desenho experimental de Box-Behnken. Os níveis estão representados através de códigos (-1; 0 e +1) e pelos valores reais.

N° ensaio	pH	Salinidade (g/L)	Idade da cultura (dias)	Velocidade de agitação (rpm)
1	2 (-1)	4,2 (-1)	15 (0)	75 (0)
2	24 (+1)	4,2 (-1)	15 (0)	75 (0)
3	2 (-1)	7,0 (+1)	15 (0)	75 (0)
4	24 (+1)	7,0 (+1)	15 (0)	75 (0)
5	13 (0)	5,6 (0)	10 (-1)	0 (-1)
6	13 (0)	5,6 (0)	20 (+1)	0 (-1)
7	13 (0)	5,6 (0)	10 (-1)	150 (+1)
8	13 (0)	5,6 (0)	20 (+1)	150 (+1)
9	2 (-1)	5,6 (0)	15 (0)	0 (-1)
10	24 (+1)	5,6 (0)	15 (0)	0 (-1)
11	2 (-1)	5,6 (0)	15 (0)	150 (+1)
12	24 (+1)	5,6 (0)	15 (0)	150 (+1)
13	13 (0)	4,2 (-1)	10 (-1)	75 (0)
14	13 (0)	7,0 (+1)	10 (-1)	75 (0)
15	13 (0)	4,2 (-1)	20 (+1)	75 (0)
16	13 (0)	7,0 (+1)	20 (+1)	75 (0)
17	2 (-1)	5,6 (0)	10 (-1)	75 (0)
18	24 (+1)	5,6 (0)	10 (-1)	75 (0)
19	2 (-1)	5,6 (0)	20 (+1)	75 (0)
20	24 (+1)	5,6 (0)	20 (+1)	75 (0)
21	13 (0)	4,2 (-1)	15 (0)	0 (-1)
22	13 (0)	7,0 (+1)	15 (0)	0 (-1)
23	13 (0)	4,2 (-1)	15 (0)	150 (+1)
24	13 (0)	7,0 (+1)	15 (0)	150 (+1)
25	13 (0)	5,6 (0)	15 (0)	75 (0)
26	13 (0)	5,6 (0)	15 (0)	75 (0)
27	13 (0)	5,6 (0)	15 (0)	75 (0)
28	13 (0)	5,6 (0)	15 (0)	75 (0)
29	13 (0)	5,6 (0)	15 (0)	75 (0)

4.9 EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA CAPACIDADE BIOSORTIVA

Depois de determinada as melhores condições de produção de biomassa com atividade decolorante foi analisada a influência de tratamentos químicos da biomassa cultivada na melhoria do potencial de biosorção corantes. Tal efeito foi investigado frente a três corantes estruturalmente distintos (RB 220 – antraquinona; RY 84 – diazo e RR 195 – monoazo) e, para cada corante, nove diferentes compostos

químicos (0,1 M de NaOH, HCl, H₂SO₄, CaCl₂, NaHCO₃, Na₂CO₃, NaCl e formaldeído e 5 g/L de detergente neutro), individualmente, foram utilizados como tratamentos químicos. Os micélios extraídos das culturas foram lavados por centrifugação e expostos por período de 24 horas aos reagentes citados anteriormente. Após este período, as amostras foram lavadas com quantidade generosa de água bidestilada (duas centrifugações por 5 min a 5000 rpm) para então serem autoclavadas, secas, pesadas, maceradas e peneiradas. Para efeito de comparação, também foram analisadas amostras sem exposição a nenhum tratamento químico, porém submetido normalmente a autoclavagem, como nos demais tratamentos. Os ensaios de atividade descorante foram conduzidos nos comprimentos de onda da absorvância máxima de cada corante por separado. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e os valores médios utilizados na análise de dados

4.10 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA NO PROCESSO DE BIOSORÇÃO

4.10.1 Efeito da quantidade de massa micelial no processo de biosorção

Uma vez otimizadas as condições de produção de biomassa e o tratamento químico mais eficaz para a maioria dos corantes, foi analisado o efeito da quantidade de massa micelial no processo de biosorção. Para isto, os ensaios foram conduzidos em soluções contendo o corante RB 220 na concentração de 200 mg/L e com massa micelial variando de 0,5 a 4 g/L de solução de corante. As amostras foram condicionadas em “Erlenmeyers” (50 mL) contendo 10 mL de solução de corante e encaminhados à estufa (28 °C, sem iluminação) sob agitação constante de 175 rpm e pH 4,0. A absorvância foi monitorada após 90 min de reação (tempo de contato) e o resultado de equilíbrio das massas foi fixado para os próximos ensaios.

4.10.2 Efeito do tempo de contato e pH no processo de biosorção

As variáveis manipuladas para caracterização do processo de biosorção foram o pH e o tempo de contato da solução com o biosorvente. Estas variáveis foram analisadas por método univariado “um fator por vez”, sendo o efeito do tempo de contato analisado primeiramente. Com as mesmas condições do ensaio anterior (28 °C, 175 rpm de agitação e pH 4), 50 mL de solução do corante RB 220 em concentração de 200 mg/L foram inseridos em “Erlenmeyers” de 125 mL e após início do experimento, alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos: 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 105, 120, 135, 150, 165 e 180 minutos.

O efeito do pH inicial da solução de corante RB 220 (200 mg/L) na capacidade de biosorção foi analisado no tempo de contato de equilíbrio. Os “Erlenmeyers” de 50 mL contendo 10 mL de solução foram agitados a 175 rpm à 28 °C e os valores de pH da solução ajustados usando 0,1 M de HCl e NaOH. Os diferentes valores de pH, de 2 a 10, foram utilizados para verificação da influência deste no processo biosortivo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores médios utilizados na análise dos dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS

Foram isoladas 2038 unidades formadoras de colônia de fungos filamentosos, classificados através de técnicas convencionais como pertencentes a 52 linhagens/fenótipos diferentes. Do total, onze linhagens se destacaram por terem ocorrido em todas as amostras e dezenove apareceram apenas esporadicamente. Os três fenótipos mais freqüentes corresponderam juntos a 59% do total. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Gomes (2007) e Ghizelini (2002), nos quais algumas poucas variedades representaram em freqüência de ocorrência mais que 50% dos isolados fúngicos do sedimento de um manguezal. O levantamento taxonômico dos isolados e suas freqüências de ocorrência se encontram em Anexo I.

Trinta e cinco morfotipos foram classificados dentro de onze gêneros. *Penicillium* foi o gênero com o maior número de espécies isoladas (10), seguidos de *Aspergillus* (6), *Trichoderma* e *Paecilomyces* (4 cada), *Acremonium* (3), *Cladosporium* e *Alternaria* (2) e *Curvularia*, *Phoma*, *Fusarium* e *Mucor* com apenas um representante. As demais linhagens (17) não foram identificadas (denominadas como N.I.) por não terem desenvolvido corpos de frutificação. Este fato pode ser atribuído as condições de cultura, uma vez que estudos evidenciaram que a composição do meio (SHARMA; PANDEY, 2010) e a luminosidade (DHINGRA; SINCLAIR, 1995), dentre outros condicionantes, podem influenciar na esporulação de espécies fúngicas (KUMARA; RAWAL, 2008).

Todos os gêneros identificados no presente estudo pertencem ao filo Ascomycota, com exceção do isolado *Mucor* que é Zygomycota. Da mesma forma, Hyde (1991) constatou que os ascomicetos formaram o grupo taxonômico mais comum na região entremarés de um manguezal no Mar do Sul da China, e além deste, em todo o mundo há registros de que os fungos associados à manguezais são preponderantes do filo Ascomycota (SCHMIT; SHEARER, 2003).

O conhecimento da microbiota do sedimento, além de essencial para o levantamento taxonômico das populações autóctones, pode contribuir para o

conhecimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004). Características intrínsecas do ambiente de manguezal, como elevada carga orgânica e sumidouro/receptor de poluentes (KE *et al.*, 2005), sugerem um habitat promissor para fonte de microrganismos produtores de enzimas com alta capacidade biodegradadora. Wu (1993) demonstrou que muitos dos ascomicetos de manguezal secretaram várias enzimas capazes de atuar na decomposição de detritos lignocelulolíticos. A tolerância a altas concentrações de sais pode ser considerada também como fator muito vantajoso em processos de biorremediação de ambientes marinhos e efluentes industriais. No entanto, a maior parte dos estudos que utilizam fungos para descoloração de corantes têxteis está restrito ao uso de organismos terrestres e, somente, nos últimos anos, fungos associados ao ambiente marinho, estão sendo investigados para aplicação na descoloração de corantes têxteis sintéticos.

5.2 TRIAGEM DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DOS ISOLADOS

Do total de 52 fenótipos isolados, 38 foram considerados potenciais candidatos para descoloração, por terem desenvolvido nos meios de cultura contendo os três corantes reativos (RB 220; RR 195 e RY 135). As demais espécies (14) foram desconsideradas, pois não desenvolveram em cultura contendo meio mínimo ou, simplesmente, foram inibidas pela presença dos corantes testados. Para critério de triagem dos fenótipos com melhor capacidade de descoloração, estes foram comparados quanto às suas eficiências de descoloração. Os morfotipos mais eficientes foram selecionados por meio dos seus potenciais de descoloração em cultura serem altos para pelo menos dois dos três modelos de corantes testados.

Em condições de fermentação submersa (FS), onze espécies apresentaram, para pelo menos dois corantes, percentual de descoloração maior que 70 % em 15 dias de incubação. Dessas, oito foram hábeis em relação aos três corantes (Figura 5). Na fermentação em estado sólido (FES), oito espécies, para dois corantes, e quatro, para três corantes, proporcionaram resultados maiores que 70 % de descoloração. No geral, as atividades de descoloração foram melhores para FS do que para FES (dados apresentados no Anexo II).

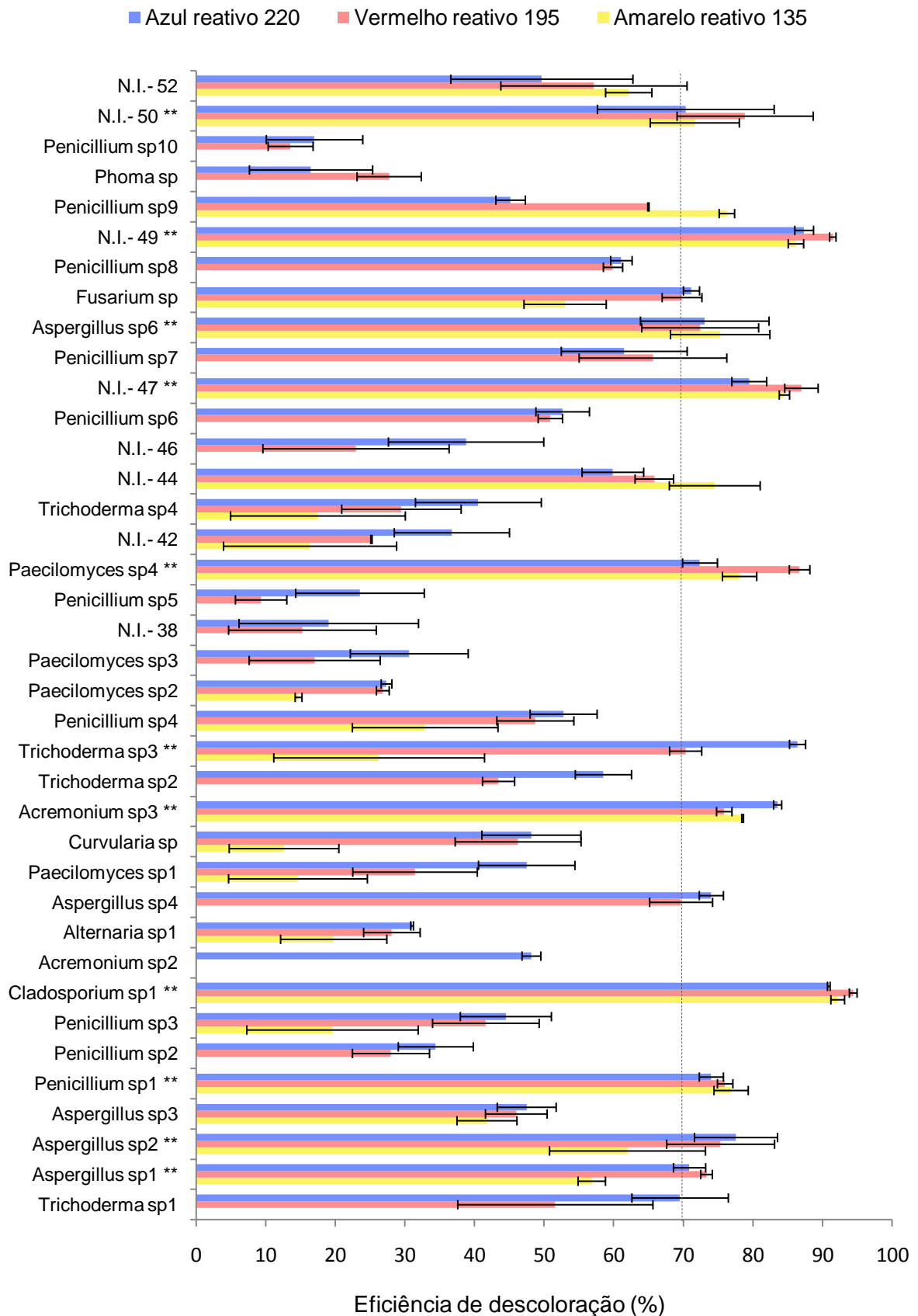


Figura 5 – Média e desvio padrão da eficiência de descoloração (%) de três corantes têxteis após 15 dias de incubação. Das 38 linhagens avaliadas, as 11 demarcadas com ** foram selecionadas para a continuidade da pesquisa.

Um fator determinante para escolha da melhor condição física de cultivo foi que na FES uma grande variedade de linhagens terem produzido forte pigmentação. Como em Junghanns *et al.* (2008), isto dificultou o monitoramento da absorbância e, conseqüentemente, impediu uma correta avaliação da descoloração em sistema sólido, fato não ocorrido na FS. Dessa forma, somente o sistema em estado líquido foi escolhido para a caracterização do processo de descoloração.

Baseado nas suas capacidades de descoloração após 15 dias de incubação em cultura líquida, as onze linhagens mais eficientes (*Aspergillus* sp1, *Aspergillus* sp2, *Aspergillus* sp6, *Penicillium* sp1, *Trichoderma* sp3, *Acremonium* sp3, *Paecilomyces* sp4, *Cladosporium* sp1 e N.I.- 47, 49 e 50) foram selecionados para os ensaios subseqüentes. A espécie mais promissora, *Cladosporium* sp1, foi à única que obteve, para os três corantes, mais que 90 % de eficiência de descoloração em 15 dias de cultura.

O perfil de absorção de luz no espectro UV-Vis da solução controle, meio contendo a mistura dos três corantes, porém sem inóculo, demonstrou a presença de quatro picos característicos (Figura 6 A). O primeiro pico (280 nm) é correlativo à absorbância para anéis aromáticos, cujas estruturas são comuns em moléculas de corante. Os demais picos, 420, 540 e 610 nm, correspondem às absorbâncias dos grupos cromóforos dos corantes reativos, amarelo (RY 135), vermelho (RR 195) e azul (RB 220), respectivamente.

Como pode ser observada nas Figuras 6 (B e C), as onze espécies selecionadas apresentaram ótimos resultados de descoloração para os corantes RR 195 e RB 220. Apenas três linhagens (*Aspergillus* sp1; *Aspergillus* sp2 e *Trichoderma* sp3) não foram eficazes na descoloração do corante RY 135. Dessa forma, a maioria das linhagens selecionadas mostrou ótima eficiência de descoloração de corantes com diferenças estruturais, fator muito importante na aplicação em efluentes industriais.

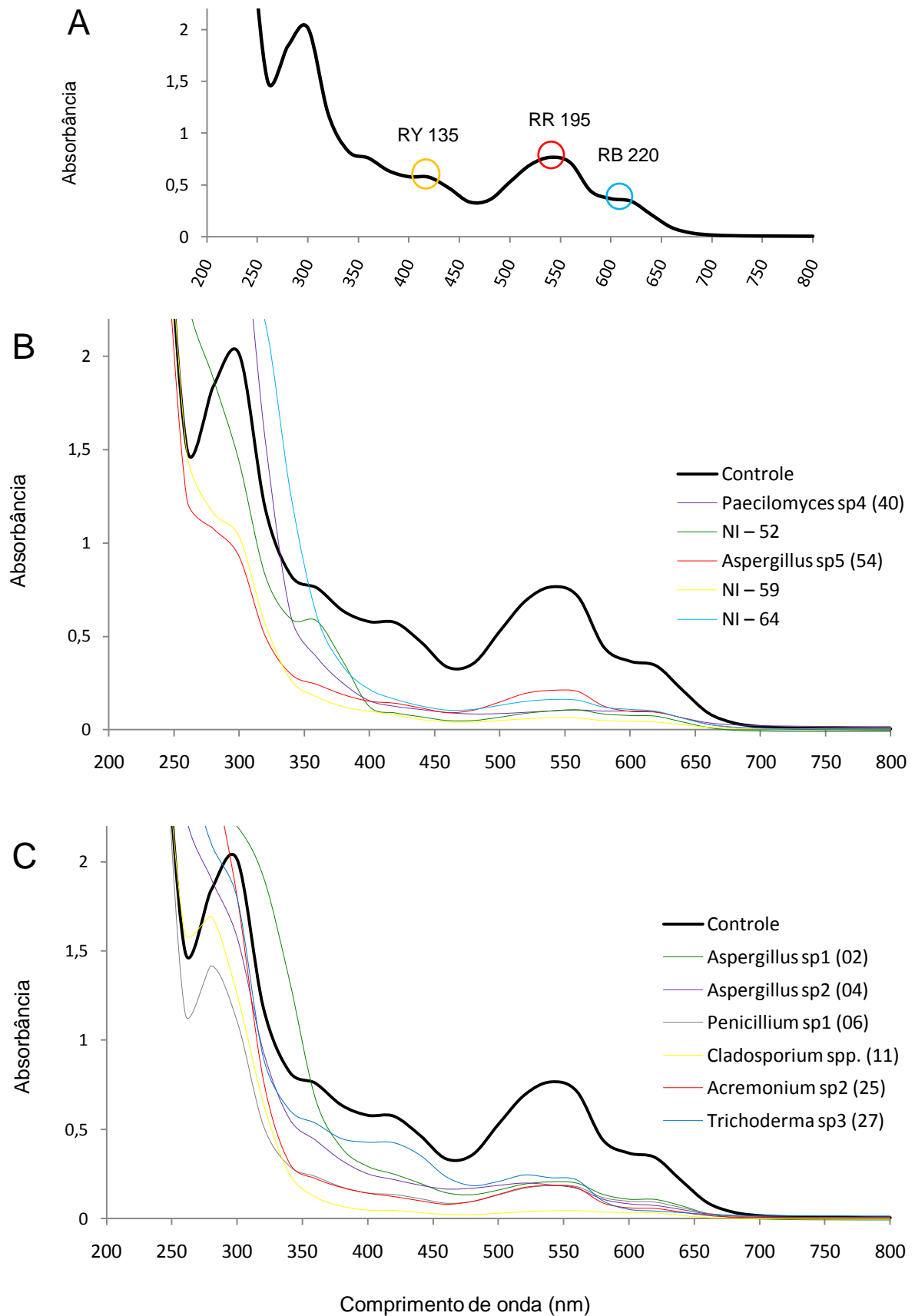


Figura 6 – Espectros de absorção de luz UV-Vis do (A) meio de cultura contendo a mistura dos três corantes, porém sem inóculo (solução controle), e das (B) e (C) médias da FS das 11 linhagens selecionadas após 15 dias de cultura em meio contendo 100 mg/L da mistura dos três corantes.

A biosorção e a degradação enzimática são os processos envolvidos na remoção de cor por fungos. No entanto, um ou os dois mecanismos podem participar da descoloração, dependendo do fungo utilizado (ALI *et al.*, 2008). O método de triagem adotado neste estudo permitiu visualmente identificar a presença dos corantes aderidos à superfície do micélio após os 15 dias de cultura. Este resultado é um indício indireto de que a eliminação de cor do meio de cultura seja realizada através de mecanismo de biosorção. No entanto, enzimas aderidas ao micélio também podem estar atuando na descoloração do corante adsorvido (NOVOTNY *et al.*, 2004). Como exemplo, Verma (2009) divulgou dois fungos ascomicetos marinhos capazes de descolorir efluentes têxteis, quer por bioadsorção do corante ou biodegradação mediada por laccase.

Cladosporium sp1, a linhagem mais eficaz na descoloração em cultura estacionária submersa dentre as 38 avaliadas, não foi possível diagnosticar coloração roxa (mistura dos três corantes) aderida ao micélio que é de cor naturalmente preta. Dessa forma, o processo de descoloração em algum momento, para pelo menos uma linhagem dentre as onze selecionadas, pode estar sendo conduzido exclusivamente por meio de degradação enzimática. Uma outra possibilidade é o envolvimento de mais de um mecanismo de descoloração dos corantes atuando subsequentemente. Assim como ocorrido com uma espécie de *Penicillium* sp. que inicialmente adsorvia o corante (Poly R-478) em seu micélio e conforme a cultura envelhecia ele era degradado por enzimas presentes no micélio (Zheng *et al.*, 1999). Com base nestas experiências, ainda não é possível descartar o envolvimento de enzimas no processo de descoloração das onze linhagens a serem caracterizadas.

5.3 DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA E DO PROCESSO MEDIADOR

Para caracterização da fração responsável pelo processo de descoloração foram realizados ensaios separados de atividade descolorante tanto da biomassa micelial pré-crescida como da fração líquida da cultura (extrato de secreção). Os resultados comparativos da eficiência de descoloração frente ao corante modelo (RB 220) evidenciaram que, para todos os onze fungos selecionados, somente a

fração micelial possui significativa atividade descorante (Figura 7).

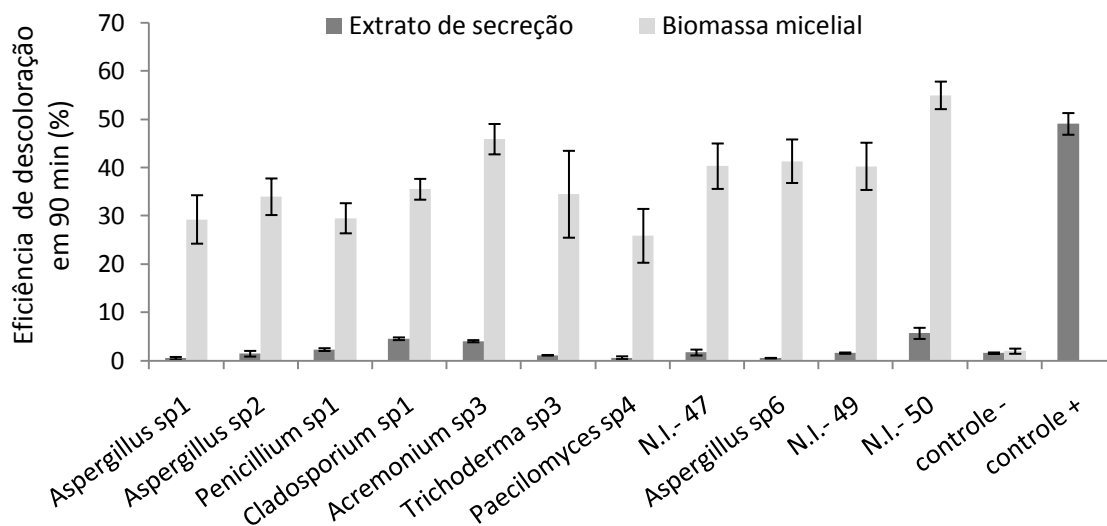


Figura 7 – Eficiência de descoloração (%) do corante modelo Azul VSBB ou RB 220 (concentração inicial de 100 mg/L) em 90 min de contato com o micélio e o extrato de secreção. Média e desvio padrão das onze linhagens e dos controles, negativo (-) e positivo (+).

Como controle positivo do ensaio, foi utilizada uma estirpe fúngica filamentosa do meio terrestre (sem identificação) mantida no laboratório e com reconhecida capacidade degradativa do corante RB 220. Os resultados demonstraram que o potencial de descoloração averiguado em todas as linhagens provavelmente não é procedente da atividade de enzimas extracelulares. Esta implicação, no entanto, ainda não descarta a possibilidade de atividade enzimática no processo de descoloração. Assim sendo, em outros dois experimentos foram verificadas a possibilidade de enzimas aderidas ao micélio atuarem na remoção do corante modelo em solução.

O primeiro experimento, utilizando tratamentos com micélios na ausência e presença de inibidores enzimáticos, indicou que a fração micelial da cultura, para todas as linhagens, não teve sua capacidade de descoloração afetada com a presença de inibidores das principais enzimas modificadoras de lignina (Figura 8). A análise de variância (ANOVA) evidenciou diferença significativa entre os dois tratamentos (com e sem inibidores) somente em relação ao controle positivo ($p < 0,05$), indicando que a inibição enzimática no sistema experimental agiu conforme esperado. Dessa forma, o processo de descoloração proporcionado por

todos os fungos analisados, mesmo que não participe as principais enzimas ligninolíticas como lacase, MnP ou LiP, ainda poderia ser mediado por outras enzimas e/ou por intermédio de mecanismo de biosorção físico-química ou biológica (bioacumulação).

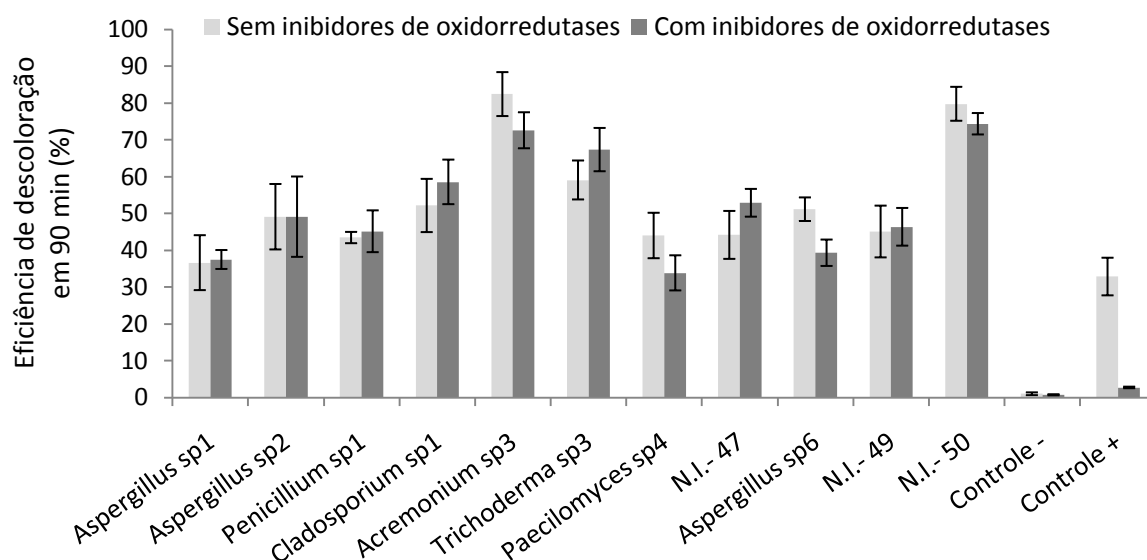


Figura 8 – Eficiência de descoloração em 90 min sobre o corante Azul VSBB (100 mg/L), em tratamentos com micélios na ausência e presença de inibidores enzimáticos (EDTA: 20 mM; Azida de sódio: 20 mM e catalase: 0,2 u/mL). Média e desvio padrão das onze linhagens e dos controles, negativo (-) e positivo (+).

A ausência de atividade metabólica no mecanismo de eliminação de cor foi confirmada pelos resultados usando biomassa autoclavada (Figura 9). Neste ensaio, a capacidade de descoloração do micélio nativo (vivo) foi comparada com a do micélio morto (autoclavado). Para todos os fungos, a eficiência de descoloração foi significativamente maior quando suas biomassas foram previamente submetidas à autoclave ($p < 0,05$). Todos estes resultados, então, evidenciam que o processo de descoloração para todos os fungos são principalmente devido à biosorção físico-química e não procedente de mecanismos dependentes de metabolismo.

A inviabilização da biomassa por pré-tratamentos físicos e químicos pode aumentar ou não a adsorção de poluentes pela biomassa (AKSU, 2005). As biomassas vivas para todos os fungos apresentaram eficiência de descoloração entre 36 e 82 %, enquanto que a eficiência das biomassas autoclavadas variou entre 63 e 92 %. Resultados semelhantes também foram obtidos utilizando biomassas de

Aspergillus niger (FU; VIRARAGHAVAN, 2001) e *Trametes versicolor* (BINUPRIYA *et al.*, 2007).

A expressiva melhora no potencial de descoloração foi ocasionada provavelmente por mudanças na estrutura da biomassa micelial. As células, quando submetidas à morte por autoclavagem, podem sofrer ruptura e desnaturação da parede celular, o que expõe sítios de ligação antes ocultos, ampliando o poder de sorção do corante pelo micélio em virtude do aumento da área de superfície micelial (AKSU, 2005). Esta é a razão principal para o uso de biomassas autoclavadas no presente estudo. No entanto, a utilização de células mortas no tratamento de águas residuais é vantajosa pois possibilita melhor condição de armazenamento e operação, uma vez que não representa mais ameaça de patogenicidade (AKSU, 2005; SATHISHKUMAR *et al.*, 2007).

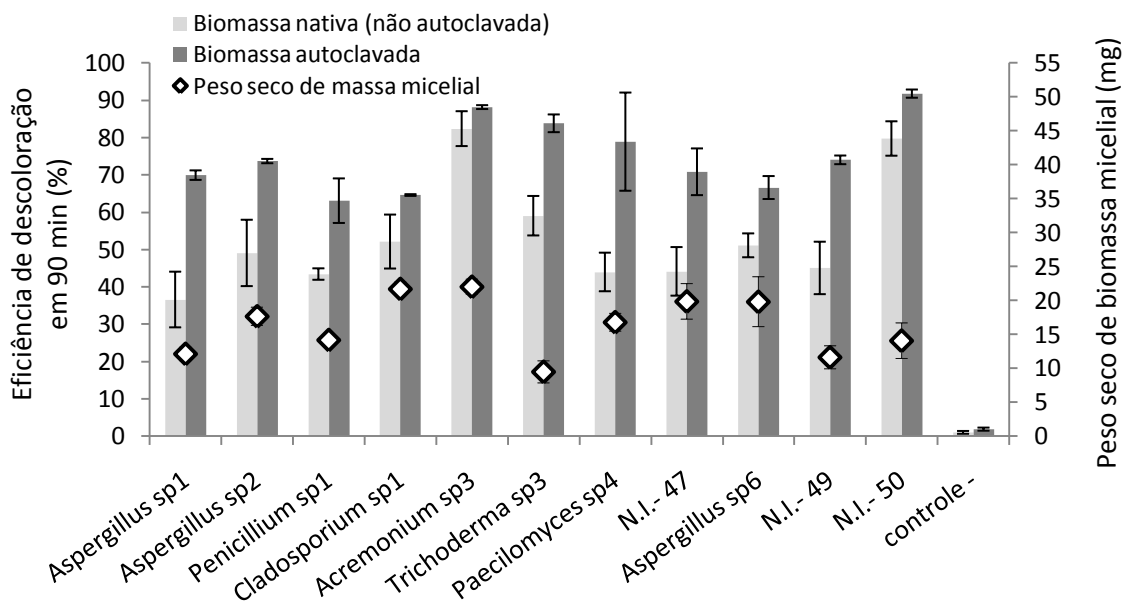


Figura 9 – Média e desvio padrão da eficiência de descoloração em 90 min sobre o corante Azul VSBB (100 mg/L), em tratamentos com a biomassa viável (não autoclavada) e com ela autoclavada e o peso seco da biomassa produzida por cada linhagem em 5 mL de meio de cultura líquido.

Com base na capacidade biosortiva das biomassas autoclavadas, quatro fenótipos, *Trichoderma sp3*, N.I.- 49, N.I.- 50 e *Acremonium sp3*, foram selecionados para os próximos experimentos. Ao levar em consideração a quantidade de massa micelial adicionada nos ensaios, para cada linhagem, foi determinado a capacidade de biosorção do corante (em mg) por grama de biomassa autoclavada seca. Como

observado na Figura 8, *Trichoderma* sp3, N.I.- 50 e N.I.- 49 registraram os maiores índices de adsorção do corante por unidade de massa micelial (10,2; 7,6 e 7,2 mg de corante / g de biomassa seca, respectivamente).

A quarta linhagem escolhida (*Acremonium* sp3; com 4,7 mg/g), obteve, na média, capacidade biosortiva inferior aos alcançados pelos fungos *Aspergillus* sp1 e *Paecilomyces* sp4 (Figura 10). No entanto, foi preferida em virtude de ser o organismo nas condições avaliadas com maior produção de biomassa micelial, tendo produzido 22 mg de biomassa em 6 mL de meio de cultura (Figura 9).

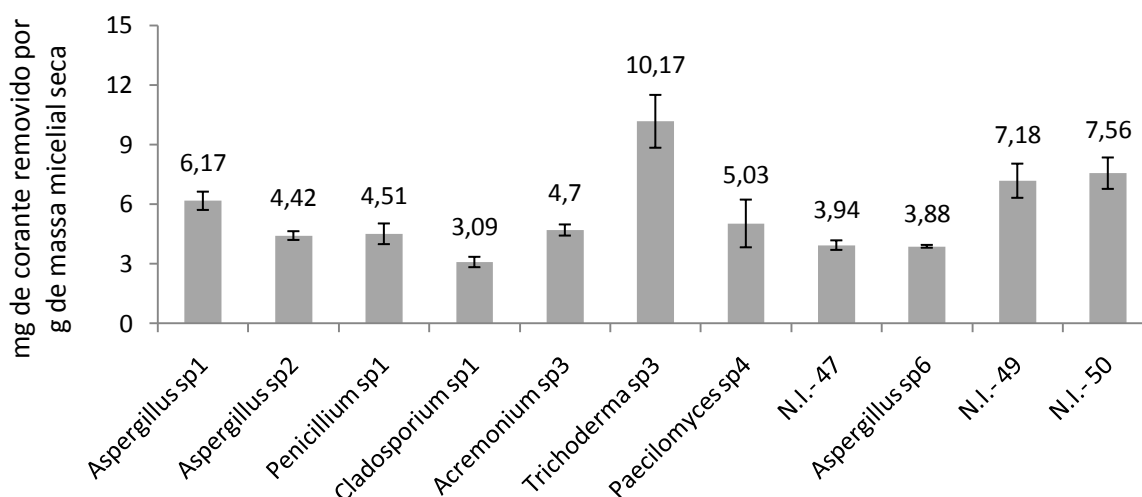


Figura 10 – Média e desvio padrão da capacidade de biosorção da biomassa dos onze fungos sobre o corante Azul VSBB (100 mg/L), em tratamentos com a biomassa autoclavada.

Em solução contendo 100 mg/L do corante modelo (RB 220), a capacidade de biosorção entre os diferentes gêneros fúngicos variou de 3,1 a 10,2 miligramas de corante por grama de micélio autoclavado seco (Figura 10). Segundo Aksu; Tezer (2000), a disponibilidade dos diferentes componentes celulares, como quitina, polissacarídeos ácidos, aminoácidos e lipídios, pode influenciar a capacidade de interação das diferentes linhagens com o corante modelo utilizado. Estudos mostram uma marcada diferença na estrutura e composição da parede celular de fungos de diferentes grupos (DEACON, 2006). Além disto, a estrutura e a composição da parede celular dentro de cada espécie fúngica podem diferir em resposta à composição do meio e de outras propriedades físico-químicas do ambiente de cultivo (PARK *et al.*, 2007; PRIGIONE *et al.*, 2008).

5.4 EFEITO DO TAMANHO DA PARTÍCULA NA CAPACIDADE BIOSORTIVA

O presente estudo examinou a influência do tamanho das partículas biosorventes (>500; 355 - 500; 250 - 355 e < 250 μm) na atividade descorante de RB 220 (Figura 11). A proporção de corante adsorvida pelo fungo aumentou com a diminuição de tamanho das partículas sorventes. Os resultados sugerem uma relação linear entre a eficiência de remoção e o diâmetro da partícula. Chu; Chen (2002), Gong *et al.* (2005) e Santhi; Manonmani (2009) mostraram uma tendência similar de resultados e observações, em que o aumento da capacidade de biosorção mostrou ser dependente da área de superfície externa do biosorvente.

Outros tratamentos físicos além da autoclavagem, como por exemplo, a secagem e ruptura mecânica, têm se mostrado também eficazes em aumentar a capacidade de biosorção de diversos corantes (AKSU, 2005). Para os próximos experimentos, as biomassas de todas as espécies examinadas, após cultivadas, foram autoclavadas, depois secas, maceradas e, por último, peneiradas para obtenção das partículas de biomassa menores que 250 μm .

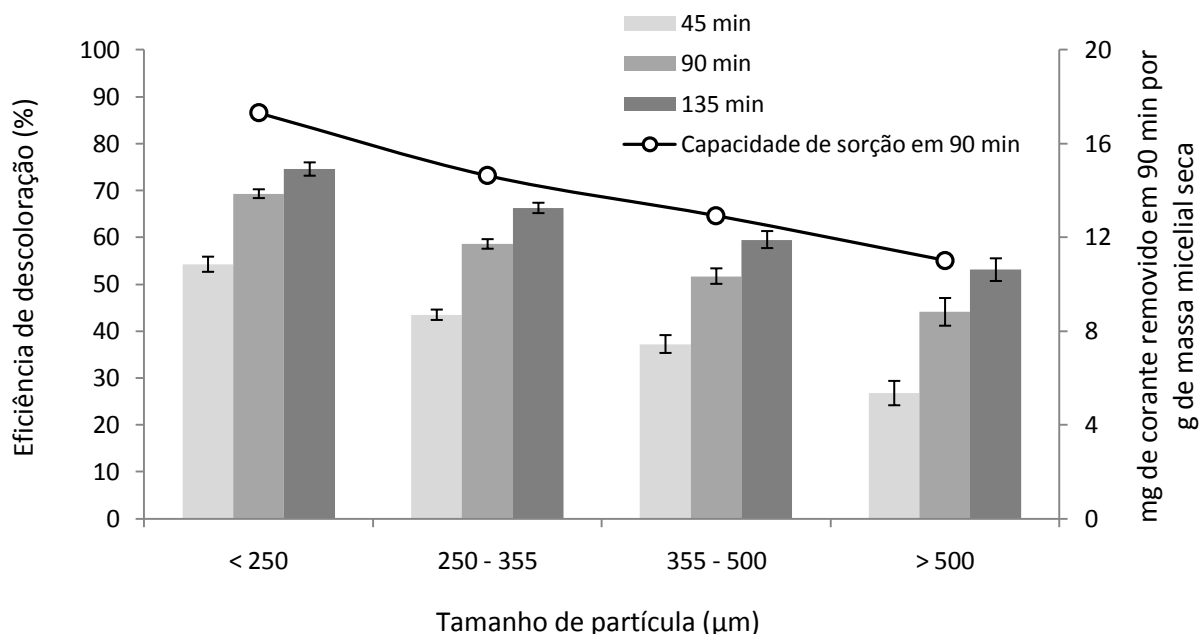


Figura 11 – Efeito do tamanho da partícula biosorvente na atividade descorante de RB 220 utilizando biomassa do fungo N.I.- 49 autoclavada e seca (concentração do corante: 100 mg/L; dose de biosorvente: 4 g/L; tempo de contato: 45, 90 e 135 min; pH= 5,6 e sem agitação).

5.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DO BIOSORVENTE

5.5.1 Influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio

Visto que a capacidade biosortiva de fungos filamentosos (ex. *Rhizopus arrhizus* e *Aspergillus oryzae*) é influenciada pela composição do meio de cultura utilizado para produção de suas biomassas (GABRIEL *et al.*, 2001), o efeito de diferentes fontes e concentrações de carbono e nitrogênio foi investigado quanto à produção de biomassa e capacidade biosortiva dos micélios pré-tratados. Como mostra a Tabela 6, os micélios obtidos de culturas com diferentes composições de carbono diferiram significativamente na sua capacidade de biosorver as moléculas do corante RB 220 (100 mg/L).

Tabela 6 – Efeito de diferentes composições de carbono do meio de cultura na produção de biomassa, capacidade biosortiva e no índice de biomassa ativa (mg total de corante adsorvido utilizando toda biomassa produzida). O nitrato de sódio (5 g/L) foi a fonte de nitrogênio utilizada. Os valores demarcados com asterisco representam os melhores resultados alcançados por espécie.

Fontes de Carbono	g/L	<i>Acremonium sp3</i>			<i>Trichoderma sp3</i>			N.I.- 49			N.I.- 50		
		Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Índice de biomassa ativa (mg)	Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Índice de biomassa ativa (mg)	Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Índice de biomassa ativa (mg)	Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Índice de biomassa ativa (mg)
Frutose	1	2,3	-	-	3,5	-	-	9,6	8,6	0,08	4,2	15,5	0,07
	5	17,8	12,7	0,23	10,6	15,0 *	0,16	24,4	11,5	0,28	9,7	20,5 *	0,20
	10	35,3	10,4	0,37	18,8	14,9 *	0,28 *	33,9	12,3	0,42	21,2	18,2	0,39
Sacarose	1	6,4	11,2	0,07	1,9	-	-	7,7	9,3	0,07	4,4	16,2	0,07
	5	21,5	11,7	0,25	2,8	-	-	22,3	10,2	0,23	12,5	17,7	0,22
	10	35,7	10,6	0,38	3,1	-	-	31,1	12,3	0,38	23,8	19,7 *	0,47 *
Dextrose	1	6,4	11,3	0,07	2,3	-	-	6,5	11,0	0,07	3,6	-	-
	5	19,9	12,4	0,25	8,3	11,6	0,10	20,5	12,4	0,25	12,4	18,5	0,23
	10	35,2	11,7	0,41	14,7	11,6	0,17	29,4	15,8 *	0,47 *	22,3	20,3 *	0,45 *
Maltose	1	6,8	11,9	0,08	3,1	-	-	6,5	11,0	0,07	4,3	13,8	0,06
	5	12,5	19,6	0,24	5,3	13,8 *	0,07	18,7	11,4	0,21	10,5	18,2	0,19
	10	27,7	22,5 *	0,62 *	8,1	14,4 *	0,12	33,0	14,2 *	0,47 *	19,2	18,6	0,36
Amido	1	6,8	12,0	0,08	3,3	-	-	6,0	12,1	0,07	4,8	14,1	0,07
	5	19,8	13,2	0,26	7,1	13,9 *	0,10	23,4	13,0	0,30	10,5	20,0 *	0,21
	10	33,0	13,2	0,44	8,2	14,9 *	0,12	36,1	14,3 *	0,51 *	21,4	21,4 *	0,46 *
Glicerol	1	6,7	10,1	0,07	1,5	-	-	5,7	8,9	0,05	3,7	-	-
	5	18,5	16,4	0,30	1,9	-	-	7,1	10,2	0,07	3,1	-	-
	10	35,3	12,4	0,44	1,6	-	-	11,5	11,3	0,13	3,4	-	-

A cultura do fungo *Acremonium* sp3 em meio contendo maltose (10 g/L) como única fonte de carbono proporcionou o melhor resultado de biosorção do corante modelo (22,5 mg de corante RB 220 por grama de biomassa seca autoclavada) ao comparar todas as quatro linhagens avaliadas. Esse resultado melhorou em aproximadamente 91 % a capacidade biosortiva comparada com a biomassa obtida em meio contendo a mesma concentração de dextrose como única fonte de carbono.

Assim como reportado por Gabriel *et al.* (2001), os resultados do presente estudo mostraram que nem sempre uma fonte de carbono mais favorável ao desenvolvimento de grupos químicos adsorptivos determinou a melhor condição de crescimento do fungo (produção de biomassa). Dessa forma, para critério de seleção do meio que melhor beneficiou a capacidade biosortiva e, também, a produtividade de biomassa, foi desenvolvido um parâmetro (índice de biomassa ativa) que ponderasse as duas respostas de interesse em um único resultado. Esse índice consistiu na multiplicação da resposta massa micelial produzida no tratamento (peso seco em g) com os resultados da capacidade biosortiva (mg/g), gerando como índice a quantidade (em mg) de corante RB 220 adsorvido em 90 min ao utilizar toda biomassa obtida no tratamento (condição específica).

Para *Trichoderma* sp3 a capacidade de biosorção foi maior quando frutose, maltose ou amido (5 e 10 g/L) foram utilizados como fonte de carbono (entre 13,8 e 15,0 mg/g). No entanto, devido ao baixo crescimento micelial obtido em meios com maltose e amido como fontes únicas de carbono, apenas frutose (10 g/L) foi selecionado para os próximos ensaios, que obteve 0,281 mg de índice de biomassa ativa. Esse resultado supera por cerca de 140 % e 132 % os índices dos meios com mesma concentração de maltose e amido, respectivamente. As duas últimas espécies examinadas (N.I.- 49 e N.I.- 50) obtiveram ótimos valores de descoloração e crescimento quando cultivadas em pelo menos três diferentes fontes de carbono. Dessa forma, foram escolhidos os três melhores índices de biomassa ativa, para cada linhagem, e testadas cada uma frente às diferentes fontes de nitrogênio avaliadas.

Os resultados da influência das fontes de nitrogênio na capacidade adsorptiva e biomassa também confirmaram o pressuposto de que o meio de cultura pode influenciar fortemente as propriedades do biosorvente (Anexo III). As culturas contendo peptona, para *Acremonium* sp3 e N.I.- 49, e tartarato de amônia, para

Trichoderma sp3 e N.I.- 50, como únicas fontes de nitrogênio, apresentaram os valores mais elevados de índice de biomassa ativa (Tabela 7). Ou seja, estas fontes de nitrogênio proporcionaram ótimos resultados, tanto de produção de biomassa como de capacidade biosortiva.

A composição do meio de cultura que apresentou os maiores valores de índice de biomassa ativa foi, em (g/L), 10 g de maltose e 5 g de peptona para *Acremonium* sp3; 10 g de frutose e 5 g de tartarato de amônia para *Trichoderma* sp3; 10 g de amido e peptona para N.I.- 49 e 10 g de dextrose e tartarato de amônia para N.I.- 50. Em uma análise comparativa com os resultados anteriores à otimização (ensaios utilizando 5 g/L de nitrato de sódio), o efeito da composição de nitrogênio proporcionou na linhagem N.I.- 50 um aumento de cerca de 57 % no índice de biomassa ativa. Os demais fungos obtiveram aumento de 35 % (*Acremonium* sp3), 32 % (*Trichoderma* sp3) e 36 % (N.I.- 49). Os dois fungos que registraram os maiores índices de biomassa ativa, *Acremonium* sp3 (0,81 mg) e N.I.- 50 (0,79 mg) foram preferidos para o próximo ensaio de otimização.

Tabela 7 – O efeito de várias composições do meio de cultura no índice de biomassa ativa (mg total de corante adsorvido utilizando toda biomassa produzida). Os valores demarcados com asterisco representam o resultado máximo atingido por cada espécie.

Fonte de nitrogênio	g/L	<i>Acremonium</i> sp3	<i>Trichoderma</i> sp3	N.I.- 49			N.I.- 50		
		Maltose	Frutose	Dextrose	Maltose	Amido	Dextrose	Sacarose	Amido
Peptona	1	0,38	0,18	0,33	0,30	0,34	0,36	0,33	0,34
	5	0,81 *	0,34	0,53	0,44	0,54	0,47	0,47	0,58
	10	0,83	0,30	0,58	0,51	0,64 *	0,68	0,60	0,67
Tartarato de Amônia	1	0,44	0,25	0,25	0,19	0,14	0,39	0,32	0,28
	5	0,64	0,37 *	0,37	0,32	0,32	0,51	0,41	0,45
	10	0,29	0,22	0,50	0,46	0,46	0,69 *	0,53	0,48
Cloreto de Amônia	1	0,29	0,23	0,09	0,08	0,09	0,48	0,23	0,19
	5	0,21	0,16	0,14	0,11	0,09	0,46	0,31	0,15
	10	0,16	0,17	0,24	0,23	0,13	0,39	0,29	0,11
Nitrato de Sódio	1	0,53	0,25	0,28	0,26	0,41	0,37	0,38	0,40
	5	0,60	0,28	0,43	0,43	0,47	0,44	0,48	0,46
	10	0,55	0,28	0,40	0,40	0,40	0,35	0,47	0,45
Uréia	1	0,58	-	0,17	0,30	0,48	0,45	0,35	0,36
	5	0,43	-	0,30	0,35	0,46	-	0,34	0,40
	10	0,39	-	0,22	0,22	0,35	-	0,25	0,31
Oxalato de Amônia	1	-	-	-	-	-	0,37	0,31	0,26
	5	0,33	0,19	-	-	-	-	0,28	0,43
	10	0,42	-	-	-	-	-	0,18	0,31

5.5.2 Influência do pH, salinidade, agitação e idade da cultura

A fim de verificar o efeito combinado de quatro variáveis (fatores) do meio de cultura (pH, salinidade, idade e velocidade de agitação) na produção de biomassa ativa, os experimentos foram realizados com delineamento estatístico. Para isso, foi utilizada metodologia de superfície de resposta (MSR) de acordo com um desenho experimental de Box-Behnken. A MSR é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, que devem descrever o comportamento de um conjunto de dados (BEZERRA *et al.*, 2008).

Modelos lineares, interativos, quadráticos e cúbicos foram ajustados aos dados experimentais para obtenção de equações de regressão. Todavia, análises do comportamento estatístico de cada modelo indicaram que a regressão do modelo quadrático foi o mais adequado no ajuste da função resposta (índice de biomassa ativa) com os dados experimentais (Anexos V e VI). O resultado do efeito dos níveis de cada fator sobre o índice de biomassa ativa (valores observados e preditos pelo modelo) para cada fungo está listado no Anexo IV. Os valores preditos foram determinados usando as funções de aproximação geradas pelas equações a seguir, sendo uma para o fungo *Acremonium* sp3 (C) e outra para o fungo N.I.- 50 (D):

$$Y = 0,794 + 0,095 X_1 + 0,004 X_2 + 0,018 X_3 - 0,066 X_4 - 0,084 X_1^2 - 0,098 X_2^2 + 0,002 X_3^2 + 0,026 X_4^2 + 0,035 X_1 \cdot X_2 - 0,016 X_3 \cdot X_4 \quad (C)$$

$$Y = 0,490 + 0,023 X_1 + 0,024 X_2 + 0,029 X_3 - 0,012 X_4 + 0,015 X_1^2 - 0,122 X_2^2 - 0,106 X_3^2 - 0,007 X_4^2 + 0,008 X_1 \cdot X_2 + 0,006 X_3 \cdot X_4 \quad (D)$$

onde Y é o índice de biomassa ativa (resposta) em mg e, X₁, X₂, X₃ e X₄ são as quatro variáveis independentes codificadas, salinidade, pH, idade de cultura e velocidade de agitação, respectivamente.

A significância estatística dos dois modelos quadráticos e de cada coeficiente presente nas equações foi avaliada por meio de análise de variância (ANOVA). Como apresentado na Tabela 8, os resultados da ANOVA mostraram que o modelo

de regressão adotado para cada fungo foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Este resultado (p -valor), associado aos altos valores de F obtidos ($F = 12,0$ para *Acremonium* sp3; $F = 12,13$ para N.I.- 50), sugere que a maior parte da variação na resposta, para ambos os fungos, pode ser explicada pelas equações de regressão. Assim sendo, os termos do modelo possuem efeito significativo sobre o índice de biomassa ativa.

Tabela 8 – ANOVA da equação polinomial de segunda ordem para cada um dos fungos.

Fonte	Fungo <i>Acremonium</i> sp3			Fungo N.I.- 50		
	Coefficiente de regressão	Valor de F	Probabilidade > F (p-valor)	Coefficiente de regressão	Valor de F	Probabilidade > F (p-valor)
Modelo		12,00	< 0.0001 ^a		12,13	< 0.0001 ^a
Constante	0,794			0,490		
X ₁	0,095	68,05	< 0.0001 ^a	0,023	5,57	0.0333 ^a
X ₂	0,004	0,11	0.7474	0,024	5,81	0.0302 ^a
X ₃	0,018	2,30	0.1516	0,029	8,76	0.0103 ^a
X ₄	-0,066	32,57	< 0.0001 ^a	-0,012	1,41	0.2546
X ₁ x X ₁	-0,084	28,33	0.0001 ^a	0,015	1,18	0.2960
X ₂ x X ₂	-0,098	38,99	< 0.0001 ^a	-0,122	83,34	< 0.0001 ^a
X ₃ x X ₃	0,002	0,02	0.8938	-0,106	62,72	< 0.0001 ^a
X ₄ x X ₄	-0,026	2,69	0.1230	-0,007	0,30	0.5939
X ₁ x X ₂	0,035	3,03	0.1037	0,008	0,20	0.6630
X ₃ x X ₄	-0,016	0,62	0.4433	0,006	0,13	0.7188
Residual			0.1230			0.5939
"Lack of fit"		5,64	0.0549		5,22	0.0627

^a Significativos ao nível de 5% ($p < 0.05$)

A maior parte dos coeficientes de regressão para os efeitos lineares foram significantes ($p < 0.05$), exceto o pH ($p = 0.7474$) e idade da cultura ($p = 0.1516$) para *Acremonium* sp3 e velocidade de agitação ($p = 0.2546$) para o modelo do fungo N.I.- 50. O efeito quadrático de salinidade e pH para o fungo *Acremonium* sp3 e pH e idade da cultura para N.I.- 50 foram considerados fatores altamente significativos ($p \leq 0.0001$) na variação da resposta (Tabela 8).

A verificação da adequação dos modelos é uma parte importante do processo de análise dos dados, uma vez que o ajuste da equação aos dados experimentais pode determinar resultados pobres ou enganosos (SHARMA *et al.*, 2009). As análises mostraram que os modelos escolhidos para explicar a relação entre os fatores e o índice de biomassa ativa para cada fungo foram satisfatórios e

adequados. No caso do fungo *Acremonium* sp3, o valor do coeficiente de determinação ($R^2= 0,9231$) indicou que apenas 7,69 % da variação encontrada na resposta não pôde ser explicada pelo modelo. Para o fungo N.I.- 50, as quatro variáveis e suas interações não elucidou 7,62 % da variação ($R^2= 0,9238$). Os resultados de R^2 e do R^2 ajustado, para ambos os fungos, indicaram a existência de correlação entre os valores observados experimentalmente e os preditos pelos modelos (Anexo IV e V).

Gráficos de superfície de resposta foram desenvolvidos, a partir dos modelos gerados, para melhor entendimento do efeito dos fatores estudados sobre a resposta e, assim, determinar visualmente a condição de cultura que proporcionou o melhor resultado. Os gráficos para ambos os fungos estão apresentados nas Figuras 12 e 13. A Figura 12 A mostra o efeito simultâneo das duas variáveis que influenciaram significativamente os valores do índice de biomassa ativa para o fungo *Acremonium* sp3 (velocidade de agitação e salinidade). Como também pode ser visualizado na Figura 12 (B, C e D), o melhor resultado para *Acremonium* sp3, aproximadamente 0,90 mg de corante adsorvido em 90 min utilizando toda biomassa produzida, foi obtido a partir de micélio resultante de 20 dias de cultura sob condição estática com salinidade de 20 g/L e pH de 5,8. Para o fungo N.I.- 50, a condição de cultura que produziu o melhor índice de biomassa ativa (0,55 mg) foi alcançada em 16 dias de cultura sem agitação, 24 g/L de salinidade e pH 5,7 (Figura 13).

Dentre as condições de cultivo analisadas para melhorar a produção do índice de biomassa ativa, os dois fungos otimizados apresentaram níveis de cada variável bem semelhantes (Tabela 9). Como mostrado nos gráficos de superfície de resposta, ambos os fungos apresentaram os melhores resultados de produção de biosorvente com alta capacidade biosortiva em meios com elevada concentração salina, valores de pH intermediários (entre 5,5 e 6,0) e, em culturas sem agitação com mais de 15 dias de incubação.

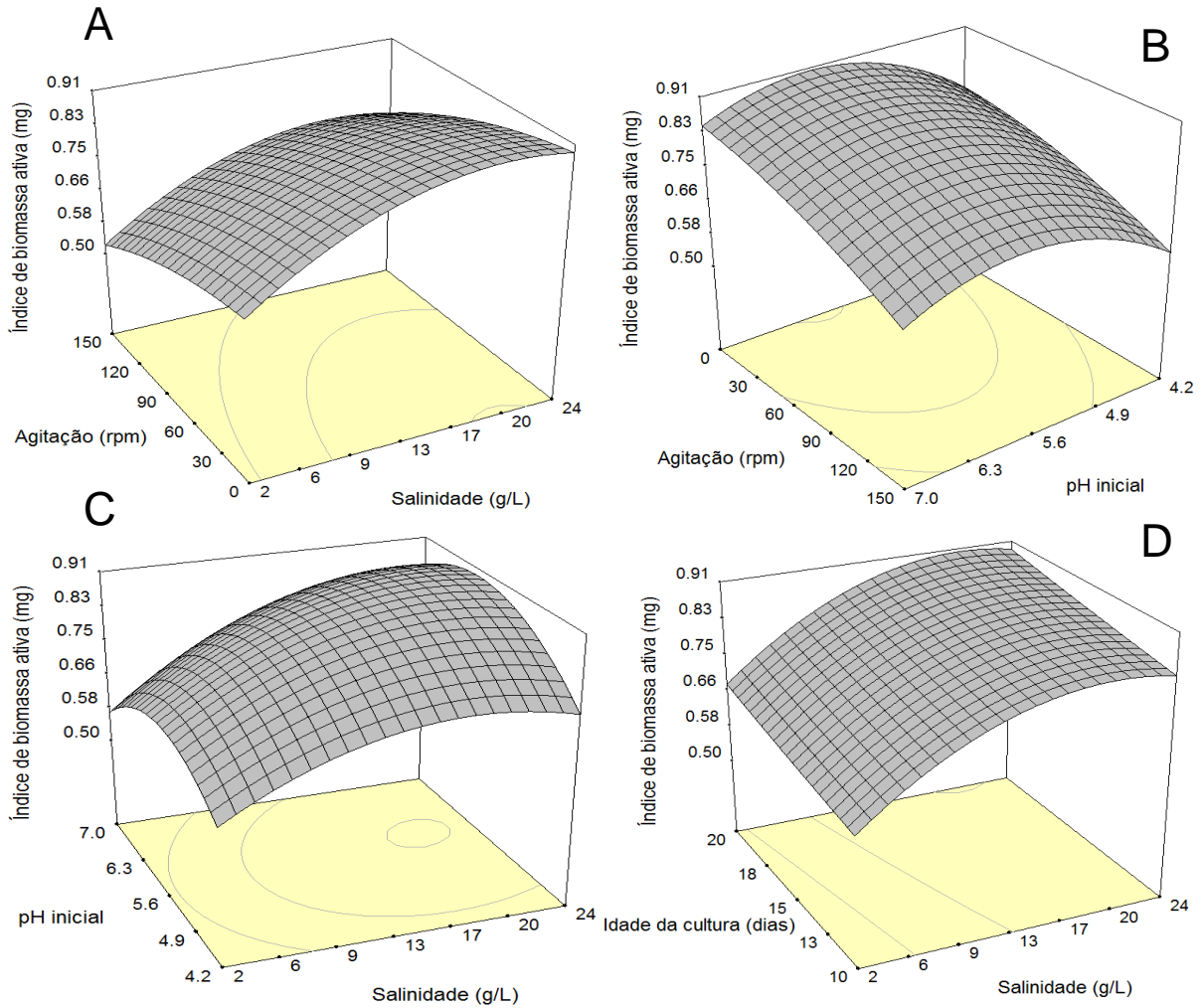


Figura 12 – Gráfico de superfície de resposta do fungo *Acremonium* sp3 para o efeito (A) da agitação e salinidade; (B) pH inicial e agitação; (C) pH inicial e salinidade e (D) idade da cultura e salinidade do meio no índice de biomassa ativa (mg de corante adsorvido em 90 min por toda biomassa produzida);

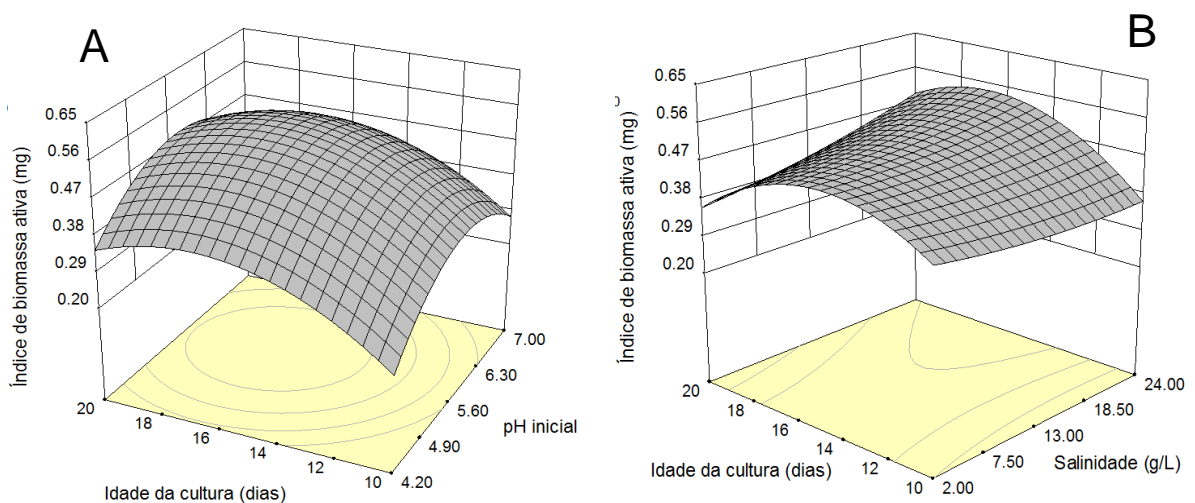


Figura 13 – Gráfico de superfície de resposta do fungo N.I.- 50 para o efeito (A) do pH inicial e idade da cultura e (B) da idade da cultura e salinidade do meio no índice de biomassa ativa.

Tabela 9 – Parâmetros examinados na otimização e seus resultados ótimos para cada fungo em relação à produção de índice de biomassa ativa.

Fator	<i>Acremonium sp3</i>	N.I.- 50
Fonte de carbono	10 g/L maltose	10 g/L dextrose
Fonte de nitrogênio	5 g/L peptona	10 g/L tartarato de amônia
pH	5,8	5,7
Salinidade	20 g/L	24 g/L
Agitação	sem agitação	sem agitação
Idade de cultura	20 dias	16 dias

5.6 EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA CAPACIDADE BIOSORTIVA

Pesquisas têm mostrado que certos tratamentos químicos pós-cultura podem aumentar ainda mais a capacidade de biosorção da biomassa (FU; VIRARAGHAVAN, 2000, 2002). Dessa forma, após a obtenção das condições de crescimento e nutrição que melhor influenciaram a biosorção, devido a mudanças no tamanho das células e composição da parede celular (GADD, 2008), foi analisado o efeito de nove tratamentos químicos na capacidade biosortiva dos micélios otimizados anteriormente.

A figura 14 mostra os resultados dos tratamentos dos fungos *Acremonium sp3* e N.I.- 50 na descoloração de três corantes reativos, RB 220, RR 195 e RY 84. As biomassas não tratadas quimicamente (apenas autoclavagem) apresentaram altas e similares capacidades de biosorção para os três corantes avaliados, estando entre 19,8 e 21,3 mg/g. Comparado com as biomassas não tratadas quimicamente (sem reagentes), poucos tratamentos utilizados melhoraram significativamente a capacidade biosortiva após 90 min de contato com as soluções de corante.

Para *Acremonium sp3*, os tratamentos ácidos (HCl e H₂SO₄) e com cloreto de cálcio produziram os maiores valores de biosorção (Figura 14 A). O efeito de HCl proporcionou as melhores capacidades biosortivas tanto do corante RB 220 (23,6 mg/g) como de RR 195 (22,9 mg/g) e RY 84 (22,6 mg/g). Estes valores registrados aumentaram a capacidade biosortiva em 11,3 % para o corante RB 220, 15,4 % para RR 195 e 7,7 % para RY 84, em relação aos respectivos tratamentos controles (sem reagente químico). Em N.I.- 50, como pode ser visto na Figura 14 B, apenas o tratamento com ácido clorídrico resultou para mais de um corante valores

significativamente maiores que o tratamento controle, sendo de 22,3 mg/g para RR 195 (4,8 % de melhoria) e de 22,6 mg/g para RY 84 (7,4 % de melhoria). Assim, as biomassas dos dois fungos tratados com HCl foram preferidas para os estudo de otimização do processo de biosorção.

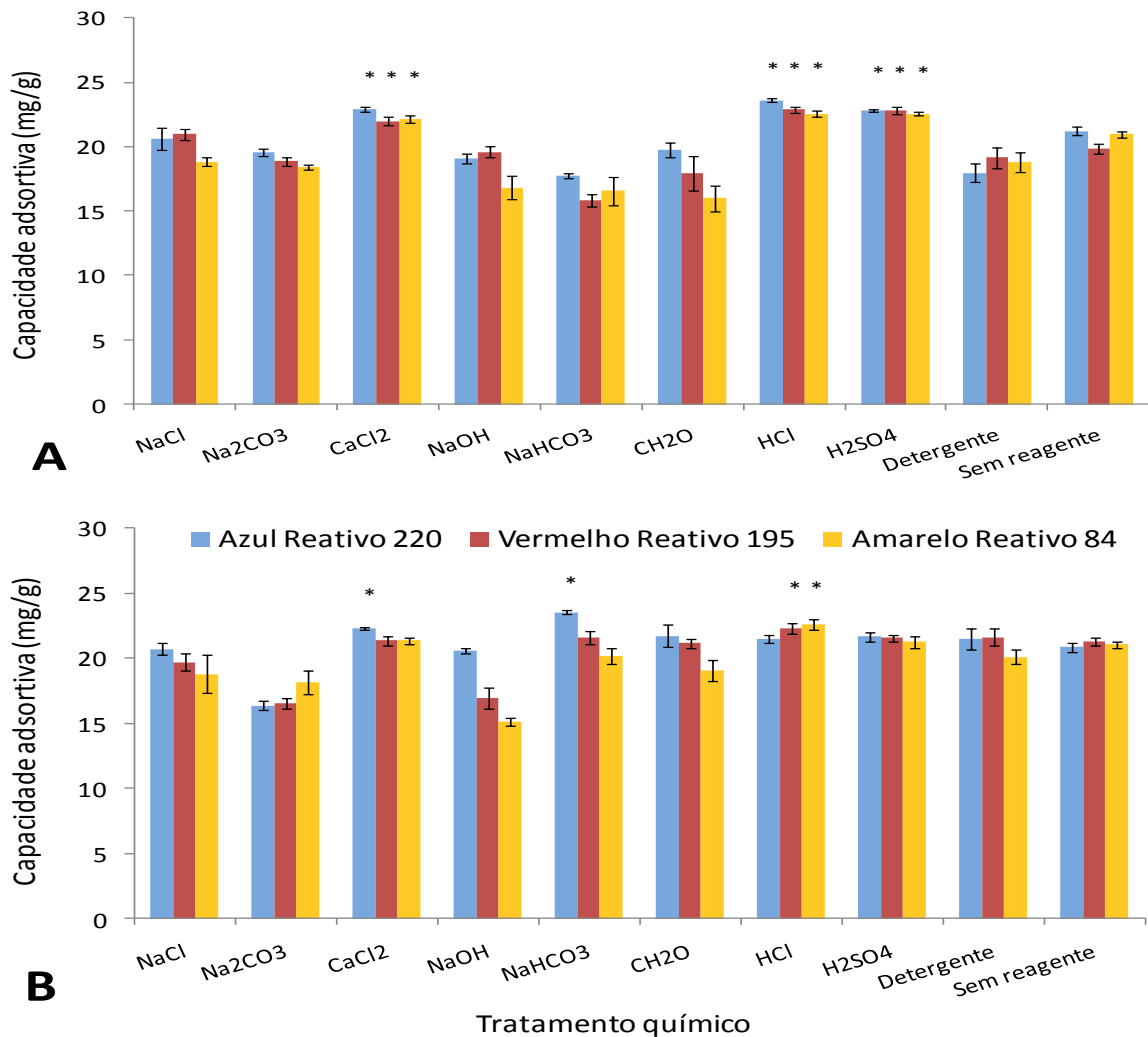


Figura 14 – O efeito dos tratamentos químicos na capacidade de biosorção de três corantes reativos por (A) *Acremonium* sp3 e (B) pelo fungo N.I.- 50. Experimentos conduzidos sem agitação, com dose de biosorvente fixa (4 g/L, com partículas < 250 µm), em pH 4 e com concentração inicial de corante de 100 mg/L à 28 °C (90 min de contato).

Neste estudo, os reagentes químicos utilizados como tratamento foram divididos em quatro categorias: álcalis (NaOH; NaHCO₃), ácidos (HCl e H₂SO₄), sais (NaCl; Na₂CO₃; CaCl₂) e outros (formaldeído: CH₂O e detergente neutro). No geral, o efeito do tratamento químico nas biomassas de *Acremonium* sp3 e N.I.- 50 foram semelhantes aos obtidos por Fu; Viraraghavan (2001) com *Aspergillus niger* na

remoção do corante ácido azul (AB 29). Para os dois fungos aqui analisados, as biomassas tratadas com NaCl, Na₂CO₃ e NaOH tiveram sua capacidade biosortiva diminuída e, somente os tratamentos ácidos e com CaCl₂ causaram modificações estruturais que favoreceram a biosorção dos três corantes pelas biomassas (Figura 14).

A biomassa do fungo N.I.- 50 tratada com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) proporcionou o melhor resultado de biosorção do corante RB 220 (23,6 mg/g) e, comparado com a capacidade biosortiva da biomassa controle (20,9 mg/g), melhorou cerca de 13 % o processo. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Fu; Viraraghavan (2002) com biomassa de *A. niger*. Nesse estudo, dentre os sete tratamentos avaliados (os mesmos aplicados no presente estudo), o tratamento contendo NaHCO₃ foi o mais eficaz na remoção do corante aniônico Vermelho Congo.

As biomassas fúngicas são majoritariamente aniônicas, devido à presença de grupos ionizados, tais como hidroxila, acetato e fosfato nos vários polímeros da parede celular. Por isso, os íons bicarbonato (HCO₃⁻), por fornecer ou aceitar prótons da água, podem neutralizar e carregar positivamente parte da superfície celular, permitindo, assim, maior poder de atração da biomassa com os corantes aniônicos (FU; VIRARAGHAVAN, 2002). No entanto, tal resposta foi conseguida apenas com o corante RB 220 para o fungo N.I.- 50, corroborando com a suposição de que a eficiência dos tratamentos químicos está relacionada com a estrutura molecular específica de cada corante e do fungo estudado (FU; VIRARAGHAVAN, 2002).

Os tratamentos com ácidos e com CaCl₂, da mesma forma que o íon bicarbonato, modificam a densidade das cargas negativas da superfície celular fúngica, promovendo uma maior afinidade da biomassa com o corante específico (GALLAGHER *et al.*, 1997). Ao contrário, a diminuição da capacidade biosortiva das biomassas do presente estudo tratadas com NaOH, assim como reportada por Gallagher *et al.* (1997), pode ter sido ocasionada pela formação de novos sítios aniônicos que, por sua vez, aumentam a repulsão entre a biomassa e o corante aniônico. No entanto, Zeroual *et al.* (2006) relataram um aumento na capacidade de biosorção de *Rhizopus stolonifer* para o corante Azul de Bromofenol após o tratamento alcalino com NaOH. Isto foi atribuído à remoção de proteínas e glucanas da parede celular, aumentando o percentual de quitina e quitosana.

5.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA NO PROCESSO DE BIOSORÇÃO

A dinâmica do processo de biosorção é diretamente condicionada pelas propriedades físicas e químicas do biosorvente e, também, pelas condições do sistema (BINUPRIYA *et al.*, 2007). O efeito da concentração de biosorvente no processo foi analisado em soluções contendo o corante RB 220 em concentração semelhante à encontrada nos efluentes oriundos do banho de tingimento (200 mg/L). A eficiência de descoloração e a capacidade biosortiva por *Acremonium* sp3 em função da dose de biosorvente está apresentado na Figura 15. A eficiência de descoloração de RB 220 aumentou à medida que a concentração de biomassa na solução cresceu.

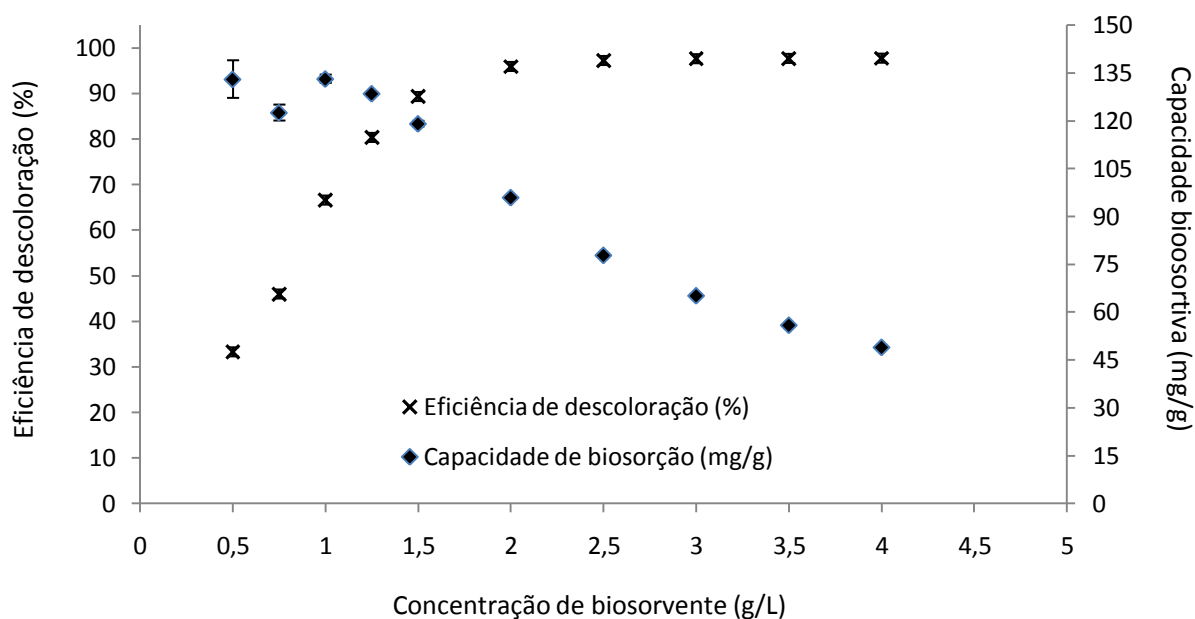


Figura 15 – Efeito da dose de biosorvente na capacidade biosortiva e eficiência de descoloração de RB 220 (200 mg/L) por biomassas de *Acremonium* sp3 tratadas com HCl (0,1M – 24h). Experimentos conduzidos com tempo de contato de 90 minutos e valores constantes de pH (4) e agitação (150 rpm) à 28 °C.

O processo de descoloração, nas condições avaliadas, foi estabilizado a partir de 2 g/L de biosorvente em solução. Com o aumento da dosagem de biosorvente até 2 g/L, o percentual de descoloração de RB 220 foi de 33,3 %, ao utilizar o mínimo de biosorvente (0,5 g/L) para 95,9 %. A partir de 2 g/L, o percentual de

descoloração manteve-se constante, não diferindo drasticamente nem mesmo com o dobro de biomassa micelial em solução com a mesma quantia de corante (4 g/L de biosorvente obteve 97,7 % de descoloração) (Figura 15). Um padrão de descoloração muito similar foi reportado com biomassas de *Aspergillus parasiticus*, que registraram aumento na descoloração de RR 198 (100 mg/L) de 29,4 %, ao empregar 0,4 g/L de biosorvente, para 98,6 % com 2,0 g/L de biomassa (AKAR *et al.*, 2009). A drástica redução da taxa global de descoloração (percentual de aumento em relação ao nível anterior) observada a partir de 2 g/L de biosorvente pode ser explicada pelo equilíbrio obtido entre a massa de biosorbato (corante) e massa de biosorvente (biomassa) na condição operacional avaliada (KUMAR *et al.*, 2008).

Com relação à capacidade biosortiva (mg/g), os valores mostraram uma tendência inversa a encontrada com os resultados de eficiência de descoloração. No geral, a quantidade de corante removido por unidade de peso de biomassa diminuiu com o aumento da dose de biosorvente (Figura 15). A variação da dose de biosorvente de 0,5 g/L para 1,5 g/L apresentou pouca variação na capacidade de biosorção do corante RB 220 (entre 119,1 e 133,0 mg/g). No entanto, a drástica diminuição da capacidade de biosorção a partir de 1,5 g/L de biosorvente pode ser atribuída ao fato da solução passar a ter uma alta disponibilidade de superfície de contato para a mesma quantidade total de corante para ser adsorvido, visto que mais de 90 % de descoloração foi alcançada com apenas 1,5 g/L de biomassa de *Acremonium* sp3 (Figura 15).

A capacidade de biosorção de *Acremonium* sp3 decresceu de 133 mg/g, com 0,5 g/L de biosorvente, para 48,9 mg/g ao utilizar 4 g/L. A solução de corante (200 mg/L) contendo 2 g/L de biosorvente registrou uma excelente capacidade biosortiva de RB 220 por grama de biomassa tratada seca (95,9 mg/g) (Figura 15). Dessa forma, esta massa de biosorvente foi selecionada para os estudos posteriores.

Um outro fator que reconhecidamente possui forte influência na capacidade de remoção do corante pela biomassa é o tempo de contato do biosorvente com a solução (SATHISHKUMAR *et al.*, 2007). No presente estudo os resultados mostraram uma alta capacidade de biosorção já nos primeiros cinco minutos de contato (51,4 mg/g), com aumento gradual até o estabelecimento do tempo de equilíbrio, no qual após 90 minutos de contato removeu 96,5 mg de RB 220 por

grama de massa micelial seca (Figura 16).

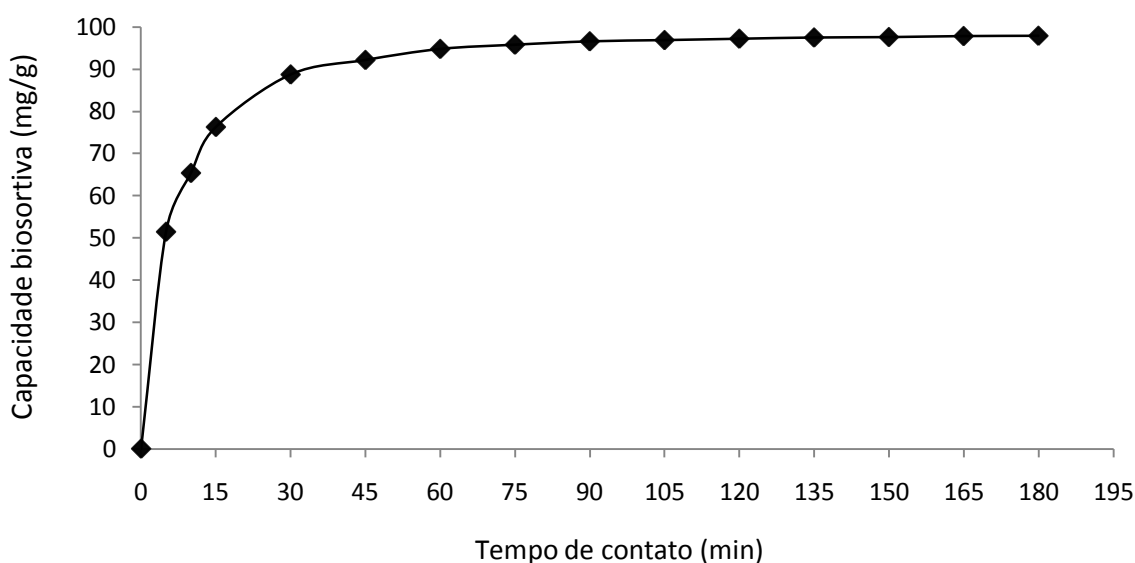


Figura 16 – Efeito do tempo de contato na capacidade biosortiva de RR 220 (200 mg/L) por biomassas de *Acremonium* sp3 tratadas com HCl (0,1M – 24h). Experimentos conduzidos com concentração de biosorvente no equilíbrio (2 g/L) e valores constantes de pH (4) e velocidade de agitação (175 rpm) à 28 °C.

As biomassas inativadas do fungo basidiomiceto *Panus fulvus* registraram, nos primeiros 10, 20 e 30 minutos de contato com o corante Azul Reativo 2 (50 mg/L), uma velocidade média de biosorção de 1,77; 0,32 e 0,22 mg de corante por grama de biosorvente por minuto (SATHISHKUMAR *et al.*, 2007). A mesma tendência de declínio gradual na velocidade de descoloração com o aumento do tempo de contato foi constatada no presente estudo. Na concentração de corante de 200 mg/L, a máxima quantia de RB 220 removida pelas biomassas de *Acremonium* sp3 para os primeiros 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min foram a uma velocidade média de biosorção de 10,28; 6,53; 5,08; 2,96; 2,05; 1,58; 1,28 e 1,07 mg/g/min. Após 90 minutos de contato, as velocidades de biosorção registradas ficaram entre 0,93 (105 min) e 0,54 (180 min) mg/g/min. Asfour *et al.* (1995) explica que a rápida remoção de corante nos minutos iniciais pode ser devido às fortes forças atrativas entre as moléculas do corante e o biosorvente e, também, pela maior disponibilidade de sítios vagos na superfície da biomassa nos estágios iniciais da biosorção.

O pH inicial da solução de corante é um importante parâmetro para estudos de biosorção e afeta não apenas a capacidade biosortiva, mas também a coloração e solubilidade do corante (WARANUSANTIGUL *et al.*, 2003). Os corantes têxteis são

compostos orgânicos complexos que possuem diferentes potenciais de ionização em diferentes valores de pH da solução, portanto, sua interação com a biomassa microbiana depende da especificidade química do corante e do tipo de biosorvente (YESILADA *et al.*, 2003). Usualmente a máxima capacidade biosortiva de corantes reativos e diretos são observadas em intervalos de pHs ácidos (SATHISKUMAR *et al.*, 2007). Os resultados observados de pH na remoção do corante reativo RB 220 por biomassa inativada de *Acremonium* sp3 estão apresentados na Figura 17, usando 200 mg/L de solução de corante, 2 g/L de biosorvente, tempo de contato de 90 min e velocidade de agitação de 175 rpm à 28 °C.

Como visto na Figura 17, as melhores capacidades biosortivas foram obtidas em soluções com pH variando de 2 a 6, com o máximo para o menor valor de pH (97,6 mg/g). Em pHs ácidos, os índices de biosorção obtidos não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). No entanto, a capacidade de biosorção diminuiu de 94,0 mg/g para 81,9 mg/g quando o pH inicial da solução de corante foi alterado de 6 para 7, no qual representou um decréscimo significativo de 12,9 %. Esta tendência continuou com aumento do pH inicial da solução de 7 a 10. A partir desses resultados, fica evidente que a faixa de pH ideal para biosorção do corante modelo (RB 220) pela biomassa do fungo *Acremonium* sp3 foi similar a estudos com outros corantes e biosorventes reportados na literatura (SADHASIVAM *et al.*, 2007).

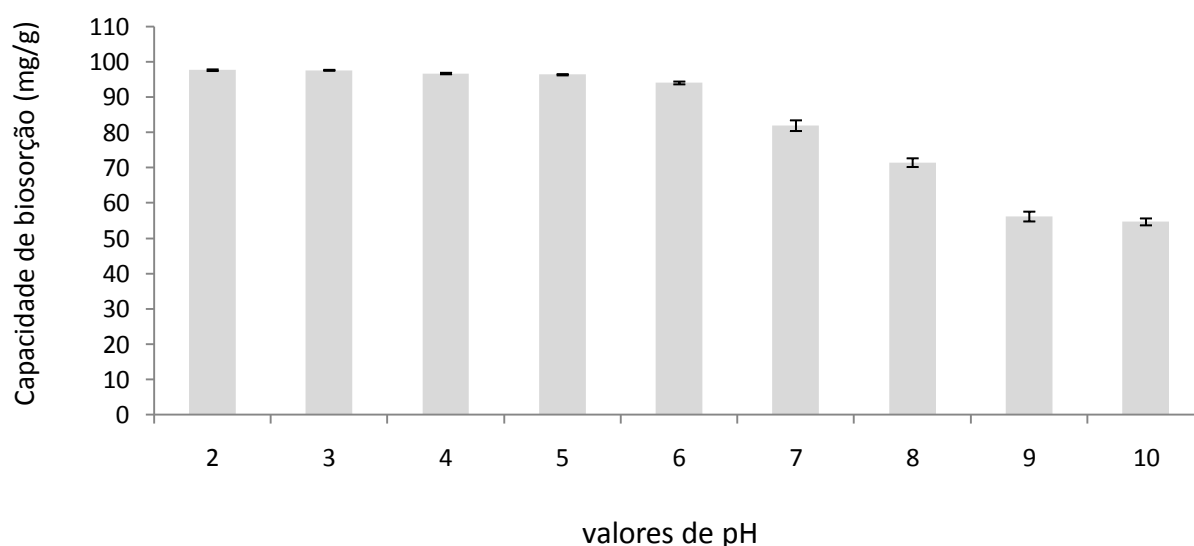


Figura 17 – Efeito do pH na capacidade biosortiva do corante RB 220 (200 mg/L) por biomassas inativas de *Acremonium* sp3.

A melhor performance de biosorção de corantes reativos em meio ácido pode ser explicado em termos de interação eletrostática entre a biomassa e as moléculas de corante. Após a dissolução, os corantes iônicos liberam íons na solução (O'MAHONY *et al.*, 2002). Dessa forma, a capacidade biosortiva desses grupos de corante sobre a superfície do biosorvente depende fortemente das cargas de superfície que, por sua vez são influenciadas pelo pH da solução. Com a diminuição do pH da solução, um número cada vez maior dos grupos funcionais de base fraca na superfície da biomassa são protonados e adquirem carga líquida positiva, que por sua vez interagem com as cargas negativas do corante por interações eletrostáticas (MAURYA *et al.*, 2006). No geral, os íons de hidrogênio também atuam como pontes de ligação entre a parede celular fúngica e a molécula do corante (FU; VIRARAGHAVAN, 2001).

6 CONCLUSÕES

Em função aos resultados obtidos, os fungos filamentosos isolados de ambiente marinho descritos neste trabalho mostraram ser bons organismos para aplicação na descoloração de corantes têxteis em solução aquosa salina. Embora a maioria dos isolados apresentou atividade descorante, as onze linhagens com melhor potencial de descoloração para pelo menos dois corantes foram preferidas para estudos adicionais. Elas corresponderam aos seguintes gêneros: *Aspergillus* sp (3 isolados), *Penicillium* sp (1), *Trichoderma* sp (1), *Acremonium* sp (1), *Paecilomyces* sp (1), *Cladosporium* sp (1) e três não-identificados (N.I.- 47, 49 e 50).

Um único mecanismo de descoloração, biosorção, foi evidenciado para todas as espécies analisadas ao ser confirmado ausência de atividade metabólica no processo. Pré-tratamento da biomassa micelial por autoclavagem, homogeneização do tamanho de partícula e tratamento com ácido clorídrico, incrementaram drasticamente a capacidade biosortiva. A autoclavagem proporcionou aumento médio para as onze linhagens de aproximadamente 41 %, e o tratamento químico com HCl, para três corantes testados, melhorou em média 11,5% e 5% para *Acremonium* sp3 e N.I.- 50, respectivamente. O menor tamanho de partícula (< 250 µm) proporcionou os melhores resultado de biosorção.

O tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultura influenciaram o crescimento micelial assim como as características biosortivas do micélio resultante. Por análises de superfície de resposta para os fungos *Acremonium* sp3 e N.I.- 50, as melhores condições biosortivas e de rendimento micelial foram obtidas com elevada concentração salina (> 20 g/L), valores de pH intermediários (entre 5,5 e 6,0) e, cultura estática com mais de 15 dias de incubação.

Em condições otimizadas para o fungo *Acremonium* sp3, foi possível obter até 95% de descoloração em 90 minutos, sendo que em cinco minutos já atingia 50 % da capacidade biosortiva máxima. A eficiência do processo de biosorção permaneceu inalterada em valores de pH inicial entre 2 e 6 e, para valores de pH mais elevados, diminuiu entre 12 % (pH 7,0) e 40% (pH 10). A elevada eficiência de descoloração observada, bem como a simplicidade e baixo custo operacional do sistema, sugere um bom potencial para aplicação no tratamento de águas residuais do banho de tingimento visando a sua reutilização no processamento têxtil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAR, S. T.; AKAR, T.; ÇABUK, A. Decolorization of a textile dye, reactive red 198 (RR198), by *Aspergillus parasiticus* fungal biosorbent. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26 (2), p. 399-405, 2009.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 997-1026, 2005.

AKSU, Z.; BALIBEK, E. Effect of salinity on metal-complex dye biosorption by *Rhizopus arrhizus*. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 1546-1555, 2010.

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

AKSU, Z.; TEZER, S. Equilibrium and kinetic modelling of biosorption of Remazol Black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system: effect of temperature. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 431-439, 2000.

AKSU, Z.; TEZER, S. Biosorption of reactive dyes on the green alga *Chlorella vulgaris*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1347-1361, 2005.

ALI, N.; HAMEED, A.; AHMED, S.; KHAN, A. G. Decolorization of acid red 151 by *Aspergillus niger* SA1 under different physicochemical conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1099-1105, 2008.

ALLEGRE, C.; MOULIN, P.; MAISSEU, M.; CHARBIT, F. Treatment and reuse of reactive dyeing effluents. **Journal of Membrane Science**, v. 269, p. 15-34, 2006.

ANJANEYA, O.; SANTHISHKUMAR, M.; ANAND, S. N.; KAREGOUDAR, T. B. Biosorption of acid violet dye from aqueous solutions using native biomass of a new isolate of *Penicillium* sp.. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 782-787, 2009.

ANJANEYULU, Y.; CHARY, N. S.; RAJ, D.; SAMUEL, S. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 4, p. 245-273, 2005.

ARAGHI, P. M.; ASSADI, M. M. Decolourization of textile effluent by *Aspergillus niger* (marine and terrestrial). **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 7 (1-2), p. 1-7, 1998.

ARX, J. A. von. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2 ed, Vanduz: J. Cramer,

351 p., 1974.

ASFOUR, H. M.; FADALI, O. A.; NASSAAR, M. M.; EI-GEUNDI, M. S. Equilibrium studies on adsorption of basic dyes on hard wood. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 35, p. 21–27, 1995.

ASGHER, M.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R. L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, p. 771–783, 2008.

ASSADI, M. M.; MAZAHERI, M.; SATARI, T. N.; NOOHI, A.; SHAHAMAT, M.; LEVIN, M. Biosorption of Baftkar textile effluent. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41 (8), p. 900-904, 2003.

BAIOTTO, P.; BARRECA, A. M.; FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase–mediator systems. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 191-197, 2003.

BALDRIAN, P.; SNAJDR, J. Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1023-1029, 2006.

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

BARNETT, H. C.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. Mineapolis: Burgess, 241 p., 1972.

BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Y. Biosorption of benzidine based textile dyes Direct Blue 1 and Direct Red 128 using native and heat-treated biomass of *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, p. 135-143, 2007.

BAYRAMOGLU, G.; ÇELİK, G.; ARICA, M. Y. Biosorption of Reactive Blue 4 dye by native and treated fungus *Phanerocheate chrysosporium*: Batch and continuous flow system studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 1689-1697, 2006.

BELESSI, V.; ROMANOS, G.; BOUKOS, N.; LAMBROPOULOU, D.; TRAPALIS, C. Removal of Reactive Red 195 from aqueous solutions by adsorption on the surface of TiO₂ nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 836-844, 2009.

BERGSTEN-TORRALBA, L. R.; NISHIKAWA, M. M.; BAPTISTA, D. F.; MAGALHÃES, D. P.; DA SILVA, M. Decolorization of different textile dyes by *penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 808-817, 2009.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BINUPRIYA, A. R.; SATHISHKUMAR, M.; KAVITHA, D.; YUN, S. E. Aerated and rotated mode decolorization of a textile dye solution by native and modified mycelial biomass of *Trametes versicolor*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 350-359, 2007.

BIRHANLI, A.; OZMEN, M. Evaluation of the toxicity and teratogenicity of six commercial textile dyes using the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus*. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 28 (1), p. 51-65, 2005.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 32-37, 2010.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2 (4), p. 455-475, 1960.

BUCHER, V. V. C.; HYDE, K. D.; POINTING, S. B.; REDDY, C. A. Production of wood decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by marine ascomycetes and their anamorphs. **Fungal Diversity**, v. 15, p. 1-14, 2004.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 143-163, 2004.

BUMPUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the lignin degrading system. **BioEssays**, v. 6 (4), p. 166-170, 2005.

CAMERON, M. D.; TOMIFEEVSKI, S.; AUST, D. S. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 751-758, 2000.

CARDOSO, M. H.; RAMALHO, P. **Biodegradação de corantes de efluentes têxteis por leveduras**. Universidade do Minho, FW-Science-2004, 2004.

CHA, C. J.; DOERGE, D. R.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4358-4360, 2001.

CHENG, Z.; PAN, J.; TANG, W.; CHEN, Q.; LIN, Y. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi. **Journal of Forestry Research**, v.20, p.63-72, 2009.

CHU, H. C.; CHEN, K. M. Reuse of activated sludge biomass: I. Removal of basic dyes from wastewater by biomass. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 595-600, 2002.

CONAMA. **Resolução do CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005**. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Ministério do Meio Ambiente, 2005.

CONCHON, J. A. **Tratamento de Efluentes**. Transcrição do artigo publicado na revista base textil, da Federación Argentina de la Industria Textil, n. 123, 1999.

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

COULIBALY, L.; GOURENE, G.; AGATHOS, S. N. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. **African Journal of Biotechnology**, v. 2 (12), p. 620-630, 2003.

CRINI, G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1061-1085, 2006.

DEACON, L. J.; PRYCE-MILLER, E. J.; FRANKLAND, J. C.; BAINBRIDGE, B. W.; MOORE, P. D.; ROBINSON, C. H. Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 7-20, 2006.

D'SOUZA, D. T.; TIWARI, R.; SAH, A. K.; RAGHUKUMAR, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 504-511, 2006.

D'SOUZA-TICLO, D.; VERNA, A. K.; MATHEW, M.; RAGHUKUMAR, C. Effect of nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC#2a, isolated from mangrove wood. **Indian Journal of Marine Science**, v. 35 (4), p. 364-372, 2006.

D'SOUZA-TICLO, D.; SHARMA, D.; RAGHUKUMAR, C. A thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from a marine-derived fungus. **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 725-737, 2009.

EL-RAHIM, W. M. A.; KHALIL, W. K. B.; ESHAK, M. G. Genotoxicity studies on the removal of a direct textile dye by a fungal strain, *in vivo*, using micronucleus and RAPD-PCR techniques on male rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 484-490, 2008.

FREITAS, K. R. **Caracterização e reuso de efluentes do processo de beneficiamento da indústria têxtil**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

FU, Y. Z.; VIRARAGHAVAN, T. Removal of a dye from an aqueous solution by the fungus *Aspergillus niger*. **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 35, p. 95-111, 2000.

FU, Y. Z.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 251– 62, 2001.

FU, Y. Z.; VIRARAGHAVAN, T. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 139-145, 2002.

GABRIEL, J.; BALDRIAN, P.; HLADÍKOVÁ, K.; HÁKOVÁ, M. Copper sorption by native and modified pellets of wood-rotting basidiomycetes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 194-198, 2001.

GADD, G. M. Biosorption. **Chemistry & Industry**, v. 2, p. 421-426, 1990.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 13-28, 2009.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 13-28, 2008

GADD, G. M.; WHITE, C. Copper uptake by *Penicillium ochro-chloron*: Influence of pH on toxicity and demonstration of energy-dependent copper influx using protoplasts. **Journal of General Microbiology**, v. 13 (1), p. 1875-1879, 1985.

GALLAGHER, K. A.; HEALY, M. G.; ALLEN, S. J. Biosorption of synthetic dye and metal ions from aqueous effluents using fungal biomass. In: Wise DL. (Ed.). **Global Environmental Biotechnology**. UK: Elsevier, p. 27–50, 1997.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 339-354, 2004.

GIUSTI, F.; MANTOVANI, L.; MARTELLA, A.; SEIDENARI, S. Hand dermatitis as an unsuspected presentation of textile dye contact sensitivity. **Contact Dermatitis**, v. 47 (2), p. 91-95, 2002.

GOMES, D. N. F.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M.; PASSAVANTE, J. Z. O. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68 (3), p. 577-582, 2008.

GOMES, D. N. F. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Fungos, Universidade Federal do Paraná. Recife, 2007.

GONG, R.; DING, Y.; LI, M.; YANG, C. Utilization of powdered peanut hull as biosorbent for removal of anionic dyes from aqueous solution. **Dyes Pigments**, v. 64, p. 187-192, 2005.

GOU, M.; QU, Y.; ZHOU, J.; MA, F.; TAN, L. Azo dye decolorization by a new fungal isolate, *Penicillium* sp. QQ and fungal-bacterial cocultures. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 314-319, 2009.

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

HAI, F. I.; YAMAMOTO, K.; NAKAJIMA, F.; FUKUSHI, K. Removal of structurally different dyes in submerged membrane fungi reactor -Biosorption/PAC-adsorption, membrane retention and biodegradation. **Journal of Membrane Science**, v. 325, p. 395-403, 2008.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected White-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 125-135, 1994.

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

HYDE, K. D. Fungal colonization of *Rhizophora apiculata* and *Xylocarpus granatum* poles in Kampung Kapok mangrove, Brunei. **Sydowia**, v. 43, p. 31-38, 1991.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

JORDAAN, J.; LEUKES, W. D. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic White rot fungus, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 212-219, 2003.

JUNGHANNS, C.; KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1225-1235, 2008.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. **Environment international**, v. 35 (1), p. 127-141, 2009.

KE, L.; YU, K. S. H.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Spatial and vertical distribution of

polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments. **Science of the Total Environment**, v. 340, p. 177-187, 2005.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica**. 2.ed., São Paulo, Premier, 256 p., 1999.

KHAMBHATY, Y.; MODY, K.; BASHA, S.; JHA, B. Equilibrium Modeling for Biosorption of Safranin onto Chemically Modified Biomass of Marine *Aspergillus wentii*. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 215 (1-4), p. 679-691, 2010.

KUMAR, R.; BISHNOI, N. R.; BISHNOI, K. G. Biosorption of chromium(VI) from aqueous solution and electroplating wastewater using fungal biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 135, p. 202-208, 2008.

KUMARA, K. L. W.; RAWAL, R. D. Influence of carbon, nitrogen, temperature and pH on the growth and sporulation of some Indian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease of papaya (*Carrica papaya* L). **Tropical Agricultural Research and Extension**, v. 11, p. 7-12, 2008.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25 (1), p. 78-82, 2002.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. New York: Elsevier, 230 p., 1987.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 175-185, 1999.

LI, X.; KONDO, R.; SAKAI, K. Studies on hypersaline-tolerant white-rot fungi I: screening of lignin-degrading fungi in hypersaline conditions. **Journal of Wood Science**, v. 48, p. 147-152, 2002.

LIMA, R. O. A. de; BAZ, A. P.; SALVADORI, D. M. F.; RECH, C. M.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, G. A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research** v. 626 (1-2), p. 53-60, 2007.

LOW, B. T.; TING, Y. P.; DENG, S. Surface modification of *Penicillium chrysogenum* mycelium for enhanced anionic dye removal. **Chemical Engineering Journal**, v. 141, p. 9-17, 2008.

LUCAS, M. S.; DIAS, A. A.; SAMPAIO, A.; AMARAL, C.; PERES, J. A. Degradation of a textile reactive Azo dye by a combined chemical-biological process: Fenton's reagent-yeast. **Water Research**, v. 41 (5), p. 1103-1109, 2007.

MASTRANGELO, G.; FEDELI, U.; FADDA, E.; MILAN, G.; LANGE, J. H. Epidemiologic evidence of cancer risk in textile industry workers: a review and update. **Toxicology and Industrial Health**, v. 18 (4), p.171-181, 2002.

MATHUR, N.; BHATNAGAR, P. Mutagenicity assessment of textile dyes from Sanganer (Rajasthan). **Journal of Environmental Biology**, v. 28 (1), p. 123-126, 2007.

MATHUR, N.; BHATNAGAR, P.; NAGAR, P.; BIJARNIA, M. K. Mutagenicity assessment of effluents from textile/dye industries of Sanganer, Jaipur (India): a case study. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 61, p. 105-113, 2005.

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. 512–21, 2006.

MESTER, T.; TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 46, p. 51-59, 2000.

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

MOAWAD, H., EL-RAHIM, W. M.; KHALAFALLAH, M. Evaluation of biotoxicity of textile dyes using two bioassays. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43 (3), p. 218-229, 2003.

MOLLER, P.; WALLIN, H. Genotoxic hazards of azo pigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene. **Mutation Research**, v. 462, p. 13-30, 2000.

MTUI, G.; MASALU, R. Extracellular enzymes from brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus* isolated from mangrove forests of coastal Tanzania. **Scientific Research and Essay**, v. 3 (4), p. 154-161, 2008.

MUNARI, F. M.; GAIO, T. A.; CALLONI, R.; DILLON, A. J. P. Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24 (8), p. 1383-1392, 2008.

NEAMTU, M.; CATRINESCU, C.; KETTRUP, A. Effect of dealumination of iron(III)--exchanged Y zeolites on oxidation. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 51, p. 149-157, 2004.

NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; KASINATH, A.; ERBANOVA, P. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. **International Biodeterioration and biodegradation**, v. 54, p. 215-223, 2004.

O'MAHONY, T.; GUIBAL, E.; TOBIN, J. M. Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 456-463, 2002.

O'NEILL, C.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L.; LOURENCO, N. D.; PINHEIRO, H. M.; DELEE, W. Colour in textile effluents - sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 1009-1018, 1999.

PADMESH, T. V. N.; VIJAYARAGHAVAN, K.; SEKARAN, G.; VELAN, M. Batch and column studies on biosorption of acid dyes on freshwater macro alga *Azolla filiculoides*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 125, p. 121-129, 2005.

PARK, C.; LIM, J.; LEE, Y.; LEE, B.; KIM, S. W.; LEE, J.; KIM, S. Optimization and morphology for decolorization of reactive black 5 by *Funalia trogii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1758-1764, 2007.

PATEL, R; SURESH, S. Kinetic and equilibrium studies on the biosorption of reactive black 5 dye by *Aspergillus foetidus*. **Bioresource Technology**, v. 99 (1), p. 51-58, 2008.

PLUMB, J. J.; BELL, J.; STUCKEY, D. C. Microbial population associated with treatment of an industrial dye effluent in an anaerobic baffled reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67 (7). p. 3226-3235, 2001.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 20-33, 2001.

PORPINO, K. K. P. **Biossorção de Ferro (II) por casca de caranguejo *Ucides cordatus***. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

PRIGIONE, V.; TIGINI, V.; PEZELLA, C.; ANASTASI, A.; SANNIA, G.; VARESE, G. C. Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. **Water Research**, v. 42, p. 2911-2920, 2008a.

PRIGIONE, V.; VARESE, G. C.; CASIERI, L.; MARCHISIO, V. F. Biosorption of simulated dyed effluents by inactivated fungal biomasses. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3559-3567, 2008b.

RAGHUKUMAR, C.; D'SOUZA-TICLO, D.; VERMA, A. K. Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: an emerging role of marine-derived fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, p. 189-206, 2008.

RAMALHO, P. A. **Degradation of dyes with microorganisms: studies with ascomycete yeasts**. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências). Braga, Portugal: Escola de Engenharia,

Universidade do Minho, 2005.

RAO, J. R.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass. **Bioresource Technology**, v. 85, p. 165-171, 2002.

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

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27 (2), p. 205-211, 2004.

SADHASIVAM, S.; SAVITHA, S.; SWAMINATHAN, K. Feasibility of using *Trichoderma harzianum* biomass for the removal of erioglaucine from aqueous solution. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1075-1081, 2007.

SANTHI, T.; MANONMANI, S. Uptake of cationic dyes from aqueous solution by biosorption using granulated *Annona squamosa* Seed. **Journal of Chemistry**, v. 6(4), p.1260-1266, 2009.

SANTOS, A. Z. dos; NETO, J. M. C.; TAVARES, C. R. G.; COSTA, M. G. da. Screening of filamentous fungi for the decolorization of a commercial reactive dye. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 288-295, 2004.

SARATALE, R. G.; SARATALE, G. D; KALYANI, D. C.; CHANG, J. S.; GOVINDWAR, S. P. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2493-2500, 2009.

SATHISHKUMAR, M.; BINUPRIYA, A. R.; VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, S. Two and three-parameter isothermal modeling for liquid-phase sorption of Procion Blue H-B by inactive mycelial biomass of *Panus fulvus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 389-398, 2007.

SCHMIT, J. P.; SHEARER, C. A. A checklist of mangrove-associated fungi, their geography and known host plants. **Mycotaxon**, v. 80, p. 423-477, 2003

SHARMA, G.; PANDEY, R. R. Influence of culture media on growth, colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1 (8), p. 157-164, 2010.

SHARMA, P.; SINGH, L.; DILBAGHI, N. Response surface methodological approach for the decolorization of simulated dye effluent using *Aspergillus fumigatus fresenius*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1081-1086, 2009.

SILVA, M. da; PASSARINI, M. R. Z.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SETTE, L. D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. **Environmental Technology**, v. 29, p. 1331-1339, 2008.

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 336 p., 1995.

SMITH, J.; GAWKRODGER, D. J. Contact dermatitis from textile and dye allergens requires a high index of suspicion for diagnosis: A review of 18 cases. **Contact Dermatitis**, v. 47 (2), p. 112-113, 2002.

SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58 (8), p. 2397-2401, 1992.

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

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. e ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 169-183, 2000.

TWARDOKUS, R. G. **Reuso de água no processo de tingimento da indústria têxtil**. Dissertação de Mestrado pelo curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

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

VENKATARAMAN, K. **The Chemistry of synthetic dyes**, v. 3, New York, Academic Press, 1974.

VERMA, A. K. Detoxification and decolorization of raw textile effluents by a few marine fungi. **New Biotechnology**, v. 25S, p. 86, 2009.

VERMA, A. K.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUCHE, Y. S.; NAIK, C. G. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. **Biodegradation**, v. 21 (2), p. 217-233, 2010.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 195-226, 2009.

WARANUSANTIGUL, P.; POKETHITIYOOK, P.; KRUAATCHUE, M.; UPATHAM, E. S. Kinetics of basic dye (methylene blue) biosorption by giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). **Environmental Pollution**, v. 125 (3), p. 385-392, 2003.

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

WILLMOTT, N.; GUTHRIE, J.; NELSON, G. The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. **Journal of the Society of Dyers and Colourists**, v. 114, p. 38-41, 1998.

WONG, Y. C.; SZETO, Y. S.; CHEUNG, W. H.; MCKAY, G. Adsorption of acid dyes on chitosan. Equilibrium isotherm analyses. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 1-10, 2003.
WU, R. Y. Studies on the microbial ecology of the Tansui Estuary. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 34, p. 13-30, 1993.

XIONG, X. J.; MENG, X. J.; ZHENG, T. L. Biosorption of C.I. Direct Blue 199 from aqueous solution by nonviable *Aspergillus niger*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 241-246, 2010.

YANG, Q.; LI, C.; LI, H.; LI, Y.; YU, N. Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43 (3), p. 225-230, 2008.

YESILADA, O.; ASMA, D.; CING, S. Decolorization of textile dyes by fungal pellets. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 933-938, 2003.

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, v. 29 (174), p. 61-64, 2001.

ZEE, F. P. van der. **Anaerobic azo dye reduction**. Tese de Doutorado, 142 p., Wageningen, Holanda: Wageningen University Research Center, 2002.

ZEROUAL, Y.; KIM, B. S.; KIM, C. S.; BLAGHEN, M.; LEE, K. M. Biosorption of Bromophenol blue from aqueous solutions by *Rhizopus stolonifer* biomass. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 177, p. 135-146, 2006.

ZHENG, Z.; LEVIN, R. E.; PINKHAM, J. L.; SHETTY, K. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 31-37, 1999.

ZILLE, A.; TZANOV, T.; GUBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Immobilized laccase for decolorization of Reactive Black 5 dyeing effluent. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1473-1477, 2003.

ANEXOS

ANEXO I – Identificação taxonômica de todas as linhagens isoladas por ponto amostral e suas frequências de ocorrência em relação ao total de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

N.I.	Identificação taxonômica	UFC em cada amostra				Total de isolados (UFC)	Frequência de ocorrência (%)
		1	2	3	4		
1	<i>Aspergillus</i> sp1	146	49	121	112	428	21
2	<i>Aspergillus</i> sp2	39	8	29	47	123	6
3	<i>Aspergillus</i> sp3	23	22	23	22	90	4,4
4	<i>Aspergillus</i> sp4	4	3	4	4	15	0,74
5	<i>Aspergillus</i> sp5	8	5	1	15	29	1,4
6	<i>Aspergillus</i> sp6	0	0	5	0	5	0,24
7	<i>Trichoderma</i> sp1	56	75	167	76	374	18,3
8	<i>Trichoderma</i> sp2	3	0	0	0	3	0,15
9	<i>Trichoderma</i> sp3	0	12	0	0	12	0,59
10	<i>Trichoderma</i> sp4	1	0	0	5	6	0,29
11	<i>Penicillium</i> sp1	135	57	78	129	399	19,6
12	<i>Penicillium</i> sp2	87	18	36	27	168	8,2
13	<i>Penicillium</i> sp3	29	45	23	65	162	7,9
14	<i>Penicillium</i> sp4	1	0	0	0	1	0,05
15	<i>Penicillium</i> sp5	0	0	0	6	6	0,29
16	<i>Penicillium</i> sp6	0	0	1	1	2	0,1
17	<i>Penicillium</i> sp7	0	0	5	0	5	0,24
18	<i>Penicillium</i> sp8	4	0	1	6	11	0,54
19	<i>Penicillium</i> sp9	0	0	0	1	1	0,05
20	<i>Penicillium</i> sp10	0	1	1	5	7	0,34
21	<i>Paecilomyces</i> sp1	0	0	2	1	3	0,15
22	<i>Paecilomyces</i> sp2	1	0	0	0	1	0,05
23	<i>Paecilomyces</i> sp3	1	0	0	5	6	0,29
24	<i>Paecilomyces</i> sp4	0	0	4	0	4	0,2
25	<i>Acremonium</i> sp1	1	0	2	6	9	0,44
26	<i>Acremonium</i> sp2	4	0	3	0	7	0,34
27	<i>Acremonium</i> sp3	1	0	0	0	1	0,05
28	<i>Cladosporium</i> sp1	0	0	4	5	9	0,44
29	<i>Cladosporium</i> sp2	2	5	3	12	22	1,08
30	<i>Alternaria</i> sp1	0	0	13	0	13	0,64
31	<i>Alternaria</i> sp2	0	0	1	0	1	0,05
32	<i>Curvularia</i> sp	2	0	0	0	2	0,1
33	<i>Phoma</i> sp	0	0	0	5	5	0,24
34	<i>Fusarium</i> sp	0	0	1	0	1	0,05
35	<i>Mucor</i> sp	0	1	0	0	1	0,05
36	Moniliales	1	0	0	0	1	0,05
37	N.I.- 37	2	0	5	6	13	0,64
38	N.I.- 38	0	2	0	0	2	0,1
39	N.I.- 39	1	0	2	5	8	0,39
40	N.I.- 40	0	1	4	0	5	0,24
41	N.I.- 41	2	0	1	0	3	0,15
42	N.I.- 42	4	0	4	8	16	0,78
43	N.I.- 43	0	0	2	5	7	0,34
44	N.I.- 44	3	5	2	3	13	0,64
45	N.I.- 45	1	3	0	2	6	0,29
46	N.I.- 46	0	0	3	1	4	0,2
47	N.I.- 47	0	0	1	1	2	0,1
48	N.I.- 48	0	0	1	2	3	0,15
49	N.I.- 49	0	0	2	5	7	0,34
50	N.I.- 50	0	0	2	0	2	0,1
51	N.I.- 51	6	6	0	0	12	0,59
52	N.I.- 52	1	0	1	0	2	0,1

ANEXO II – Percentual de descoloração por corante das 38 linhagens após 15 dias de cultivo em meio líquido (MML) e sólido (MMS) contendo a mistura dos três corantes reativos. Dados expressos pela média e desvio padrão (dp).

Linhagens fúngicas testadas	MML						MMS					
	RB 220		RR 195		RY 135		RB 220		RR 195		RY 135	
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
<i>Trichoderma</i> sp1	69,5	6,9	51,6	14,0	-	-	34,5	8,6	26,8	10,3	-	-
<i>Aspergillus</i> sp1	70,9	2,3	73,3	0,8	56,8	2,0	77,0	8,6	-	-	67,8	11,5
<i>Aspergillus</i> sp2	77,6	6,0	75,3	7,7	62,0	11,2	44,8	9,4	23,5	10,8	-	-
<i>Aspergillus</i> sp3	47,5	4,2	46,0	4,4	41,8	4,3	69,1	6,0	76,5	5,6	43,4	6,6
<i>Penicillium</i> sp1	74,0	1,7	76,0	1,1	76,8	2,5	88,5	4,3	89,6	5,2	90,7	4,4
<i>Penicillium</i> sp2	34,4	5,4	28,0	5,5	-	-	-	-	1,8	6,9	-	-
<i>Penicillium</i> sp3	44,5	6,5	41,6	7,7	19,6	12,3	53,9	15,4	48,2	16,4	36,0	11,5
<i>Cladosporium</i> sp1	90,9	0,2	94,4	0,6	92,2	1,0	90,9	0,9	93,6	0,4	90,7	1,1
<i>Acremonium</i> sp2	48,2	1,3	-	-	-	-	84,2	1,7	82,3	1,7	37,2	7,7
<i>Alternaria</i> sp1	31,0	0,2	28,1	4,1	19,8	7,6	69,7	6,9	74,1	5,6	50,8	4,9
<i>Aspergillus</i> sp4	74,0	1,7	69,7	4,5	-	-	69,1	7,7	68,3	2,6	-	-
<i>Paecilomyces</i> sp1	47,5	6,9	31,4	8,9	14,6	10,0	75,8	1,7	77,4	1,7	67,8	0,5
<i>Curvularia</i> sp	48,2	7,1	46,2	9,0	12,6	7,9	-	-	-	-	-	-
<i>Acremonium</i> sp3	83,5	0,6	75,9	1,1	78,5	0,1	35,8	0,0	53,4	0,4	7,4	7,1
<i>Trichoderma</i> sp2	58,5	4,0	43,4	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp3	86,4	1,2	70,3	2,3	26,3	15,1	51,5	1,7	67,1	1,7	45,7	1,1
<i>Penicillium</i> sp4	52,8	4,8	48,7	5,5	32,9	10,5	15,2	6,9	21,6	10,8	22,9	8,2
<i>Paecilomyces</i> sp2	27,3	0,8	26,8	0,9	14,7	0,5	69,7	6,9	69,2	3,0	66,3	13,7
<i>Paecilomyces</i> sp3	30,6	8,5	17,0	9,4	-	-	28,5	12,0	30,5	0,9	-	-
N.I.- 38	19,0	12,9	15,3	10,6	-	-	69,1	6,0	79,6	4,7	54,3	2,2
<i>Penicillium</i> sp5	23,5	9,2	9,3	3,7	-	-	48,5	7,7	44,8	7,3	16,3	5,5
<i>Paecilomyces</i> sp4	72,4	2,5	86,7	1,5	78,1	2,5	-	-	-	-	-	-
N.I.- 42	36,7	8,3	25,2	0,1	16,4	12,4	26,1	13,7	36,0	13,8	30,2	13,2
<i>Trichoderma</i> sp4	40,5	9,0	29,5	8,6	17,5	12,6	-	-	-	-	-	-
N.I.- 44	59,9	4,4	65,8	2,8	74,5	6,5	32,1	1,7	48,2	0,0	26,7	9,3
N.I.- 46	38,8	11,2	23,0	13,4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp6	52,7	3,8	50,9	1,8	-	-	33,3	13,7	50,9	14,2	19,0	13,7
N.I.- 47	79,5	2,5	87,0	2,4	84,5	0,7	33,9	14,6	60,4	11,2	25,6	14,3
<i>Penicillium</i> sp7	61,5	9,0	65,6	10,6	-	-	57,0	12,9	75,6	9,5	60,1	13,7
<i>Aspergillus</i> sp6	73,1	9,2	72,4	8,4	75,3	7,1	70,3	2,6	71,3	1,7	55,0	3,3
<i>Fusarium</i> sp	71,2	1,2	69,8	2,9	53,0	5,9	87,9	3,4	88,4	2,6	82,9	4,4
<i>Penicillium</i> sp8	61,1	1,5	59,9	1,4	-	-	10,3	8,6	27,7	3,0	-	-
N.I.- 49	87,3	1,3	91,5	0,5	86,2	1,1	98,2	0,9	98,5	0,4	97,3	0,5
<i>Penicillium</i> sp9	45,2	2,1	65,0	0,1	76,2	1,1	-	-	-	-	-	-
<i>Phoma</i> sp	16,5	8,9	27,7	4,6	-	-	-	-	0,6	16,4	-	-
<i>Penicillium</i> sp10	17,0	6,9	13,6	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-
N.I.- 50	70,3	12,7	78,9	9,8	71,6	6,4	77,0	3,4	84,8	2,6	62,8	15,3
N.I.- 52	49,7	13,1	57,1	13,4	62,1	3,3	60,9	2,6	65,1	0,9	69,1	1,1

ANEXO III – Efeito de diferentes composições de nitrogênio no meio de cultivo no rendimento micelial (mg) e capacidade biosortiva (mg/g) para as quatro linhagens caracterizadas.

Fonte de nitrogênio	g/L	<i>Acromonium sp3</i>		<i>Trichoderma sp3</i>		N.I.- 49						N.I.- 50					
		Maltose		Maltose		Dextrose		Maltose		Amido		Dextrose		Sacarose		Amido	
		Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Peso seco (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)
Peptona	1	26,7	14,2	12,4	14,9	24,8	13,5	23,0	13,0	25,9	13,1	22,9	15,5	21,7	15,1	20,7	16,6
	5	40,0	20,2	20,8	16,5	33,9	15,6	28,8	15,3	31,6	17,2	24,9	19,1	26,0	18,2	29,8	19,5
	10	41,0	20,1	19,0	15,8	35,3	16,5	30,8	16,6	36,9	17,4	34,2	19,9	32,0	18,9	33,9	19,8
Tartarato de Amônia	1	28,7	15,1	14,1	17,7	21,5	11,7	21,4	8,8	20,1	6,9	22,2	17,6	19,4	16,4	15,7	17,6
	5	30,0	21,2	20,5	17,9	28,8	13,0	27,9	11,6	22,4	14,3	25,9	19,9	22,9	18,0	23,3	19,3
	10	27,9	10,3	12,1	18,5	35,7	14,0	32,5	14,2	31,3	14,9	39,7	19,9	29,2	18,2	24,1	19,8
Cloreto de Amônia	1	19,1	14,9	16,6	13,8	10,6	8,7	13,4	6,2	16,2	5,7	24,0	20,1	12,8	18,1	10,5	17,8
	5	13,8	15,0	15,5	10,3	14,4	9,7	16,2	7,0	15,1	6,1	24,2	18,8	17,3	17,9	8,7	17,7
	10	9,9	15,7	16,0	10,8	16,9	14,4	18,7	12,4	15,7	8,3	19,0	20,5	15,4	18,9	5,8	18,2
Nitrato de Sódio	1	27,3	19,5	15,3	16,7	16,2	17,4	20,2	12,8	23,8	17,2	20,5	18,1	22,5	16,8	23,1	17,3
	5	25,4	20,2	16,6	16,6	24,2	16,3	28,0	14,5	24,4	17,0	22,2	19,6	25,1	19,0	22,2	20,6
	10	28,2	19,4	15,6	18,1	23,8	16,8	29,9	13,5	24,3	16,3	19,4	18,0	25,3	18,4	24,2	18,4
Uréia	1	31,7	18,3	3,9	-	10,7	16,3	19,0	15,7	25,3	19,0	22,8	19,5	22,5	15,8	21,5	17,0
	5	29,9	14,6	6,0	-	20,6	14,4	22,3	15,9	24,6	18,9	4,1	-	24,1	14,0	24,6	16,1
	10	26,0	14,9	6,0	-	15,2	14,7	15,1	14,7	20,4	17,2	4,5	-	17,4	14,4	17,4	18,0
Oxalato de Amônia	1	4,8	-	4,8	-	3,7	-	3,6	-	3,8	-	21,2	17,4	18,4	16,8	13,4	19,5
	5	28,1	11,7	12,0	16,1	4,0	-	4,2	-	3,4	-	5,1	-	17,1	16,6	24,6	17,7
	10	31,3	13,3	6,2	-	4,5	-	4,4	-	4,4	-	5,0	-	10,5	17,2	17,4	17,6

ANEXO IV – Resultados do desenho de Box-Behnken contendo os valores experimentais (observados) e preditos para o índice de biomassa ativa (mg total de corante adsorvido utilizando toda biomassa produzida).

Nº ensaio	Fatores				Resposta: Índice de biomassa ativa (mg)			
	Salinidade (g/L)	pH	Tempo de cultivo (dias)	Agitação (rpm)	Acremonium sp3		N.I.- 50	
					Observado	Predito	Observado	Predito
1	2	4,2	15	75	0,598	0,548	0,319	0,343
2	24	4,2	15	75	0,708	0,669	0,356	0,374
3	2	7	15	75	0,488	0,485	0,393	0,375
4	24	7	15	75	0,738	0,746	0,461	0,437
5	13	5,6	10	0	0,842	0,803	0,397	0,365
6	13	5,6	20	0	0,908	0,869	0,381	0,411
7	13	5,6	10	150	0,707	0,702	0,360	0,329
8	13	5,6	20	150	0,709	0,706	0,369	0,400
9	2	5,6	15	0	0,618	0,651	0,517	0,485
10	24	5,6	15	0	0,809	0,850	0,559	0,532
11	2	5,6	15	150	0,524	0,527	0,445	0,462
12	24	5,6	15	150	0,699	0,710	0,487	0,509
13	13	4,2	10	75	0,668	0,684	0,221	0,203
14	13	7	10	75	0,626	0,676	0,240	0,262
15	13	4,2	20	75	0,709	0,703	0,305	0,273
16	13	7	20	75	0,700	0,727	0,302	0,309
17	2	5,6	10	75	0,602	0,601	0,360	0,389
18	24	5,6	10	75	0,809	0,789	0,319	0,349
19	2	5,6	20	75	0,614	0,633	0,380	0,361
20	24	5,6	20	75	0,826	0,826	0,511	0,494
21	13	4,2	15	0	0,683	0,725	0,321	0,350
22	13	7	15	0	0,784	0,746	0,361	0,394
23	13	4,2	15	150	0,570	0,607	0,344	0,323
24	13	7	15	150	0,644	0,601	0,391	0,374
25	13	5,6	15	75	0,824	0,794	0,508	0,490
26	13	5,6	15	75	0,771	0,794	0,482	0,490
27	13	5,6	15	75	0,791	0,794	0,472	0,490
28	13	5,6	15	75	0,797	0,794	0,507	0,490
29	13	5,6	15	75	0,786	0,794	0,479	0,490

ANEXO V – Análises da adequação dos modelos testados para o fungo *Acremonium* sp3.

Fonte	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor de F	Probabilidade (p-valor)	Observação
<i>1) Modelo sequencial soma dos quadrados</i>						
Média	14,57	1	14,57			
Linear	0,17	4	0,04	7,83	0.0003	
2FI	0,01	6	0,00	0,16	0.9845	
<u>Quadrático</u>	0,10	4	0,02	<u>15,24</u>	<u>< 0.0001</u>	Sugerido
Cúbico	0,01	8	0,00	1,12	0.4585	Rejeitado
Residual	0,01	6	0,00			
Total	14,86	29	0,51			
Fonte	Desvio padrão	R²	R² Ajustado	R² Predito	PRESS	
<i>2) Resumo das estatísticas do modelo</i>						
Linear	0,073	0,566	0,494	0,384	0,180	
2FI	0,082	0,588	0,359	-0,077	0,315	
<u>Quadrático</u>	0,040	<u>0,923</u>	<u>0,846</u>	0,578	0,123	Sugerido
Cúbico	0,039	0,969	0,856	-2,722	1,087	Rejeitado
Fonte	df	Valor de F	Probabilidade (p-valor)			
<i>3) Teste de falta de ajuste ("Lack of Fit Test")</i>						
Linear	20	16,83	0.0071			
2FI	14	22,82	0.0041			
<u>Quadrático</u>	10	5,64	<u>0.0549</u>	Sugerido		
Cúbico	2	10,13	0.0272	Rejeitado		
Erro puro	4					

ANEXO VI – Análises da adequação dos modelos testados para o fungo N.I.- 50.

Fonte	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor de F	Probabilidade (p-valor)	Observação
<i>1) Modelo sequencial soma dos quadrados</i>						
Média	4,60	1	4,60			
Linear	0,03	4	0,01	0,80	0.5386	
2FI	0,01	6	0,00	0,13	0.9904	
<u>Quadrático</u>	0,16	4	0,04	<u>35,35</u>	<u>< 0.0001</u>	Sugerido
Cúbico	0,01	8	0,00	6,56	0.0170	Rejeitado
Residual	0,00	6	0,00			
Total	4,81	29	0,17			
Fonte	Desvio padrão	R²	R² Ajustado	R² Predito	PRESS	
<i>2) Resumo das estatísticas do modelo</i>						
Linear	0,089	0,117	-0,030	-0,284	0,274	
2FI	0,10	0,155	-0,315	-1,355	0,502	
<u>Quadrático</u>	0,034	0,924	0,848	0,584	0,089	Sugerido
Cúbico	0,017	0,992	0,964	0,647	0,075	Rejeitado
Fonte	df	Valor de F	Probabilidade (p-valor)			
<i>3) Teste de falta de ajuste ("Lack of Fit Test")</i>						
Linear	20	32,36	0.0020			
2FI	14	44,27	0.0011			
<u>Quadrático</u>	10	5,22	<u>0.0627</u>	Sugerido		
Cúbico	2	0,88	0.4813	Rejeitado		
Erro puro	4					

