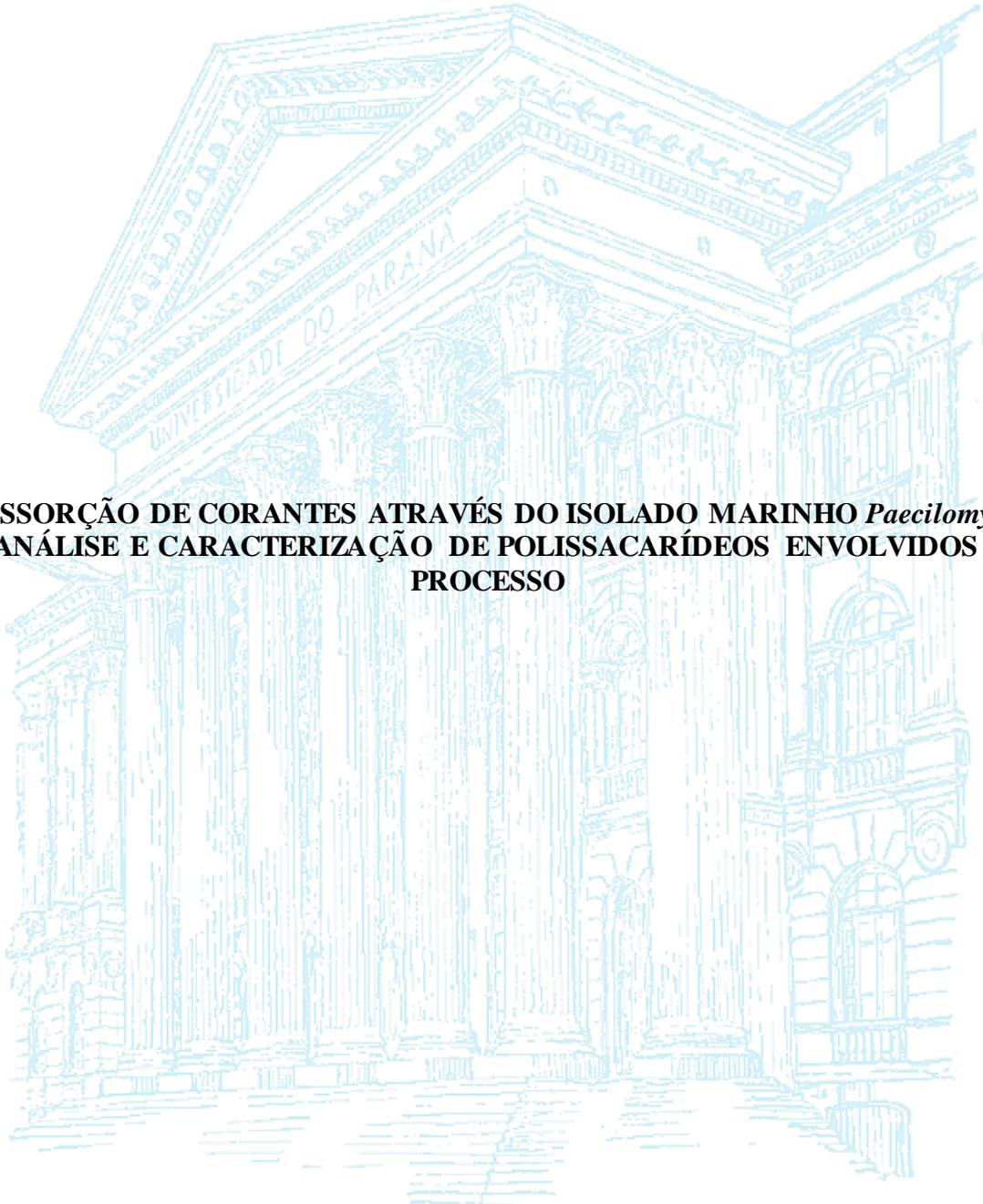


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SHAYLA FERNANDA BARBIERI



**BIOSSORÇÃO DE CORANTES ATRAVÉS DO ISOLADO MARINHO *Paecilomyces* sp., ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO**

CURITIBA  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-BIOQUÍMICA  
SHAYLA FERNANDA BARBIERI

**BIOSSORÇÃO DE CORANTES ATRAVÉS DO ISOLADO MARINHO *Paecilomyces*  
sp., ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS ENVOLVIDOS NO  
PROCESSO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Joana Léa Meira Silveira

Coorientador: Prof. Dr. Jaime Paba Martinez

Colaboradora: Dr<sup>ª</sup>. Andrea Caroline Ruthes

CURITIBA  
2014

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me manter sempre forte e determinada apesar de todos os obstáculos e dificuldades para chegar até aqui e por ter me dado à graça de mais uma conquista.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Joana Léa Meira Silveira, por ter aceitado me orientar neste trabalho e por ter acreditado na minha capacidade de crescimento. Sou muito grata pelos ensinamentos, pela dedicação e compreensão, carinho e amizade! Tenho muito orgulho por tê-la como minha orientadora!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Jaime Paba Martinez, pelo apoio, incentivo, pelos conhecimentos transmitidos, e principalmente pela paciência de passar as tardes discutindo resultados e me explicar algumas coisas mil vezes se assim preciso. Também pela amizade que vem sendo construída desde então.

À Dr<sup>ª</sup>. Andrea Caroline Ruthes por ter aceitado colaborar com a construção desse trabalho, por ter sido essencial na elaboração dos experimentos e nas discussões dos resultados. Além da amizade, dos momentos de descontração, e por estar disponível a qualquer hora (nas suas férias, nos finais de semana) e nos momentos em que eu estava mais desesperada! Você é uma pessoa maravilhosa, com uma alegria contagiante!

À banca examinadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Juliana Maurer e prof. Dr. Patricio Zamora, pela avaliação e correção do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, representado atualmente pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Maria Suter Correia Cadena e pelo Prof. Dr. Emanuel Maltempo de Souza. Também ao Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá.

À Capes pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Aducto Netto, pelo programa de estatística e auxílio nas análises dos dados.

Ao Prof. Dr. Guilherme, Dr. Arquimedes e Popó, pelas análises de RMN.

À Rosane, pelas análises de CG-EM.

À Elis e o Roberto, pelas análises de HPSEC-MALLS-RI.

Ao Dr. Lauro, pelas conversas, conselhos, ensinamentos e pela amizade!

Ao Prof. Dr. Glauber Wagner, por despertar em mim o amor pela pesquisa!

Aos meus avós Waldemar e Zélia Barbieri que mesmo não estando mais aqui, estão todos os dias ao meu lado, guiando meus passos e me protegendo. Meus verdadeiros pais, agradeço a cada dia pela forma em que fui criada e educada por vocês. Amarei eternamente!

À minha mãe Loiry por ter me dado a vida e a minha tia-mãe Rosane, pelo amor, carinho, conselhos, puxões de orelha (muito importante) e auxílio financeiro nos momentos de desespero...hehehe! Tenho um imenso orgulho de vocês! Amo mais que chocolate branco!

À toda minha família, em especial ao meu PAIdrinho Sergio, e a MÃEdrinha Shirley (os melhores que eu poderia ter) e aos meus maninhos Vini, Ginho e Tatá. Enfim a todos os tios, tias e primas, obrigada pelo apoio! Amo muito vocês!

Aos meus colegas do laboratório de carboidratos vegetais (praticamente minha casa) Roberto e Heide pela amizade, pelos conselhos, dicas de trabalho, cálculos matemáticos... hehehe. Também pelo café, chocolate e guloseimas!! Heide, quando eu crescer quero ser como vc! Robertinhooo espero ter você ao meu lado (na bancada da frente) pelos próximos 4 anos de doutorado! Vocês são de mais!

Aos meus colegas do laboratório de biodegradação Geison e Danilo pelas dicas de trabalho pelas conversas, ensinamentos, amizade e momentos de descontração! Admiro muito vcs!

À turma de mestrado 2012 e aos meus colegas dos outros laboratórios, que são muitos, por isso não tenho como citar todos os nomes, mas em especial ao Alex, a Ester, a Samantha, a Djuna, a Fran, a Jenifer, e a Tati W., pelas conversas, pela ajuda, conselhos, dicas, e principalmente pela torcida de que tudo desse certo! Sem vocês tudo seria mais difícil e menos divertido!

À Tatiana Milani, minha amiga, irmã, tia, mãe, pai (sim, ela consegue fazer todos esses papéis na minha vida!!), tenho que agradecer a Deus por ter colocado você no meu caminho, é um verdadeiro anjo na minha vida!! Obrigada pela paciência, pelo ombro amigo nos momentos de choro e desespero, por me incentivar sempre a seguir em frente e por me aguentar desde 2004 e agora por mais 4?? Que a nossa amizade continue pura e sincera por toda eternidade! Amo você!

As minhas amis do coração Talita, Tatiana, Débora e Rafaela por estarem comigo desde a graduação, por toda força, carinho e amizade. E quem diria... a turma da biomol, as "excluídas" porque gostávamos de laboratório e não de mato! As que iriam pendurar seus diplomas na parede... Em breve todas mestres!!! O orgulho que sinto mal cabe em mim!!

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

A indústria têxtil representa um importante setor na economia brasileira e mundial que vem crescendo nos últimos anos. No entanto, devido à complexidade dos efluentes eliminados em corpos de água, destaca-se como uma potencial contribuinte à degradação ambiental. Diversos problemas ambientais são inerentes às dificuldades no tratamento dos efluentes têxteis, especialmente em relação à remoção da cor intensa, causada pela presença de corantes oriundos do processo de tingimento de fibras têxteis. Dentre as formas de tratamento de efluentes, o processo de bioadsorção, através do uso de fungos tem se destacado. Neste processo geralmente a molécula de corante é adsorvida pela parede celular fúngica, composta por lipídeos, proteínas e principalmente polissacarídeos, os quais são frequentemente associados à bioadsorção. Sendo assim, o fungo *Paecilomyces* sp. foi avaliado quanto a capacidade bioadsorvente de seu micélio para processos de descoloração de corantes têxteis. Além disso, foi possível avaliar a relação de polissacarídeos extraídos da parede celular com o processo de bioadsorção. Entre os resultados obtidos foi observado que o crescimento e a capacidade bioadsorvente do fungo são alterados pela composição (fontes de carbono, nitrogênio e suplementação) do meio de cultivo. A biomassa micelial de *Paecilomyces* sp. com o melhor índice de bioadsorvidade foi crescida em meio contendo maltose 15 g/L e tartarato de amônio 100 mM. Cultivado nestas condições, o micélio apresentou capacidade bioadsorvente para corantes têxteis de diferentes classes e estruturas químicas, sendo que a eficiência de descoloração foi alterada com pré-tratamentos químicos, destacando-se o tratamento com NaOH que aumentou em até 43 % a eficiência de descoloração pela biomassa. Além disso, foi observado que o aumento do tempo de contato entre a biomassa micelial e a solução de corante, e o aumento na concentração de bioadsorvente proporcionam aumento na eficiência de descoloração. Porém, em diferentes concentrações de NaCl e temperaturas a eficiência de descoloração permanece inalterada. A biomassa micelial também apresentou possibilidade de reuso, pelo processo de dessorção com solução de NaOH 0,1 M. Quanto aos polissacarídeos da parede celular de *Paecilomyces* sp., foram purificadas cinco frações polissacarídicas, IHW, SFHW, RSFK2, ESFK2 e PDIK2, todas compostas por heteropolissacarídeos com diferentes proporções de manose, galactose e glucose. Dentre as frações polissacarídicas insolúveis, a fração PDIK2 proveniente da extração da fração IK2 com DMSO, apresentou eficiência de descoloração de 86 %. A mesma fração após tratamento com pronase E, manteve a eficiência de descoloração acima de 70 %, sugerindo a isenção da porção proteica da fração no processo de bioadsorção de corante. No entanto, após o tratamento com glicosidase de *Trichoderma harzianum*, a fração PDIK2 apresentou diminuição na eficiência de descoloração, sugerindo que a porção polissacarídica seja a principal envolvida na capacidade bioadsorvente do fungo.

Palavras-chave: Bioadsorção de corantes. *Paecilomyces* sp. Polissacarídeos de parede celular. Polissacarídeos de fungos filamentosos.

## ABSTRACT

The textile industry is an important sector in the Brazilian and world economy and has been growing in recent years. However, due to the complexity of their effluent disposed into water bodies, stands out as a potential contributor to environmental damage. Several environmental problems are inherent to difficulties in treating textile wastewater particularly in relation to the removal of intense color caused by the presence of dyes derived from the dyeing process of textile fibers. Among the forms used in wastewater treatment, the biosorption process using fungi has been outstanding. In this process, the dye molecule is usually adsorbed by the fungal cell wall, composed of lipids, proteins, and especially carbohydrates, which are often associated with the biosorption. Therefore, the fungus *Paecilomyces* sp. was investigated in this study about its mycelium biosorption capacity for bleaching processes of textile dyes. Moreover, it was possible to evaluate the relationship of polysaccharides extracted from the cell wall with the biosorption process. Among the results was observed that growth and biosorption capacity of the fungus are changed by the composition (sources of carbon, nitrogen and supplementation) of the culture medium. The *Paecilomyces* sp. mycelial biomass that had the best biosorption capacity was grown in medium containing maltose 15 g/L and 100 mM ammonium tartrate. Mycelium grown under these conditions showed biosorption capacity for different classes of textile dyes and chemical structures, and the efficiency of discoloration was changed by chemical pretreatments, especially with NaOH, which raised up to 43 % biomass efficiency of discoloration. Furthermore, it was observed that increasing the time of contact between the mycelial biomass and the dye solution, and the increase in the concentration of biosorbent provide increased efficiency of discoloration. However, in different concentrations of NaCl and temperatures discoloration efficiency remains unchanged. The mycelial biomass also showed possibility of reuse, by desorption process with NaOH 0.1 M. As to the cell wall polysaccharides of *Paecilomyces* sp. at least five polysaccharide fractions, IHW, SFHW, RSFK2, ESFK2 and PDIK2 all composed by heteropolysaccharides with different ratios of mannose, galactose and glucose were purified. Among the insoluble polysaccharide fractions, the fraction PDIK2 derived from extraction of fraction IK2 with DMSO showed a discoloration efficiency of 86 %. The same fraction after treatment with proteinase, kept the discoloration efficiency above 70 %, suggesting the exemption of the protein portion in the dye biosorption process. However, after treatment with the glycosidase fraction PDIK2 showed a decrease in the efficiency of discoloration, suggesting that the polysaccharide portion is engaged in the main biosorption capacity.

Key-words: Dye biosorption. *Paecilomyces* sp. Cell wall polysaccharides. Filamentous fungi polysaccharides.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR FÚNGICA EM LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS .....	13
FIGURA 2 - CEPA DE <i>Paecilomyces</i> sp. UTILIZADA NESTE ESTUDO .....	17
FIGURA 3 - (A) MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. CRESCIDO EM MEIO DE CULTIVO LIQUIDO (MMS). (B) MICÉLIO PROCESSADO .....	20
FIGURA 4 - EFEITO DAS DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE CARBONO NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIOSSORTIVA DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	35
FIGURA 5 - EFEITO DAS DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIOSSORTIVA DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	40
FIGURA 6 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DOS CULTIVOS COM CÁLCIO 0,2 M NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIOSSORTIVA DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	44
FIGURA 7 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DOS CULTIVOS COM NAG 23 Mm, NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIOSSORTIVA DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	46
FIGURA 8 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPO DE CULTIVO NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIOSSORTIVA DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	49
FIGURA 9 - EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE A DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS .....	50
FIGURA 10 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOSSORVENTE NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B PELA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	53
FIGURA 11 - EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA CAPACIDADE DE BIOSSORÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R, E VERMELHO HE3B PELA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	55
FIGURA 12 - EFEITO DO TEMPO DE CONTATO NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B PELA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	57
FIGURA 13 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B PELA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	59

FIGURA 14 - EFEITO DA TEMPERATURA NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B PELA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	61
FIGURA 15 - DESSORÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R, VERMELHO HE3B DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	63
FIGURA 16 - DESSORÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, VERMELHO HE3B E AMARELO HE4R DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp. APÓS ENSAIO DE ATIVIDADE DESCORANTE.....	64
FIGURA 17 - FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS, A PARTIR DA BIOMASSA MICELIAL DO FUNGO <i>Paecilomyces</i> sp.....	68
FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO IHW OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	70
FIGURA 19 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO SHW OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp..	71
FIGURA 20 - FRACIONAMENTO POR PRECIPITAÇÃO COM SOLUÇÃO DE FEHLING DA FRAÇÃO SHW OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	71
FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO SFHW OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp..	72
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO SFHW OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	73
FIGURA 23 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO SK2, OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp.	74
FIGURA 24 - FRACIONAMENTO POR PRECIPITAÇÃO COM SOLUÇÃO DE FEHLING DA FRAÇÃO SK2 OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	75
FIGURA 25 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RI DAS FRAÇÕES (A) SFK2, (B) RSFK2, (C) ESFK2 OBTIDAS A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	76
FIGURA 26 - ESPECTRO DE <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HSQC DA FRAÇÃO RSFK2 (A), OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp., E DETALHE DA REGIÃO ANOMÉRICA DO HSQC ACOPLADO (B) .....	77
FIGURA 27 - ESPECTRO DE <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HSQC DA FRAÇÃO ESFK2 (A), OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE <i>Paecilomyces</i> sp., E DETALHE DA REGIÃO ANOMÉRICA DO HSQC ACOPLADO (B) .....	79

FIGURA 28 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO COM DMSO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL IK2, OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA .....	80
FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO PDIK2 OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO COM DMSO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL IK2 .....	81
FIGURA 30 - ATIVIDADE DESCORANTE COM AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS INSOLÚVEIS PDIK2, SDIK2, IHW E PFK2 EXTRAÍDAS DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	82
FIGURA 31 - CAPACIDADE BIOSORTIVA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS INSOLÚVEIS PDIK2, SDIK2, IHW E PFK2 EXTRAÍDAS DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	83
FIGURA 32 - CAPACIDADE BIOSORTIVA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA INSOLÚVEL PDIK2 EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp., TRATADA COM PROTEASE (PRONASE E).....	84
FIGURA 33 - ENSAIO DE ATIVIDADE DESCORANTE COM A FRAÇÃO POLISSACARÍDICA INSOLÚVEL PDIK2, EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp., TRATADA COM PROTEASE (PRONASE E).....	84
FIGURA 34 - CAPACIDADE BIOSORTIVA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA INSOLÚVEL PDIK2, EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp., TRATADA COM GLICOSIDASE.....	86
FIGURA 35 - ENSAIO DE ATIVIDADE DESCORANTE COM A FRAÇÃO POLISSACARÍDICA INSOLÚVEL PDIK2, EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp., TRATADA COM GLICOSIDASE .....	86

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS COMPONENTES ENCONTRADOS NOS EFLUENTES DE INDÚSTRIAS TÊXTEIS .....	7
TABELA 2 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DE MÉTODOS PARA A REMOÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS .....	8
TABELA 3 - ESTRUTURAS, CLASSIFICAÇÃO E COMPRIMENTO DE ONDA ( $\lambda_{\max}$ ) DOS CORANTES TÊXTEIS UTILIZADOS PARA OS ENSAIOS DE ATIVIDADE DESCORANTE.....	18
TABELA 4 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO (mg), E DA CAPACIDADE BISSORTIVA (mg DE CORANTE ADSORVIDO EM 90 MIN POR g DE MICÉLIO SECO) E O ÍNDICE DE BISSORTIVIDADE (QUANTIDADE TOTAL DE MICÉLIO EM g MULTIPLICADO PELA QUANTIDADE DE CORANTE (mg) ADSORVIDO POR g DE MICÉLIO) DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. CULTIVADO EM DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE CARBONO .....	36
TABELA 5 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO (mg), E DA CAPACIDADE BISSORTIVA (mg/g) E ÍNDICE DE BISSORTIVIDADE (mg) DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. CULTIVADO EM DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO .....	40
TABELA 6 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO (mg), E DA CAPACIDADE BISSORTIVA (mg/g) E ÍNDICE DE BISSORTIVIDADE (mg) DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. DE CULTIVOS SUPLEMENTADOS COM CÁLCIO E RESPECTIVOS CONTROLES .....	45
TABELA 7 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO (mg), E DA CAPACIDADE BISSORTIVA (mg/g) E O ÍNDICE DE BISSORTIVIDADE (mg) DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. DE CULTIVOS SUPLEMENTADOS COM NAG E RESPECTIVOS CONTROLES .....	47
TABELA 8 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO (mg), E DA CAPACIDADE BISSORTIVA (mg/g) E O ÍNDICE DE BISSORTIVIDADE (mg) DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. CULTIVADO EM DIFERENTES TEMPOS E CONCENTRAÇÕES DE INÓCULOS .....	48
TABELA 9 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE A DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS ...	51

TABELA 10 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE AOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B.....	53
TABELA 11 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE AOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B.....	55
TABELA 12 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO EFEITO O TEMPO DE CONTATO NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE AOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B.....	58
TABELA 13 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE AOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B.....	60
TABELA 14 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE AOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B.....	61
TABELA 15 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DESSORÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	63
TABELA 16 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA BIOMASSA BRUTA DO FUNGO <i>Paecilomyces</i> sp. ....	67
TABELA 17 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	69
TABELA 18 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO IHW OBTIDA DA PAREDE CELULAR DO FUNGO <i>Paecilomyces</i> sp. ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO AQUOSA.....	70
TABELA 19 - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA INSOLÚVEL PDIK2, EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	85

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, TERMOS E ABREVIATURA

### Símbolos e termos:

$\delta$	- Deslocamento químico
Abs	- Absorbância
CI	- Colour Index
DQO	- Demanda química de oxigênio
Hz	- Hertz
J	- Constante de acoplamento
kDa	- Kilodalton
$M_w$	- Massa molecular ponderal média em peso
ppm	- Partes por milhão
qsp	- Quantidade suficiente para
rpm	- Rotações por minuto
x g	- Força centrífuga
$\alpha$	- Configuração anomérica alfa
$\beta$	- Configuração anomérica beta

### Reagentes e compostos:

$Ac_2O$	- Anidrido acético
Ara	- Arabinose
$Ca^{2+}$	- Cálcio
$CH_3I$	- Iodeto de metila
$CuSO_4$	- Sulfato de Cobre
$D_2O$	- Água deuterada
$d_6$ -DMSO	- Hexadeutério Dimetil Sulfóxido
$FeSO_4$	- Sulfato ferroso
Gal	- Galactose

Glc	-	Glucose
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	Ácido sulfúrico
HCl	-	Ácido clorídrico
HOAc	-	Ácido acético
KCl	-	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	Hidrogenofosfato de potássio
KOH	-	Hidróxido de potássio
Man	-	Manose
Me <sub>2</sub> SO	-	Dimetilsulfóxido
Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub>	-	Dimetil sulfóxido- <i>d</i> <sub>6</sub>
MgSO <sub>4</sub>	-	Sulfato de magnésio
MMS	-	Meio mínimo salino
NaCl	-	Cloreto de sódio
NAG	-	N-Acetil-Glucosamina
NaNO <sub>2</sub>	-	Nitrito de sódio
NaNO <sub>3</sub>	-	Nitrato de sódio
NaOH	-	Hidróxido de sódio
TFA	-	Ácido trifluoracético
Xyl	-	Xilose
ZnSO <sub>4</sub>	-	Sulfato de zinco

### **Métodos:**

CG-EM	-	Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa
FT-IR	-	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GLC	-	Cromatografia líquido-gasosa

- HPSEC-MALLS-RI - Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão acoplada à detecção por espalhamento de luz laser com multiângulos e índice de refração
- HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence
- RMN - Ressonância magnética nuclear
- RMN de <sup>13</sup>C - Ressonância magnética nuclear de Carbono-13

### **Sigla**

### **Fração**

- CPDIK2 - Fração PDIK2 (sem tratamento enzimático) utilizada como controle nos experimentos com protease e glicosidase
- EPDIK2 - Fração PDIK2 tratada com enzima protease (pronase E)
- ESDIK2 - Fração SDIK2 tratada com enzima protease (pronase E)
- ESFK2 - Fração alcalina solúvel após tratamento com solução de Fehling, eluída após filtração em membrana com limite de exclusão de 10 kDa
- GPDIK2 - Fração PDIK2 tratada com enzima glicosidase
- HW - Extrato aquoso bruto
- IHW - Fração insolúvel resultante do fracionamento por gelo/degelo, obtida a partir do extrato aquoso
- IK2 - Fração insolúvel a quente resultante do fracionamento por gelo/degelo obtida a partir do extrato alcalino
- K2 - Extrato alcalino bruto
- PDIK2 - Fração insolúvel em DMSO, proveniente da fração IK2
- PFK2 - Fração insolúvel após tratamento com solução de Fehling, proveniente do fracionamento do extrato alcalino
- RSFK2 - Fração solúvel após tratamento com solução de Fehling, retida na ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 10 kDa
- SDIK2 - Fração solúvel em DMSO proveniente da fração IK2
- SFHW - Fração solúvel após tratamento com solução de Fehling, proveniente do extrato aquoso a quente

- SFK2 - Fração solúvel após tratamento com solução de Fehling, proveniente do extrato alcalino
- SHW - Fração solúvel após fracionamento por gelo/degelo obtida a partir do extrato aquoso a quente
- SK2 - Fração solúvel após fracionamento por gelo/degelo obtida a partir do extrato alcalino

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL.....	4
2.2 CORANTES TÊXTEIS.....	5
2.3 CARACTERÍSTICAS E TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS.....	6
2.4 BIODSORÇÃO DE CORANTES.....	9
2.5 GÊNERO <i>Paecilomyces</i> E SUA RELAÇÃO COM PROCESSOS DE BIODSORÇÃO... 11	
2.6 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR FÚNGICA E SUA ASSOCIAÇÃO AO PROCESSO DE BIODSORÇÃO.....	12
2.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS ASCOMICETOS.....	14
2.7.1 Caracterização química de polissacarídeos do gênero <i>Paecilomyces</i> .....	15
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 MICROORGANISMO E REAGENTES.....	17
3.2 CULTIVO E OBTENÇÃO DE BIOMASSA.....	19
3.3 ATIVIDADE DESCORANTE DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	20
3.4 EFEITO DE DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA CAPACIDADE BIODSORTIVA DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	21
3.5 SUPLEMENTAÇÃO DOS CULTIVOS DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	22
3.6 EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO E CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NO CRESCIMENTO E CAPACIDADE BIODSORTIVA DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	22
3.7 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE A DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS.....	23
3.8 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIODSORVENTE. ....	23
3.9 EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	23
3.10 EFEITO DO TEMPO DE CONTATO NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	24
3.11 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL (NaCl) E DA TEMPERATURA NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	24
3.12 BIODSORÇÃO DO CORANTE DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	25
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DE CRESCIMENTO E CAPACIDADE BIODSORTIVA DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	25
3.14 ISOLAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	25
3.15 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	26
3.15.1 Extração aquosa.....	26
3.15.2 Extração alcalina.....	27
3.15.3 Extração com dimetilsulfóxido (DMSO).....	27

3.16 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	27
3.16.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo .....	28
3.16.2 Separação dos polissacarídeos solúveis em água por precipitação com solução de Fehling .....	28
3.16.3 Purificação dos polissacarídeos por ultrafiltração em membrana .....	29
3.17 TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL EM DMSO OBTIDO DE PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	29
3.18 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS ISOLADAS DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	30
3.18.1 Análise da composição monossacarídica .....	30
3.18.2 Metilação das frações polissacarídicas .....	31
3.19 ANÁLISE DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS DA FRAÇÃO EXTRAÍDA COM DMSO OBTIDA DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	31
3.20 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	32
3.20.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).....	32
3.20.2 Análises cromatográficas de exclusão estérica de alta pressão acoplada à detecção por espalhamento de luz laser com multiângulos e índice de refração (HPSEC-MALLS-RI) 32	
3.21 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	33
3.22 CAPACIDADE BISSORTIVA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS INSOLÚVEIS ISOLADAS DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	33
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>PARTE I</b> .....	34
4.1 EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA CAPACIDADE BISSORTIVA DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	34
4.1.1 Fonte de carbono.....	34
4.1.2 Fonte de nitrogênio .....	39
4.1.3 Suplementação dos cultivos de <i>Paecilomyces</i> sp. ....	43
4.1.3.1 Suplementação dos cultivos com cálcio .....	43
4.1.3.2 Suplementação dos cultivos de <i>Paecilomyces</i> sp. com N-acetil-D-glucosamina (NAG).....	45
4.2 EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO E CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NO CRESCIMENTO E CAPACIDADE BISSORTIVA DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	48
4.3 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE A DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS .....	50
4.4 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BISSORVENTE .....	52
4.5 EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	54
4.6 EFEITO DO TEMPO DE CONTATO NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	56
4.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL (NaCl) NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp .....	58
4.8 EFEITO DA TEMPERATURA NO PROCESSO DE BISSORÇÃO PELO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	60
4.9 DESSORÇÃO DO CORANTE DO MICÉLIO DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	62
<b>5 CONCLUSÕES PARTE I</b> .....	65
<b>PARTE II</b> .....	66

<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO REFERENTES À CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS CARBOIDRATOS DE PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp.</b> .....	66
6.1 EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp.....	67
6.2 PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	68
7. ANÁLISE DA CAPACIDADE BIOSORTIVA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS INSOLÚVEIS EXTRAÍDAS DA PAREDE CELULAR DE <i>Paecilomyces</i> sp. ....	82
<b>8 CONCLUSÕES PARTE II</b> .....	87
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas devido ao crescimento populacional e consequente aumento na atividade industrial, os desequilíbrios ambientais tem se tornado cada vez mais críticos.

Dentre os focos geradores de poluição ambiental, a indústria têxtil destaca-se devido à complexidade dos seus efluentes eliminados em corpos de água (KUNZ *et al.*, 2002; SOUZA; ZAMORA, 2005). As características dos efluentes têxteis, especialmente a dificuldade de remoção da cor intensa, causada pela presença de corantes oriundos dos sistemas de tingimento e acabamento (FU; ZHANG; WANG, 2011) dificultam o processo de degradação. Desta maneira, a escolha da estratégia de tratamento torna-se um fator muito importante, pois cada técnica tem suas limitações e o uso de um único processo pode ser insuficiente para a descoloração completa do efluente (SESHADRI; BISHOP; AGHA, 1994; SRINIVASAN; VIRARAGHAVAN, 2010).

Os corantes têxteis são usualmente descartados nos efluentes industriais sem tratamento adequado, e os subprodutos gerados por alguns processos de degradação são danosos ao ambiente e aos organismos vivos, prejudicando o ecossistema aquático, alterando o pH, temperatura e a penetração de luz solar, influenciando negativamente no crescimento da biota, modificando a atividade fotossintética e o regime de solubilidade dos gases neste meio (GUARATINI; ZANONI, 2000; KUNZ *et al.*, 2002).

Dentre as formas de tratamento de efluentes, o processo de biossorção por fungos vêm sendo cada vez mais estudado, pois uma ampla variedade de gêneros apresentam potencial para descoloração (ASSADI *et al.*, 2003; SADHASIVAM *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2012). Nestes processos, geralmente a molécula do corante é adsorvida pela parede celular fúngica composta por lipídeos, proteínas e principalmente polissacarídeos, os quais são frequentemente associados ao processo de biossorção (ZAPOTOCZNY *et al.*, 2007; AMBRÓSIO *et al.*, 2012).

Os polissacarídeos, constituintes majoritários da parede celular (LATGÉ, 2007; SUKHITHASRI *et al.*, 2013), variam entre os gêneros de fungos, proporção de monossacarídeos, tipo de ligações glicosídicas e número de ramificações, podendo diferir entre espécies de um mesmo gênero (DOMENECH *et al.*, 1999; SUKHITHASRI *et al.*, 2013). Sendo assim, a estrutura química de polissacarídeos vem sendo investigada, visando

diversas aplicações biotecnológicas, na medicina, e na taxonomia de fungos (CARBONERO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2013).

O gênero *Paecilomyces* tem se mostrado promissor na biossorção de íons metálicos (AUER; BRITZ; RODDICK, 1997; SLABA; DLUGONSKI, 2011) e de corantes (MIQUELANTE, 2001; TORRES *et al.*, 2011), porém, são encontrados poucos relatos na literatura evidenciando o potencial deste fungo no processo de descoloração de corantes têxteis (MIQUELANTE, 2001; TORRES *et al.*, 2011).

Com a necessidade da remoção de corantes de efluentes da indústria têxtil de forma mais eficaz, surge à busca por novos métodos de tratamento, destacando-se a biossorção por biomassa fúngica, o qual propõe versatilidade, baixo custo e maior eficiência no processo de descoloração.

Seguindo o estudo iniciado por Miquelante (2011), inserido no Grupo de Pesquisa do Laboratório de Biodegradação coordenado pelo Prof. Jaime Paba (UFPR), uma das propostas do presente trabalho foi investigar a ação do micélio de *Paecilomyces* sp. como biossorvente, avaliando a dinâmica do processo biossortivo frente a corantes têxteis e o envolvimento dos carboidratos presentes na parede celular do micélio com o processo de biossorção.

Na literatura são encontrados trabalhos que propõem o envolvimento de polissacarídeos de parede celular na biossorção, como evidenciado por Zapotoczny *et al.* (2007), Ambrósio *et al.* (2012). No entanto, inexistente a comprovação de que a ligação de corantes a sítios específicos nos carboidratos seja o principal responsável por este processo. Além disso, apesar dos progressos recentes de caracterização estrutural, a parede celular fúngica continua sendo uma estrutura que requer estudos aprofundados, tanto em termos de composição, quanto de biossíntese (LATGÉ, 2007).

Sendo assim, o estudo da dinâmica do processo de biossorção de corantes pelo isolado *Paecilomyces* sp., e o conhecimento da composição química da parede celular do micélio, principalmente em relação à presença de polissacarídeos, fornecerá informações importantes para propor o uso desta espécie como fonte adicional aos processos de descontaminação ambiental. Portanto, este estudo propõe a caracterização do micélio de *Paecilomyces* sp. como biossorvente, avaliando o processo biossortivo frente a corantes têxteis e também, a análise dos carboidratos constituintes da parede celular. Visando assim, uma possível aplicação deste fungo no processo de tratamento de efluentes industriais.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o micélio de *Paecilomyces* sp. como bioissorvente avaliando a dinâmica do processo bioissorativo frente a corantes têxteis e analisar qualitativamente e quantitativamente os carboidratos constituintes da parede celular, verificando a relação destes com o processo de bioissorção.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de carbono e nitrogênio do meio de cultivo, na capacidade bioissorativa do micélio de *Paecilomyces* sp.
- Verificar o efeito do tempo de contato, concentração de bioissorvente, temperatura e concentração de sal no processo de bioissorção de corantes têxteis;
- Analisar o efeito de tratamentos químicos na capacidade bioissorativa da biomassa micelial buscando avaliar a natureza das biomoléculas envolvidas no processo de bioissorção;
- Isolar e purificar os polissacarídeos de parede celular de *Paecilomyces* sp. e investigar a associação destes ao processo de bioissorção;

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL

A indústria têxtil desempenha um importante papel na economia brasileira, com 30 mil empresas formais gerando aproximadamente 1,7 milhões de empregos regulares responsáveis por um faturamento anual de US\$ 56,7 bilhões de dólares. O setor têxtil e de confecção brasileiro tem destaque no cenário mundial, sendo a sexta maior indústria têxtil do mundo, o segundo maior produtor de denim (brim ou *jeans*) e o terceiro na produção de malhas (ABIT, 2013).

Na indústria têxtil, durante o processo de tingimento das fibras, três etapas são consideradas de maior importância: a montagem, a fixação e o tratamento final. A montagem é a fase em que o tecido entra em contato com a solução de corante através de um banho de tingimento ou é impregnado com corantes através de forças mecânicas (processo de impressão/estamparia). A fixação tem como objetivo a reação entre o corante e o tecido, já o tratamento final envolve uma etapa de lavagem em banhos de água corrente para a retirada do excesso de corante original ou não fixado à fibra têxtil (ALCÂNTARA; DALTIM, 1996; GUARATINI; ZANONI, 2000; McMULLAN *et al.*, 2001).

A etapa de tratamento final da fibra é responsável pela liberação de cerca de 2 a 50 % do corante em águas residuais. Esta quantidade depende da classe à qual o corante pertence, sendo de 2 % para os classificados como básicos e 50 % para os reativos (O'NEILL *et al.*, 1999; McMULLAN *et al.*, 2001).

Autossuficiente na produção de algodão, o Brasil produz 9,8 bilhões de peças confeccionadas ao ano (ABIT, 2013), sendo que para o tingimento de um quilograma de algodão com corantes reativos são necessários cerca de 70 a 150 litros de água, aproximadamente 600 gramas de cloreto de sódio e de 30 a 60 gramas de corante (ALLEGRE *et al.*, 2006).

O fato de estas indústrias utilizarem elevadas quantidades de água, o baixo aproveitamento dos insumos (corantes, detergentes, engomantes, amaciantes e outros), e a dificuldade no tratamento dos resíduos gerados, faz com que sejam responsáveis por consideráveis desequilíbrios ambientais (KUNZ *et al.*, 2002; SOUZA; ZAMORA, 2005).

## 2.2 CORANTES TÊXTEIS

Corantes e pigmentos orgânicos podem ser definidos como substâncias intensamente coloridas que, quando aplicadas a um material, lhe conferem cor (ABIQUIM, 2013). Para identificar os mesmos corantes, comercializados com nomes diferentes, usa-se o *Colour Index* (CI), publicação da *American Association of Textile Chemists and Colorists* e da *British Society of Dyers and Colorists*, que contém uma lista organizada de nomes e números para designar os diversos tipos. Pelo CI, os corantes e pigmentos podem ser classificados em 26 tipos, segundo os critérios das classes químicas, e em 20 tipos de acordo com suas aplicações (ABIQUIM, 2013).

Corantes têxteis, conferem a fibra uma determinada cor sob condições preestabelecidas, reagindo ou não com o material durante o processo de tingimento. Segundo Guaratini e Zanoni (2000), estes corantes podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química ou sua fixação à fibra têxtil que pode ocorrer por meio de ligações iônicas, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e ligações covalentes.

A molécula de corante pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo (que pode ser: nitro, nitroso, azo e carbonila, além dos anéis de quinonas), que confere cor a substância, e o grupo funcional responsável pela fixação à fibra, denominado de auxocromo (que pode ser: etila, nitro, amino, sulfônico, hidroxila, metóxi, etóxi, cloro e bromo) (KUNZ *et al.*, 2002), que age como doador ou removedor de elétrons, alterando a densidade eletrônica do cromóforo e influenciando assim o comprimento de onda absorvido (ZEE, 2002). A estabilidade da molécula do corante é diretamente associada à força de ligação química dos átomos componentes dos grupos cromóforos e auxocromos (ZEE, 2002).

Ao se utilizar a estrutura química como critério, os corantes podem ser classificados em diferentes classes de cromóforos: azo, nitrofenol, nitrosfenol, triarilmetano, antraquinônico, pirimidina, vinilsulfônico e triazina, entre outros (TWARDOKUS, 2004). De acordo com o modo de aplicação do corante à fibra têxtil, eles podem ser ácidos, básicos, diretos, de enxofre, naturais, dispersos, sulfurosos, pré-metalizados e reativos, entre outros (GUARATINI; ZANONI, 2000; ABIQUIM, 2013).

A utilização destes corantes no Brasil concentra-se principalmente nos corantes reativos para fibras celulósicas, que correspondem a 57 % do mercado, seguido pelos corantes dispersos usados para fibras de poliéster, acetato e triacetato com 35 %, poliamida 3 % e acrílico 2 % (ABIQUIM, 2013). A classe de corantes, com maior número de representantes

(60 a 70 %) é a dos azóicos, por isso constituem a maior parte dos efluentes de indústrias têxteis e são os mais estudados (HUNGER, 2003; ZEE, 2002).

A principal característica dos corantes azóicos é a ligação de anéis aromáticos por grupos azo ( $-N=N-$ ) que, juntamente com as substituições sulfonadas, contribuem para sua resistência aos processos de degradação química e microbiológica (DELLAMATRICE, 2005; STOLZ, 2001). Os corantes azo (mono, di, tri, e poliazó) possuem uma complexa estrutura aromática resistente à luz, a atividade biológica, ao ozônio e a outras condições ambientais degradativas (HUNGER, 2003).

Mais de 700 mil toneladas de 10 mil tipos de corantes e pigmentos são produzidos anualmente no mundo, e o Brasil é responsável por 2,6 % dessa demanda, sendo aproximadamente 20 % dos corantes têxteis usados no país, descartados em efluentes (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

### 2.3 CARACTERÍSTICAS E TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS

Os efluentes têxteis contêm poluentes provenientes de etapas de tingimento e acabamento, bem como de outros processos. Os componentes encontrados nos efluentes têxteis são principalmente substâncias como corantes, sais, compostos orgânicos e tóxicos (TABELA 1) que devido a sua complexidade dificultam o tratamento do efluente (FU; ZHANG; WANG, 2011).

Os corantes têxteis são usualmente descartados nos efluentes industriais sem tratamento adequado, além disso, se submetidos a determinados processos químicos de tratamento podem gerar subprodutos danosos ao ambiente e aos organismos vivos, prejudicando o ecossistema aquático, interferindo no pH, temperatura e na penetração de luz solar (GUARATINI; ZANONI, 2000; ZANONI; CARNEIRO, 2001), o que altera o crescimento da biota, modifica a atividade fotossintética e o regime de solubilidade dos gases neste meio (GUARATINI; ZANONI, 2000; KUNZ *et al.*, 2002).

TABELA 1 - PRINCIPAIS COMPONENTES ENCONTRADOS NOS EFLUENTES DE INDÚSTRIAS TÊXTEIS

<b>Poluente</b>	<b>Principais substâncias</b>	<b>Processo de origem</b>
Matéria orgânica	Amidos, enzimas, gorduras, graxas, surfactantes e ácido acético	Limpeza, lavagem e tingimento
Pigmento (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).

A presença de corantes têxteis em águas residuais, além de apresentar riscos ao meio ambiente, pode causar danos à saúde humana, devido à sua toxicidade e carcinogenicidade. Isto se deve principalmente ao fato de muitos corantes serem fabricados a partir de compostos carcinogêneos como benzidina, naftaleno entre outros compostos aromáticos (BANAT *et al.*, 1996). Além disso, corantes que possuem em sua estrutura o cromóforo azo, ao serem metabolizados pelo intestino podem levar à formação de amins aromáticas, benzidinas e outros intermediários carcinogênicos (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Devido aos efeitos deletérios ao ambiente, se faz necessária a remoção dessas substâncias do efluente têxtil antes de serem lançados aos corpos receptores, por meio de tecnologias eficazes e de baixo custo.

O governo brasileiro tem adotado medidas que regulamentam o lançamento de efluentes, destacando a resolução nº 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que estabelece nos artigos 14, 15 e 16 que não é permitida a presença, em corpos de água doce das classes 1, 2 e 3, de corantes provenientes de fontes antrópicas que não sejam removíveis por processos de coagulação, sedimentação e filtração convencionais (CONAMA, 2013). Na TABELA 2 estão listados alguns métodos de tratamento de efluentes têxteis acompanhados de suas vantagens e desvantagens. Alguns destes métodos podem ser utilizados em conjunto para um processo mais eficaz

TABELA 2 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DE MÉTODOS PARA A REMOÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

<b>Processos</b>	<b>Métodos</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Coagulação/floculação	Químico-Físico	Total descoloração; reúso de água; eliminação de corantes insolúveis	Ineficiente para corantes ácidos, diretos e reativos; disposição de lodo; alto custo
Osmose reversa	Químico-Físico	Remoção de sais, corantes reativos hidrolisados e auxiliares químicos.	Grande quantidade de energia requerida para a separação
Ozonização	Químico	Total descoloração; reúso da água; aplicado no estado gasoso (não promove alteração de volume)	Alto custo; formação de aldeídos; não efetivo para corantes dispersos e insolúveis; Meia-vida curta (20 min)
Ultrafiltração	Físico	Baixa pressão	Qualidade de efluente
Flotação	Físico	Remove 90% da cor; baixo custo; compacto	Descarte do material retido
Oxidação de Fenton	Químico	Descoloração efetiva de corantes solúveis e insolúveis; baixo custo	Geração de lodo pela floculação dos reagentes e das moléculas do corante; necessidade de correção para pH ácido
Eletrólise	Químico	Total descoloração; baixo custo	Tempo de vida da espuma e do eletrodo
Fotocatálise	Químico	Remoção da cor quase completa; Desintoxicação; Não produz lodo	Somente como passo final de polimento
Adsorção	Físico	A maioria dos adsorventes são efetivos e com baixo custo; reúso de água	Alto custo de eliminação ou regeneração
Adsorção por Carvão ativado	Físico	Remoção eficiente de grande variedade de corantes	Alto custo
Nanofiltração	Físico	Separação de compostos orgânicos de baixo peso molecular e íons mono e divalentes, hidrolisados de corantes têxteis reativos	Alta pressão; acúmulo de sólidos dissolvidos.
Lodo Ativado	Biológico	Redução DQO e N.	Alto valor de DQO e N, cor e surfactantes no resíduo.
Sequência anaeróbica/aeróbica	Biológico	Redução da DQO, cor e compostos tóxicos.	Grande quantidade de cor e DQO no resíduo
Enzimas de fungos	Biológico	Alta taxa de descoloração	Possível formação de produtos tóxicos

NOTA: DQO: demanda química de oxigênio, N: nitrogênio. FONTE: (FU; VIRARAGHAVAN, 2001; ROBINSON *et al.*, 2001; FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004; LATIF *et al.*, 2010)

A problemática dos sistemas aquáticos contaminados por corantes têxteis deve-se a dificuldade de degradar estas moléculas sintéticas, o que torna a escolha da estratégia de tratamento um fator muito importante, pois cada técnica tem suas limitações e o uso de um único processo pode ser insuficiente para a descoloração completa de um efluente (SESHADRI; BISHOP; AGHA, 1994; SRINIVASAN; VIRARAGHAVAN, 2010).

Várias técnicas são utilizadas na remoção de efluentes têxteis das águas (TABELA 2). Usualmente os métodos para a remoção de cor baseiam-se em meios físicos e químicos, que incluem técnicas de coagulação/floculação, eletrocoagulação, ultrafiltração, nanofiltração, osmose reversa, ozonização, degradação, adsorção, tratamentos biológicos, entre outras (FU; VIRARAGHAVAN, 2001; LATIF *et al.*, 2010; KHANDEGAR; SAROHA, 2013).

Dentre os métodos utilizados para o tratamento de águas residuais têxteis, o tratamento biológico vem sendo uma alternativa econômica para o uso em substituição ou juntamente com métodos físico-químicos. O processo biológico utilizado com maior frequência é o sistema de lodo ativado que consiste na agitação dos efluentes, na presença de microrganismos e ar, durante o tempo necessário para metabolizar a matéria orgânica, que em seguida passa por um processo de floculação (KUNZ *et al.*, 2002). Porém, este processo apresenta a desvantagem de ser susceptível à composição do efluente, além de produzir grande volume de lodo que exige cuidados na disposição final ou tratamento (KUNZ *et al.*, 2002).

A técnica de adsorção tem sido considerada mais adequada, pela possibilidade da reutilização de águas e regeneração de muitos adsorventes após o seu uso (PRIGIONE *et al.*, 2008). Dentre os processos de adsorção, a biossorção que utiliza as propriedades da superfície de organismos (vivos ou mortos), tais como bactérias, leveduras, fungos, plantas e algas para remover diferentes tipos de poluentes orgânicos e inorgânicos de efluentes industriais, apresenta-se como um processo eficiente, de amplo espectro e baixo custo para a retirada de corantes e outros compostos de ambientes aquáticos (AKSU, 2005; CHAVES *et al.*, 2008).

#### 2.4 BIOSSORÇÃO DE CORANTES

A biossorção é 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 (ANJANEYA *et al.*, 2009).

A descoloração pela biossorção é influenciada por diversos fatores físico-químicos, como a interação corante/adsorvente, a área de superfície do adsorvente, o tamanho da partícula, a temperatura, o pH, e o tempo de contato (FU; VIRARAGHAVAN, 2001; KUMAR *et al.*, 2012; ABDALLAH; TAHA, 2012; AKAR; ARSLAN; AKAR, 2013).

Uma série de estudos tem avaliado biomateriais capazes de biossorver corantes em efluentes têxteis. Materiais biológicos obtidos de vegetais (turfa), crustáceos (quitosana), fungos (leveduras; fungos filamentosos) e bactérias são utilizados como biossorbentes para concentrar e remover corantes de solução (KUNZ *et al.*, 2002; SRINIVASAN; VIRARAGHAVAN, 2010).

Dentre os processos de biossorção, o uso de fungos no tratamento de efluentes e na remoção de corantes, tem sido cada vez mais promissor, pois a biomassa fúngica apresenta uma maior área de superfície comparada a outros microorganismos (SADHASIVAM *et al.*, 2010). Uma grande variedade de fungos apresenta potencial para processos de descoloração (FU; VIRARAGHAVAN, 2001). Dentre os gêneros que vem sendo estudados estão *Aspergillus* (FU; VIRARAGHAVAN, 2002; ABDALLAH; TAHA, 2012), *Rhizopus* (KUMARI; ABRAHAM, 2007), *Trichoderma* (SADHASIVAM *et al.*, 2010), *Cladosporium* (FAN *et al.*, 2012), *Thamnidium* (AKAR; ARSLAN; AKAR, 2013) entre outros.

Além destes, alguns fungos encontrados em ambientes marinhos, apresentam tolerância a altas concentrações de sal, o que os tornam interessantes para aplicações biotecnológicas (PANNO *et al.*, 2013), processos de biossorção e biodegradação de efluentes têxteis. Porém, estudos com fungos marinhos usados para biossorção de corantes ainda são pouco explorados. Dentre os dados presentes na literatura, Khambhaty *et al.* (2010) analisaram o potencial da biomassa do fungo marinho *Aspergillus wentii*, avaliando a capacidade biossorbente para o corante safranina. Além desta, outra espécie isolada de ambiente marinho, *Aspergillus niger*, mostrou capacidade para rápida descoloração de um efluente de indústria têxtil composto por uma mistura de corantes reativos, azo e sulfúricos (ASSADI *et al.*, 2003).

## 2.5 GÊNERO *Paecilomyces* E SUA RELAÇÃO COM PROCESSOS DE BIOSSORÇÃO

O gênero *Paecilomyces*, pertencente ao filo *Ascomycota*, inclui fungos filamentosos isolados de material vegetal e solo, que podem ser entomopatogênicos, nematófagos ou patógenos oportunistas em humanos (INGLIS; TIGANO, 2006).

Na literatura, trabalhos vêm destacando espécies de *Paecilomyces* em processos de biossorção, dentre os quais, a biossorção de íons metálicos, por linhagens de *Paecilomyces lilacinus*, que se mostraram tolerantes à altas concentrações de chumbo (AUER; BRITZ; RODDICK, 1997). Estudos desenvolvidos por Slaba e Dlugonski (2011) também confirmaram a biossorção de chumbo e zinco de áreas contaminadas, pelo micélio de *Paecilomyces marquandii*.

Com a espécie de *Paecilomyces variotii*, foi investigada a biossorção em relação à descoloração de efluentes da indústria de papel, caracterizado por altos níveis de lignina e coloração marrom escuro. Neste estudo, *Paecilomyces variotii* apresentou uma adesão dos compostos do efluente em seu micélio e em aproximadamente 24 h descoloriu 72 % do efluente, caracterizando assim, um processo de descoloração por biossorção (CALVO; GALLETI; GONZÁLEZ, 1995).

Em relação à biossorção de corantes, recentemente Torres *et al.* (2011) em um estudo com 26 cepas de fungos marinhos mostraram a estirpe *Paecilomyces* sp. (EMF4), como sendo eficiente na descoloração completa do corante têxtil catiônico cristal violeta, atribuindo esta descoloração a presença de enzimas lignolíticas e também a capacidade de biossorção do corante pelo micélio fúngico.

Miquelante (2011), em pesquisa coordenada pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Biodegradação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, analisou 52 espécimes de fungos halotolerantes, destacando 11 como promissoras em processos de biossorção, dentre as quais uma estirpe de *Paecilomyces* sp., que após 15 dias de incubação com os corantes azul reativo 220 (RB220) (monoazo/antraquinona), vermelho reativo 195 (monoazo) e amarelo reativo 135 (azóico) apresentou eficiência de descoloração pela biomassa fúngica maior que 70 %. Além disso, em um ensaio de atividade descolorante em 90 min de contato a biomassa de *Paecilomyces* sp. apresentou eficiência de descoloração de 25 % para o corante RB220. Neste estudo, utilizando biomassa autoclavada, o autor excluiu a participação de enzimas lignolíticas pela ausência de atividade metabólica no mecanismo de

eliminação da cor, apresentando a biossorção como único mecanismo empregado por este fungo para o processo de remoção de corantes.

Apesar destes estudos, ainda são limitadas as informações sobre o potencial deste fungo na descoloração de corantes têxteis (MIQUELANTE, 2011; TORRES *et al.*, 2011), e sobre o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção do micélio (BAE *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2003), e inexistem dados sobre o efeito de pré-tratamentos químicos na capacidade biossortiva e dinâmica de biossorção em geral. Além disso, as biomoléculas associadas ao processo de biossorção precisam ser avaliadas.

## 2.6 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR FÚNGICA E SUA ASSOCIAÇÃO AO PROCESSO DE BIOSSORÇÃO

O reino fungi compreende aproximadamente 1,5 milhões de espécies, as quais possuem diferentes polissacarídeos que podem apresentar atividades biológicas e propriedades químicas com potencial para aplicações comerciais (SILVA *et al.*, 2008).

A parede celular compreende cerca de 20-30 % do peso seco da célula fúngica, sendo sua composição química bastante complexa e constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos. Quitina, glucanas, galactomananas e proteínas são os compostos mais frequentes (ADAMS, 2004; SUKHITHASRI *et al.*, 2013). A composição química, estrutura e tamanho variam consideravelmente, dependendo das condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial, sendo a sua formação coordenada com o ciclo celular (KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006). Além disso, a composição da parede celular varia entre fungos filamentosos, leveduras (FIGURA 1), entre espécies de fungos e até mesmo entre suas linhagens (SUKHITHASRI *et al.*, 2013).

Aproximadamente 90 % da parede celular é composta por polissacarídeos (LATGÉ, 2007). Dentre estes, as glucanas são os mais comuns constituindo aproximadamente 50-60 % do peso seco da parede celular. As glucanas são formadas de unidades de glucose e apresentam geralmente estruturas lineares, com diferentes disposições de suas ligações glicosídicas, pertencentes à configuração  $\alpha$  ou  $\beta$ . As  $\beta$ -glucanas são a forma predominante, podendo estar livres ou associadas a proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos presentes na parede (BOWMANN; FREE, 2006).

De acordo com Leung *et al.* (2006) e Latgé (2007) em quase todos os fungos a parede celular é composta por  $\beta$ -glucanas (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas, associadas a quitina por uma ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). A quitina, por sua vez é um homopolímero linear formado por unidades de N-acetilglucosamina  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas, que compreende cerca de 10 a 20 % da parede celular de fungos filamentosos. Essas estruturas suportam grandes pressões tornando-se responsáveis pela integridade da parede celular. Quando a síntese da quitina é interrompida, a parede celular torna-se desorganizada e a célula fúngica sofre deformações e instabilidade osmótica (BOWMANN; FREE, 2006).

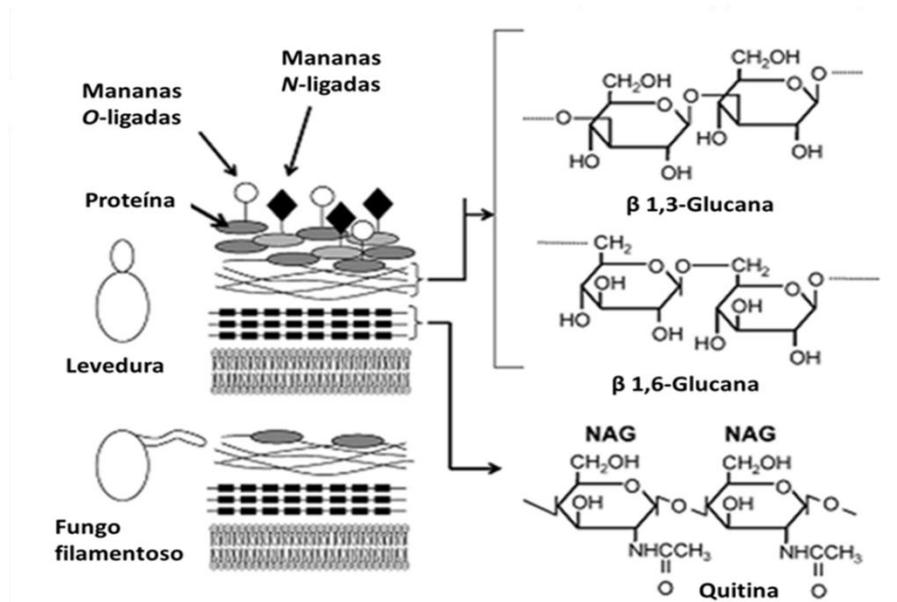


FIGURA 1 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR FÚNGICA EM LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS

NOTA: A parede celular é composta por quitina (polímeros de N-acetilglucosamina  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-ligados) e glucanas (polímeros de glicose  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-ligados). Proteínas manosiladas estão presentes na parede celular de leveduras, mas ausentes em fungos filamentosos. FONTE: Sukhithasri *et al.* (2013).

Devido à parede celular ser composta por uma elevada quantidade de polissacarídeos, estas moléculas são frequentemente associadas à capacidade de biossorção dos fungos, sendo que no processo de biossorção de íons metálicos como o cobre, ocorre a incorporação deste, no complexo quitina-glucana presente na parede das células fúngicas, pela formação de ligações coordenadas de átomos de nitrogênio e oxigênio com grupos amida e hidroxila do polissacarídeo (ZAPOTOCZNY *et al.*, 2007).

Métodos físicos como a autoclavagem do micélio, ou químicos (NaOH, Ca<sup>2+</sup>, formaldeído) usados como pré-tratamento da biomassa fúngica podem aumentar a capacidade de biossorção de corantes por removerem proteínas e causarem rupturas na parede celular,

deixando assim, sítios de ligação às moléculas de corante mais expostos (FU; VIRARAGHAVAN, 2002; MUNRO *et al.*, 2007; ABDALLA; TAHA, 2012).

## 2.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS ASCOMICETOS

Os polissacarídeos são biopolímeros produzidos pelos organismos vivos, que exibem diferentes tipos de estruturas químicas, funções fisiológicas e aplicações (RODRIGUES *et al.*, 2011). A composição e a estrutura química dos polissacarídeos de parede celular variam entre espécies de microrganismos. Sendo assim, com base nos resultados provenientes da caracterização química dessas macromoléculas, alguns autores propõem a sua utilização como marcadores para a classificação taxonômica de fungos filamentosos, leveduras e líquens (TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1995; CARBONERO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2013). Além de aplicações medicinais como antioxidantes, antimutagênicos, anticoagulantes, antitrombóticos e imunomoduladores (FREIMUND *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; CHEN; SEVIOUR, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2011; NIE *et al.*, 2013).

Diferentes composições monossacarídicas podem ser encontradas entre os polissacarídeos de fungos ascomicetos. Silva *et al.* (2013) analisando a composição monossacarídica da parede celular do fungo *Verticillium lecanii* extraída com álcali encontraram glc, gal, man, e fuc nas proporções de 20:10:2:1 a partir de hidrólise ácida com TFA 4 M, e determinaram a estrutura do polissacarídeo de parede através de análises por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), ressonância magnética nuclear (RMN) e também por metilação. O polissacarídeo é composta de cadeia principal formada por unidades de  $\beta$ -D-galactofuranose (1 $\rightarrow$ 6) ligadas substituídas em O-2 por terminais não redutores de  $\alpha$ -glucose ou cadeias laterais de  $\alpha$ -galactose (1 $\rightarrow$ 6) ligadas a  $\alpha$ -glucose.

Em alguns fungos ascomicetos como *Lecanicillium musccarium*, *Beauveria bassiana* e *Cordyceps sphingum*, também são encontradas heterogalactomananas na parede celular, sendo que todas as estruturas apresentaram cadeias principais de  $\alpha$ -D-manopirranose (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas e proporções de man e gal 1:1. *Lecanicillium musccarium* apresentou polissacarídeos compostos por man, gal e ácido glucurônico na proporção 10:6:1 detectados por cromatografia líquido-gasosa (GLC) (BERNABÉ *et al.*, 2011).

Em um estudo com o fungo ascomiceto *Cordyceps militaris*, Smiderle *et al.* (2013) a partir de extração com KOH 5 %, obtiveram uma fração polissacarídica homogênea composta pelos monossacarídeos man (56,7 %), gal (34,5 %) e glc (8,8 %). A partir das análises espectroscópicas e químicas, os autores puderam sugerir a estrutura de glucogalactomanana presente na fração estudada, composta por uma cadeia principal de  $\alpha$ -D-manopiranosose (1 $\rightarrow$ 2)-ligada, a qual pode ser substituída por fragmentos de  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)-ligada ou  $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 2)-ligada, apresentando unidades de  $\alpha$ -D-Manp,  $\alpha$ -D-Galp,  $\alpha$ -D-Galf ou  $\beta$ -D-Galf como terminais não redutores.

### 2.7.1 Caracterização química de polissacarídeos do gênero *Paecilomyces*

Considerando que os polissacarídeos estruturais da parede celular são as moléculas mais frequentemente associadas à capacidade bioassortiva de fungos, o conhecimento da sua estrutura é de fundamental importância.

Domenech *et al.* (1994) buscando diferenciar as espécies de *Paecilomyces* das espécies de *Penicillium spp.* e gêneros afins, analisaram a parede celular de quatro cepas de *Paecilomyces variotii* quanto a sua composição polissacarídica, encontrando uma  $\alpha$ -glucana, cuja cadeia principal é (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (32,2 a 39,1 %) e por um complexo de  $\beta$ -glucana-quitina (42,7 a 47,3 %), nas frações obtidas por extração alcalina com NaOH. Enquanto que a fração solúvel em água se mostrou composta por D-manose (13,4 a 32,4 %), D-galactose (24,3 a 41,8 %) e D-glucose (10,1 a 24,7 %). Após purificação esta fração mostrou-se composta por unidades de Manp (1 $\rightarrow$ 6)-e (1 $\rightarrow$ 2,6)-ligadas, Galf (1 $\rightarrow$ 5) e (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas, além de terminais não redutores de Glcp e Galf.

Em outro trabalho, Domenech *et al.* (1996) obtiveram uma glucogalactomanana extraída com álcali (NaOH) da parede celular de *Paecilomyces fumosoroseus* e *Paecilomyces farinosus* apresentando cadeia principal de  $\alpha$ -manopiranosose, 4-O-substituída (70 %) por unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosose ou  $\beta$ -D-galactopiranosose, outra possibilidade sugerida, menos provável, uma cadeia de  $\beta$ -D-manofuranose (1 $\rightarrow$ 6)-ligada, ramificada em O-5, e com pontos de ramificação em O-2 das unidades de manopiranosose (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas. As proporções de monossacarídeos encontrados na análise por GLC foram de man (28,5-53,0 %), gal (8,3-31,6 %) e glc (17,7-38,1 %).

Posteriormente, em outro estudo, também visando o uso destes polissacarídeos como marcadores quimiotaxonômicos, Domenech *et al.* (1999) analisaram a estrutura da parede celular de *Paecilomyces variotii* e algumas espécies de gêneros relacionados. Neste estudo, a análise dos polissacarídeos por GLC, mostrou serem compostos de man (23-45 %), gal (16-43 %), e glc (3-9 %) e as análises dos derivados metilados e das análises por RMN demonstraram que a estrutura do polissacarídeo consiste em uma cadeia principal de  $\alpha$ -D-manopirranose (1 $\rightarrow$ 6)-ligada, parcialmente substituída em O-2 por cadeias de galactofuranose e cadeias curtas de manopirranose, sendo que diferenças no comprimento da cadeia e tipos de ramificações foram utilizadas para diferenciação entre as espécies.

Exopolissacarídeos produzidos pelo fungo *Paecilomyces* sp. têm sido estudados, apresentando estruturas de  $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas, com substituições de frutofuranana  $\beta$ -(4 $\rightarrow$ ) e  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ ) (LILLO, 2007). Já estudos com *Paecilomyces tenuipes* mostraram uma estrutura formada por uma cadeia principal de  $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 6)-ligada com cadeias laterais de  $\beta$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas e de  $\beta$ -D-Gal (2 $\rightarrow$ 6)-ligadas (LU *et al.*, 2007).

Apesar de já serem encontrados estudos de caracterização de polissacarídeos do gênero *Paecilomyces*, sabe-se que dependendo da espécie do fungo, da composição do meio de cultivo, da fração da parede celular analisada e de acordo com o método de extração é possível encontrar um perfil estrutural diferente destes polissacarídeos (DOMENECH *et al.*, 1999). Além de contribuir para a classificação taxonômica, estes compostos também podem ser úteis para aplicações biotecnológicas, dentre as quais a bioissorção.

Nos fungos, os polissacarídeos de parede celular são alterados quantitativamente e qualitativamente de acordo com a fonte de carbono e nitrogênio, diferentes condições de pH, temperatura e aeração a que as culturas são submetidas (AGUILAR-USCANGA; FRANÇOIS, 2003). Além disso, a capacidade de bioissorção pelo micélio também pode ser alterada, razão pela qual neste estudo algumas condições de cultivo e fontes de nutrientes para *Paecilomyces* sp. foram testadas, buscando um aumento na quantidade de biomassa produzida e na eficiência do processo de descoloração de corantes têxteis.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MICROORGANISMO E REAGENTES

Os experimentos foram realizados com a estirpe de *Paecilomyces* sp. (FIGURA 2), coletada do sedimento superficial de um manguezal localizado na Baía das Laranjeiras (Complexo Estuarino de Paranaguá, Litoral do Estado do Paraná, Brasil) (MIQUELANTE, 2011), e mantida no laboratório de Biodegradação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

Para manter a cultura, o repique do fungo foi feito a cada 3 meses, inoculando-o em meio de cultura mínimo salino (MMS), contendo (por litro de água destilada): 10 g de glucose; 6 g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{KCl}$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,01 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 15 g de ágar (para os cultivos em meio sólido) e 24 g de sal sintético marinho em pH 5,6. Para os experimentos, o fungo foi repicado de MMS sólido para líquido e incubado durante 15 dias a 28 °C (em ausência de luz). O MMS líquido foi utilizado como meio de cultura padrão.



FIGURA 2 - CEPA DE *Paecilomyces* sp. UTILIZADA NESTE ESTUDO

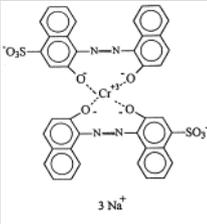
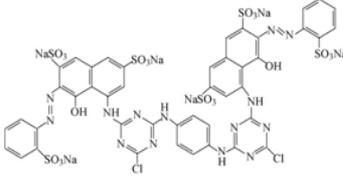
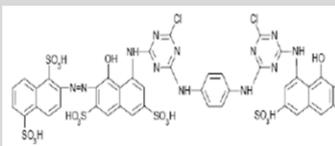
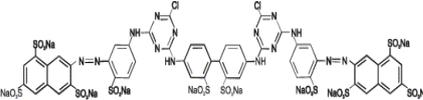
FONTE: O autor (2014)

Os corantes utilizados neste estudo foram fornecidos pelas empresas Siderquímica S/A, sediada em São José dos Pinhais (Paraná – BR), DyStar (São Paulo) e CHT/Bezema, filial de Blumenau-SC.

Para o uso, os corantes foram diluídos em água destilada, sendo a concentração variável de acordo com o experimento. Os corantes listados na tabela 3 foram utilizados para ensaios de atividade descorante.

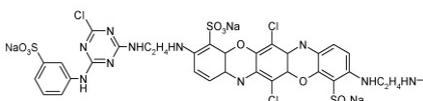
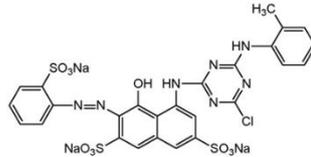
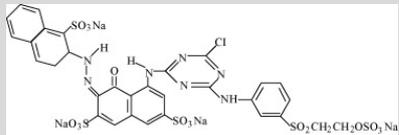
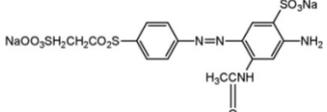
O corante remazol azul (C.I. *Reactive Blue 220*) foi utilizado como corante padrão em todos os experimentos. Este corante foi fornecido pela empresa DYSTAR e em sua ficha técnica é designado Azul Brilhante Remazol BB 133 %. Quanto ao modo de aplicação é classificado como corante reativo, apresenta em sua estrutura um complexo de cobre e formazana e grupamento azo como cromóforo. Contém em torno de 4 % de cobre no complexo, nitrogênio passível de liberação que pode contribuir para a eutrofização e fosfatos em compostos orgânicos fosforados (NIEBISCH, 2009).

TABELA 3 - ESTRUTURAS, CLASSIFICAÇÃO E COMPRIMENTO DE ONDA ( $\lambda_{\max}$ ) DOS CORANTES TÊXTEIS UTILIZADOS PARA OS ENSAIOS DE ATIVIDADE DESCORANTE

Nome Comercial	Nome C.I.	Sigla	$\lambda_{\max}$ (nm)	Classificação modo de aplicação/ Química	Estrutura
Preto CR 150	Acid Black 194	AB194	590	Ácido/ pré-metalizado	n.d.
Azul marinho CRD 150	Acid Blue 193	AB193	580	Ácido/ pré-metalizado	
Vermelho HE 3B	Reactive Red 120	RR120	540	Reativo/ diazo, clorotriazina	
Vermelho HE7B	Reactive Red 141	RR141	520	Reativo/ diazo	
Amarelo HE4R	Reactive Yellow 84	RY84	420	Reativo/ diazo	

Continua pág. 19

Conclusão Tabela 3

Nome Comercial	Nome C.I.	Sigla	$\lambda_{\max}$ (nm)	Classificação modo de aplicação/ Química	Estrutura
Amarelo HE6G	Reactive Yellow 135	RY135	400	Reativo/ azo	n.d.
Azul HE GX 145	Reactive Blue 198	RB198	620	Reativo/ monoazo, clorotriazina	
Azul Brillhante BB	Reactive Blue 220	RB220	600	Reativo/ Vinilsulfona, antraquinona, monoazo	n.d.
Vermelho RB	Reactive Red 198	RR198	520	Reativo/ azo, vinilsulfona	
Vermelho BF 3SR	Reactive Red 195	RR195	540	Reativo/ monoazo	
Amarelo ouro RNL 150	Reactive Yellow 107	RY107	420	Reativo/ monoazo	

NOTA: n.d.: não disponível; FONTE: modificado de Niebisch (2012).

### 3.2 CULTIVO E OBTENÇÃO DE BIOMASSA

Para os experimentos o fungo foi cultivado em réplicas contendo 5 mL de meio mínimo salino líquido (MMS), sendo cada réplica inoculada com suspensão de esporos na concentração de  $3 \times 10^4$  esporos por mL, mantidas a 28 °C (em ausência de luz), sem agitação por 15 dias.

Para o uso da biomassa fúngica (FIGURA 3A) em todos os experimentos, após o cultivo nas condições determinadas, o micélio foi retirado do meio de cultivo, lavado 2 x com água destilada, seguido de centrifugação (centrifuga MDC-2000 HT), por 5 min a 6.160 x g.

Em seguida, o micélio foi autoclavado a 120 °C por 20 min, para inativação das enzimas, seco em estufa a 50 °C até peso constante, macerado com auxílio de um pistilo e passado em peneiras granulométricas de 250 µm para uniformizar o tamanho das partículas. Ao final destas etapas o micélio foi denominado como processado (FIGURA 3B).

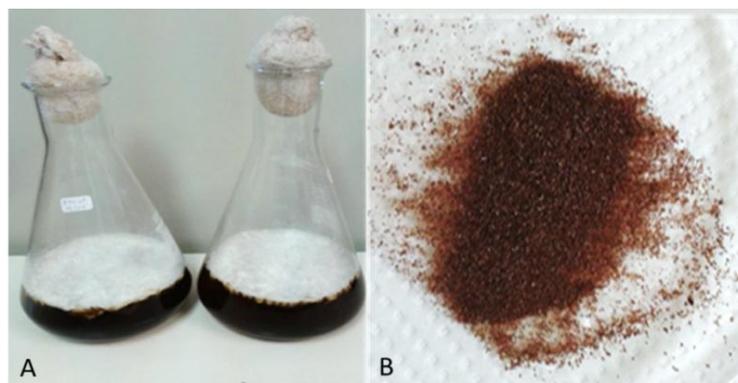


FIGURA 3 – (A) MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. CRESCIDO EM MEIO DE CULTIVO LIQUIDO (MMS). (B) MICÉLIO APÓS SER PROCESSADO  
FONTE: O autor (2014)

### 3.3 ATIVIDADE DESCORANTE DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

O teste de atividade descorante determina a capacidade biossorbitiva da biomassa micelial seca (quantidade de corante em miligramas (mg) removido por grama (g) de micélio seco em um intervalo de tempo). Para isso, o micélio processado (quantidade variável de acordo com o experimento) foi misturado em uma solução do corante na concentração de 100 mg/L e tampão fosfato a 50 mM, pH 7,0, e colocado em agitação a 170 rpm durante 90 min (agitador Certomat mod. 886031).

A porcentagem de descoloração foi determinada através da diminuição da absorbância no comprimento de onda de cada corante em relação à amostra controle (meio padrão, porém sem inóculo). Este ensaio foi aplicado para todas as variáveis de todos os experimentos realizados sempre em triplicata. Para cada teste de atividade descorante foi feita uma curva padrão em triplicata com o corante utilizado, nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 mg/L.

O monitoramento da eficiência de descoloração (%) nos experimentos foi determinado através da diminuição da absorbância no comprimento de onda máximo para cada corante em relação à amostra controle (mesma concentração de corante, mas sem biomassa) em

espectrofotômetro Genesys (G10-S UV-VIS Thermo Scientific). A eficiência de descoloração foi expressa em termo de percentual de remoção de corante, o qual foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de descoloração \%} = \frac{(\text{Abs } 0) - (\text{Abs } t)}{(\text{Abs } 0)} \times 100$$

na qual Abs 0 é a absorbância no tempo zero (ou amostra controle) e Abs t é a absorbância no tempo avaliado.

#### 3.4 EFEITO DE DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA CAPACIDADE BIOSORTIVA DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

O efeito de diferentes concentrações e fontes de carbono e nitrogênio foi avaliado no crescimento (rendimento por peso seco) e na capacidade bioassortiva do micélio.

Foram avaliadas oito fontes de carbono (glucose, frutose, galactose, glicerol, sacarose, maltose, amido e celulose) em quatro concentrações (1, 5, 10 e 15 g/L) e fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, uréia, cloreto de amônia, tartarato de amônia e oxalato de amônia) nas concentrações de 20, 60 e 100 mM. Inicialmente foi analisada a fonte de carbono e em seguida, o efeito do nitrogênio em relação à produção de biomassa e capacidade bioassortiva.

As amostras foram inoculadas com uma concentração de  $3 \times 10^4$  esporos por mL e cultivadas em MMS líquido, sem agitação a 28 °C (em ausência de luz). A composição do MMS foi modificada em relação à fonte e concentração de carbono e nitrogênio. Após o período de cultivo (15 dias) a biomassa micelial foi coletada e processada para o experimento de atividade decolorante. O corante azul RB220 foi utilizado para estes experimentos na concentração de 100 mg/L.

### 3.5 SUPLEMENTAÇÃO DOS CULTIVOS DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

As culturas de *Paecilomyces* sp., após serem definidas as fontes e concentrações de carbono e nitrogênio, foram suplementadas com N-acetilglucosamina (NAG) (Sigma-Aldrich), na concentração de 23 mM, que segundo Bulik (2003) induz a expansão da parede celular fúngica. O NAG foi adicionado as réplicas de 5 mL, juntamente com o meio de cultivo (MMS líquido) que foi inoculado com uma concentração de  $3 \times 10^4$  esporos por mL.

Após o crescimento do fungo por 15 dias, foi determinado o peso seco e a biomassa foi processada, sendo utilizado 1,5 mg de micélio processado para o ensaio de atividade descorante com o corante azul RB220 na concentração de 100 mg/L.

Os cultivos de *Paecilomyces* sp. também foram suplementados com cálcio 0,2 M, o qual foi adicionado as réplicas de 5mL após sete dias de cultivo para evitar que o cálcio inibisse o crescimento inicial do fungo (MUNRO *et al.*, 2007). Após ser determinado o peso seco, a biomassa foi processada, sendo utilizado 1,5 mg de micélio processado para o ensaio de atividade descorante com solução do corante azul RB220 na concentração de 100 mg/L.

### 3.6 EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO E CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NO CRESCIMENTO E CAPACIDADE BIOSORTIVA DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

Para avaliar o efeito do tempo de cultivo em relação ao crescimento micelial e sua capacidade biosortiva, foi feito um ensaio coletando o micélio das réplicas de 5 mL após 5, 10 e 15 dias de crescimento. Neste ensaio também foi avaliado o crescimento do micélio e sua capacidade biosortiva em relação a duas concentrações de inóculo distintas, sendo  $3 \times 10^5$  para as amostras A e  $3 \times 10^4$  esporos por mL para as amostras B (TABELA 8, pág. 48).

### 3.7 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE A DIFERENTES CORANTES

Para avaliar a capacidade bioassortiva do micélio processado de *Paecilomyces* sp. frente a diferentes corantes, foi realizado um ensaio de atividade descorante utilizando-se 2 mg de micélio processado, tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, corantes na concentração de 100 mM (TABELA 3, pág. 18), e agitação de 170 rpm durante 90 min de contato.

### 3.8 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOSSORVENTE

Após serem otimizadas as condições de produção de biomassa, o efeito da concentração de biomassa micelial no processo de bioassorção foi analisado em um ensaio de atividade descorante. Para o ensaio foram utilizadas soluções dos corantes preto CR150, vermelho HE3B, amarelo HE4R e azul RB220 (TABELA 3, pág. 18) na concentração de 100 mg/L e concentrações de biomassa micelial de 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10 g/L de solução de corante.

### 3.9 EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

A influência de tratamentos químicos na biomassa processada foi analisada buscando melhorar o potencial desta na bioassorção de corantes. Para isso, foram utilizados 3 mg da biomassa processada, adicionando-se 1 mL do reagente químico (NaOH, NaCl, HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) na concentração de 0,1 M, deixando em agitação de 150 rpm por 1 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 6.160 x g e a biomassa lavada três vezes com água destilada e uma vez com tampão fosfato 50 mM para retirar o excesso de reagente, centrifugando após cada lavagem. O micélio tratado foi utilizado para fazer o ensaio de atividade descorante com os corantes (Azul RB220, preto CR150, amarelo HE4R, e vermelho

HE3B). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e os valores médios utilizados na análise de dados pelo programa estatístico JMP-Stater.

### 3.10 EFEITO DO TEMPO DE CONTATO NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

Outro fator que possui forte influência na capacidade de remoção do corante pela biomassa é o tempo de contato do bioissorvente com a solução (SADHASIVAM *et al.*, 2009). Levando isto em consideração, foi testado o efeito do tempo de contato entre o micélio e as soluções de corantes em tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 150 min. Para este ensaio foram utilizados 3 mg de biomassa tratada com NaOH 0,1 M por 1 h em agitação de 150 rpm. Quatro corantes (azul RB220, preto CR150, amarelo HE4R, vermelho HE3B) foram usados na concentração de 100 mg/L. O experimento foi realizado em triplicata sendo analisada a absorvância de cada corante, em cada tempo, em um ensaio de atividade descorante.

### 3.11 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL (NaCl) E DA TEMPERATURA NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

A eficiência de descoloração do micélio de *Paecilomyces* sp. foi avaliada para os corantes azul RB220, preto CR150, amarelo HE4R, vermelho HE3B na concentração de 100 mg/L, em diferentes condições de temperatura e concentrações de sal (NaCl), em ensaios de atividade descorante independentes.

As temperaturas foram testadas na faixa entre 10 °C a 50 °C, com intervalos de 10 °C (KAUSHIK; MALIK, 2010), sendo as amostras colocadas em um agitador (incubadora refrigerada com agitação, mod. TE-421 Tecnal), durante 90 min, com agitação de 170 rpm, para cada temperatura testada.

As concentrações de NaCl testadas foram de 10, 20, 40, 60 e 80 g/L, em seguida, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro na absorvância de cada corante conforme descrito na TABELA 3, pág. 18.

### 3.12 DESSORÇÃO DO CORANTE DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

A dessorção do corante da biomassa micelial, buscando avaliar seu reuso nos processos de descoloração foi avaliada pela exposição a diferentes tratamentos. As biomassas carregadas com os corantes: azul RB220, preto CR150, amarelo HE4R e vermelho HE3B (TABELA 3, pág. 18) na concentração de 100 mg/L, foram lavadas 3 vezes com água destilada para a remoção do corante não adsorvido, sendo em seguida colocadas em solução com NaOH 0,1 M, NaOH 1 M ou água destilada (controle) em agitação de 170 rpm durante 1 h (ZHOU; BANKS, 1993). A quantidade de corante dessorvido (mg) foi determinada por espectrofotometria na absorbância de cada corante (TABELA 3, pág. 18).

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DE CRESCIMENTO E CAPACIDADE BIOSORTIVA DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

Todos os experimentos referentes à capacidade biosortiva e o crescimento da biomassa micelial foram realizados em quadruplicata, e os experimentos de eficiência de descoloração (%) realizados em triplicata, tanto para as amostras, quanto para os controles. Os valores de atividade descorante, e de biomassa seca, apresentados neste trabalho são médias dos resultados (de três ou quatro amostras) com desvio padrão da média das amostras.

Os dados foram analisados através do programa Graphpad Prism (versão 5.0) pela análise de variância (teste ANOVA) seguido da aplicação do teste Tukey com nível de significância de 5 %, ou seja, as diferenças entre as variáveis de cada tratamento foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os dados também foram analisados pelo programa JMP-Starter aplicando o teste ANOVA e Tukey também com nível de significância de 5 %.

### 3.14 ISOLAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

Após o cultivo do fungo durante 10 dias, utilizando as fontes de carbono, nitrogênio (maltose 15 g/L com tartarato de amônia 100 mM), definidas como melhores para a relação produção de biomassa e capacidade biossorbitiva, a biomassa foi retirada da cultura e lavada exaustivamente com água destilada para a remoção dos exopolissacarídeos produzidos e dos açúcares adicionados ao meio de cultivo. O procedimento de lavagem foi repetido até que a água de lavagem apresentasse resultado negativo na dosagem de carboidratos totais (DUBOIS, 1956). Após, a biomassa foi congelada e liofilizada obtendo-se 15,3 g de biomassa seca (Liofilizador Thermo electron Corporation – Freezer Dryer).

### 3.15 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

#### 3.15.1 Extração aquosa

A biomassa seca de *Paecilomyces* sp. (15,3 g) foi macerada e submetida à extração aquosa exaustiva sob refluxo em banho fervente (~ 98 °C) por 4 h. Após, o sobrenadante foi filtrado ainda quente e centrifugado a 12.000 x g (Centrifuga Hitachi Himac CR21E), por 20 min a 10 °C. Este processo foi repetido por mais seis vezes, até apresentar resultado negativo na dosagem de carboidratos totais (DUBOIS, 1956) sendo os extratos obtidos, reunidos e concentrados por rotaevaporação. O extrato aquoso foi precipitado com 3 volumes de etanol, centrifugado a 12.000 x g por 20 min a 5 °C, dialisado contra água corrente em membrana de 6-8 kDa (*Seamless, semi-permeable, regenerated cellulose dialysis tubing- Spectra/Por®*) por 24 h, congelado e liofilizado, gerando o extrato aquoso a quente HW.

### 3.15.2 Extração alcalina

O resíduo proveniente das extrações aquosas foi submetido a cinco extrações alcalinas sequenciais exaustivas, até apresentar resultado negativo na dosagem de carboidratos totais (DUBOIS, 1956). As extrações foram feitas com hidróxido de potássio (KOH) 2 M na presença de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), por 4 h, sob refluxo, em banho fervente ( $\sim 98^\circ\text{C}$ ). Os extratos foram filtrados ainda quentes e neutralizados com ácido acético. Em seguida, os extratos foram reunidos e dialisados contra água corrente, em membrana de 6-8 kDa por 24 h. Após, o extrato foi congelado e liofilizado, gerando o extrato alcalino K2.

### 3.15.3 Extração com dimetilsulfóxido (DMSO)

O resíduo insolúvel IK2 (1,57 g), proveniente da extração alcalina com KOH 2 M, foi novamente extraído com solução de DMSO por 1 h, na temperatura de  $60^\circ\text{C}$ . Após este período a fração foi centrifugada por 20 min a  $12.000 \times g$ , sendo separado o sobrenadante e o precipitado e dialisados separadamente em membrana de 6-8 kDa em água corrente por 24 h.

As frações foram congeladas e liofilizadas gerando a fração solúvel em DMSO SDIK2 (0,58 g) e a fração insolúvel em DMSO, PDIK2 (0,58 g). Esta foi posteriormente utilizada em um ensaio de atividade descorante com o corante Azul RB220 na concentração de 100 mg/L.

## 3.16 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

As frações correspondentes aos extratos aquoso (HW) e alcalino (K2) foram submetidas a passos sequenciais de purificação, de acordo com as metodologias descritas a seguir.

### 3.16.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo

Os extratos aquoso (HW) e alcalino (K2) foram primeiramente submetidos ao processo de purificação por congelamento e degelo descrito por Gorin e Iacomini (1984). HW e K2 foram solubilizadas em água destilada, sob aquecimento de 40 °C e agitação em agitador magnético por 30 min, congeladas e em seguida submetidas ao degelo à temperatura ambiente. Esse processo foi repetido por 3 vezes, sendo que as frações insolúveis em água fria foram separadas dos demais componentes solúveis por centrifugação a 12.000 x g, 5 °C por 20 min. Este procedimento foi repetido em todas as frações, até que os sobrenadantes não formassem mais precipitados.

As frações solúveis foram separadas sendo que os precipitados também foram novamente submetidos ao processo de congelamento e degelo com a finalidade de retirar completamente possíveis compostos solúveis contaminantes da amostra. Os materiais foram congelados e liofilizados, originando as frações sobrenadantes de congelamento e degelo (SHW e SK2), e as frações referentes ao precipitado do congelamento e degelo (IHW e IK2).

### 3.16.2 Separação dos polissacarídeos solúveis em água por precipitação com solução de Fehling

Os sobrenadantes do processo de congelamento e degelo, SHW e SK2 foram submetidos ao tratamento com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução consiste da combinação de duas soluções (A e B). A solução A é composta por tartarato de potássio e KOH (173 g + 125 g / H<sub>2</sub>O q.s.p. 500 ml, respectivamente), enquanto que a solução B consiste de CuSO<sub>4</sub> 5.H<sub>2</sub>O (55,7 g / H<sub>2</sub>O q.s.p 500 ml).

As frações polissacarídicas solúveis em água foram adicionadas à solução de Fehling, sendo a mistura vigorosamente agitada e deixada em repouso a 4 °C por 4 h. Após, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, 10 °C por 20 min. Em seguida, tanto a fração solúvel, quanto o complexo cúprico insolúvel foram neutralizadas com ácido acético e dialisados contra água corrente. Após a diálise, as frações polissacarídicas foram deionizadas com resina catiônica fortemente ácida e novamente dialisadas, concentradas, congeladas e liofilizadas calculando-se o rendimento. O tratamento com solução de Fehling para a fração

HW gerou uma fração solúvel em Fehling denominada SFHW, não gerando fração insolúvel, e o mesmo tratamento para a fração SK2 gerou uma fração solúvel em Fehling SFK2 e um complexo cúprico insolúvel PFK2.

### 3.16.3 Purificação dos polissacarídeos por ultrafiltração em membrana

A fração SFK2 heterogênea (pela técnica de HPSEC-MALLS-RI), proveniente do tratamento com solução de Fehling foi submetida à ultrafiltração em membrana de celulose regenerada com limite de exclusão de 10 kDa (Millipore), originando uma fração retida (RSFK2) e outra eluída (ESFK2). A ultrafiltração foi realizada por um sistema de filtração (modelo 16249, Sartorius) acoplado a um cilindro de ar comprimido (CARBONERO, 2005).

## 3.17 TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA FRAÇÃO PDIK2 EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

A fração PDIK2 obtida a partir da extração com DMSO foi submetida a um tratamento para a clivagem de ligações peptídicas com a protease Pronase E (obtida de *Streptomyces griseus*, Sigma) que contém uma mistura de proteases com pelo menos três atividades proteolíticas, incluindo uma serina-protease extracelular que exibe uma vasta gama de especificidades de substrato. A digestão pela Pronase E degrada facilmente triptofano, serina, treonina, asparagina e glutamina.

As amostras foram dissolvidas (2,5 % p/v) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 e a enzima (1 % p/p) foi adicionada. As misturas foram incubadas a 37 °C, por 24 h. Após o período de incubação a enzima foi inativada (80 °C por 20 min), e a fração PDIK2 tratada com Pronase E (EPDIK2) foi lavada 3 vezes com água destilada para a retirada da enzima. Na sequência, foi realizado o ensaio de atividade decolorante com o corante azul RB220 na concentração de 100 mg/L.

A fração PDIK2 também foi tratada com uma enzima, para a clivagem das ligações glicosídicas com uma glicosidase de *Trichoderma harzianum* (*Lysing Enzymes from*

*Trichoderma harzianum*, Sigma), a qual contém uma mistura de  $\beta$ -glucanase, celulase, protease, e quitinase.

As amostras foram incubadas com 25  $\mu\text{g/mL}$  de enzima, em tampão acetato 50 mM, pH 5,0, por 12 h a 30 °C. Posteriormente a fração PDIK2 tratada com glicosidase (GPDIK2) foi lavada 3 vezes com água destilada, sendo submetidas ao ensaio de atividade decolorante com o corante azul RB220 na concentração de 100 mg/L.

### 3.18 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS ISOLADAS DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

#### 3.18.1 Análise da composição monossacarídica

A determinação da composição de monossacarídeos neutros foi realizada após hidrólise ácida total de uma alíquota (1 mg) dos polissacarídeos com TFA 1 M (ácido trifluoroacético) por 15 h a 100 °C (SILVA *et al.*, 1993). Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado das amostras hidrolisadas por evaporação, até secar em temperatura ambiente. O material resultante foi solubilizado em 100  $\mu\text{L}$  de água e submetido à conversão para alditóis a partir da redução com  $\text{NaBH}_4$  em pH alcalino, por 16 h, a temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963a, 1963b). Após este período, o material foi neutralizado com ácido acético concentrado, seco e lavado 3 vezes com metanol concentrado. Após, os derivados alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) e piridina (1:1, v/v) a 100 °C por 30 min, formando os acetatos de alditóis. O processo foi interrompido com a adição de água e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio. A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida com sucessivas lavagens com solução de sulfato de cobre 5 % e água (SILVA *et al.*, 1993; SASSAKI; GORIN; IACOMINI, 2001). Após remoção total da piridina, os acetatos de alditóis produzidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

Para a hidrólise da biomassa bruta foi utilizado  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72 % a 100 °C, por 15 h (TABELA 9, pág.63) sendo os acetatos de alditóis produzidos, analisados por CG-EM.

### 3.18.2 Metilação das frações polissacarídicas

A fração polissacarídica insolúvel IHW (5 mg) foi metilada pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). Primeiramente os polissacarídeos foram solubilizados (1 %, p/v) em dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ). Após solubilização, foi adicionada soda pilada seca (4:1 NaOH:carboidrato). A solução foi mantida sob agitação e, então, foi adicionado iodeto de metila ( $\text{CH}_3\text{I}$ ), na proporção  $\text{CH}_3\text{I/Soda pilada/carboidrato}$  (1:200:50). Após 24 h, um novo ciclo de metilação foi iniciado, onde novamente foi adicionado  $\text{Me}_2\text{SO}$  e  $\text{CH}_3\text{I}$  para ressolubilização do material, o qual foi deixado em agitação por 24 h. Após este período, foi adicionada água para solubilização do material, e as amostras foram neutralizadas com ácido acético concentrado ( $\text{HOAc}$ ), dialisadas exaustivamente contra água corrente em membrana de 2 KDa (*Standard grade regenerated cellulose dialysis membrane - Spectra/Por®*), e liofilizada.

Para a hidrólise da fração metilada, foram testados os tempos de 8, 10 e 12 h, utilizando 1 mg da fração, 1 mL de ácido fórmico 45 % a 100 °C. Após evaporar o ácido em temperatura ambiente, foi colocado 100  $\mu\text{L}$  de água destilada e  $\text{NaBH}_4$  em pH alcalino, por 6 h, a temperatura ambiente para a redução. Posteriormente a amostra foi neutralizada e liofilizada. Após, os derivados alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de 100  $\mu\text{L}$  de piridina e 100  $\mu\text{L}$  de anidrido acético por 30 min em estufa a 100 °C. O processo foi interrompido com a adição de água e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio. A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida com sucessivas lavagens com solução de sulfato de cobre 5 % e água. Após remoção total da piridina, os acetatos de alditóis produzidos foram analisados por CG-EM.

### 3.19 ANÁLISE DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS COM DMSO OBTIDAS DE PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

Uma alíquota (1 mg) das frações EPDIK2 e PDIK2 foram hidrolisadas com uma solução de HCl 6 M com 1 % de fenol, a 100 °C, por 24 h. Após evaporação do ácido, os hidrolisados foram dissolvidos em uma solução metanólica (200  $\mu\text{L}$ ; 1,5:8,5, v/v) contendo 0,6 M de HCl e 0,1 % de fenol (v/v), e aquecido por 15 min, a 100 °C. Após seco, os

derivados obtidos foram acetilados com anidrido acético (100  $\mu$ l), metanol (50  $\mu$ l) e piridina (50  $\mu$ l), por 1 h, a 100 °C. Esses derivados foram então analisados por CG-EM, sendo as fragmentações de massa obtidas identificadas após comparação com padrões de aminoácidos (SASSAKI *et al.*, 2008).

### 3.20 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

#### 3.20.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

Para essas análises foi utilizado cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa Saturn, modelo 4000, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i.) modelo DB-225. A temperatura inicial foi de 50 °C, aumentando gradativamente (fluxo de 40 °C por minuto) até atingir 220 °C, temperatura de análise dos acetatos de alditóis. A temperatura permaneceu constante durante o tempo de análise (25 min). O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo de 1 mL/min. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração com o software Varian WS, e os fragmentos de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, cujos valores podem ser visualizados no espectro de massas. A análise foi feita por meio da comparação entre os tempos de retenção e perfis de fragmentação das amostras e dos padrões (SLONEKER, 1972; SASSAKI *et al.*, 2005).

#### 3.20.2 Análises cromatográficas de exclusão estérica de alta pressão acoplada à detecção por espalhamento de luz laser com multiângulos e índice de refração (HPSEC-MALLS-RI)

As frações das amostras contendo polissacarídeos solúveis (HW, SHW, SK2, SFHW, SFK2, RSFK2, ESFK2, PFK2) foram submetidas à análise por HPSEC-MALLS-RI/UV para determinar sua homogeneidade (WYATT, 1993). As amostras foram solubilizadas em nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 0,1 mol/L contendo azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) 0,2 g/L para uma concentração final de 1 mg/mL, sendo filtrada através de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,22  $\mu$ m. Em seguida, injetada no cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão

(HPSEC), 100  $\mu$ L de amostra com fluxo de 0,6 mL/min. O cromatógrafo é equipado com detector de índice de refração diferencial (RI), modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz laser com multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação ultrahidrogel WATERS em série, com limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$  g/mol. Para a interpretação dos dados foi utilizado o software ASTRA versão 4.70.07 (WYATT, 1993).

### 3.21 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As frações de polissacarídeos foram solubilizadas em óxido de deutério ( $D_2O$ ) para as frações solúveis ou dimetil sulfóxido- $d_6$  ( $Me_2SO-d_6$ ) para as frações insolúveis em água, e as análises efetuadas em tubos de 5 mm de diâmetro. As determinações de RMN foram realizadas nos equipamentos Bruker Avance III 600 MHz, com probe QXI 5 mm e espectrômetro Bruker, modelo Avance DRX-400, acoplado a um transformador Fourier, com ressonância de  $^1H$  e  $^{13}C$  de 400 e 100 MHz, respectivamente, utilizando as temperaturas de 50 e 70 °C. Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em  $D_2O$  foram expressos em  $\delta$  (ppm) relativos aos sinais de  $^{13}C$  e  $^1H$  da acetona em  $\delta$  30,20 e 2,22, respectivamente, e aos sinais do  $Me_2SO-d_6$  em  $\delta$  39,70 ( $^{13}C$ ) e 2,40 ( $^1H$ ), para as amostras solúveis no mesmo.

### 3.22 CAPACIDADE BIOSORTIVA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS INSOLÚVEIS ISOLADAS DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

Para avaliar a capacidade biosortiva das frações polissacarídicas insolúveis foram utilizadas 4 frações (PDIK2, SDIK2, IHW E PFK2), utilizando 2 mg de cada fração em 1 mL de solução do corante azul RB220 a 100 mg/L e tampão fosfato a 50 mM, submetidos a agitação de 170 rpm por 90 min. Após esse período, a absorvância do corante em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm foi avaliada.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho foram divididos em duas partes, facilitando a compreensão do leitor. Na parte I estarão descritos os resultados referentes à dinâmica do processo biossortivo pelo micélio de *Paecilomyces* sp., e na parte II estarão os resultados e discussões referentes a caracterização de carboidratos da parede celular do fungo.

### PARTE I

#### 4.1 EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA CAPACIDADE BIOSSORTIVA DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

##### 4.1.1 Fonte de carbono

Buscando avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de carbono no crescimento e na capacidade biossortiva da biomassa micelial de *Paecilomyces* sp. foram testadas diferentes fontes de carbono (glucose, frutose, galactose, glicerol, sacarose, maltose, amido e celulose) em diferentes concentrações (1, 5, 10 e 15 g/L) (FIGURA 4, TABELA 4). Estas fontes de carbono e concentrações são geralmente utilizadas para o crescimento de diferentes espécies de fungos, sendo que cada espécie se comporta diferentemente em relação aos nutrientes disponíveis no meio de cultivo (AGUILAR-USCANGA; FRANÇOIS, 2003).

Analisando o crescimento do fungo em cada fonte de carbono separadamente (FIGURA 4), quanto maior a concentração de carbono disponível no meio de cultivo, maior a produção de biomassa. A concentração de 15 g/L promoveu o maior crescimento em relação as outras concentrações (1, 5 e 10 g/L) (FIGURA 4).

Para todas as fontes, com exceção das fontes de carbono galactose e glicerol, onde as concentrações de 10 e 15 g/L não apresentaram diferença significativa (TABELA 4). A fonte de carbono maltose na concentração de 15 g/L apresentou um aumento no crescimento micelial de 1,16 vezes em relação a concentração de 10 g/L.

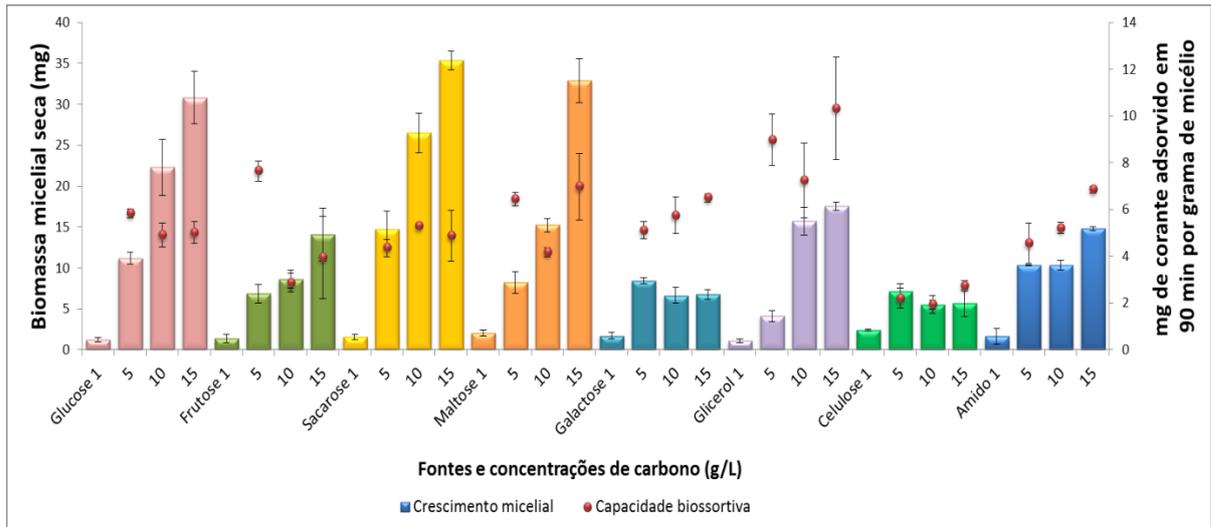


FIGURA 4 - EFEITO DAS DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE CARBONO NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIODISSORTIVA DA BIOMASSA MICELIAL DE *Paecilomyces* sp. NOTA: O corante azul RB220 (100 mg/L) foi utilizado para avaliar a capacidade bioassortiva do micélio. Nitrato de sódio 70 mM foi utilizado como fonte de N. FONTE: O autor (2014)

No geral, dentre as fontes de carbono testadas, a maior biomassa obtida foi de 35,3 mg, na presença de sacarose a 15 g/L, seguido de maltose 15 g/L (32,9 mg) e glucose 15 g/L (30,8 mg). O crescimento micelial obtido na presença de glucose a 10 g/L, utilizada como fonte de carbono padrão no crescimento de fungos, foi de 22,3 mg e a capacidade bioassortiva 4,9 mg/g, resultados próximos aos obtidos por Miquelante (2011) para *Paecilomyces* sp4, crescido nas mesmas condições do ensaio realizado neste trabalho, que obteve 18 mg de biomassa seca e 5,0 mg de corante removidos por grama de micélio.

Bae *et al.* (2001), avaliando o efeito das fontes de carbono maltose e sacarose no crescimento micelial e produção de exopolímeros para o fungo *Paecilomyces japonica*, ressaltaram que estas duas fontes de carbono são ideais para o crescimento de *P. japonica* não apresentando diferenças significativas na quantidade de biomassa produzida. Porém, o micélio cultivado em cada uma das fontes de carbono desenvolveu uma morfologia diferente, apresentando o micélio crescido em maltose, uma superfície mais compacta em relação ao micélio crescido em sacarose, além de ser formado em agregados.

Xu *et al.* (2003) em um estudo com *Paecilomyces tenuipes* avaliaram o crescimento micelial em seis diferentes fontes de carbono. O maior crescimento foi obtido nos cultivos com glucose 10 g/L (8,6 g/L de biomassa seca).

TABELA 4 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO (mg), E DA CAPACIDADE BIOSORTIVA (mg DE CORANTE ADSORVIDO EM 90 MIN POR g DE MICÉLIO SECO) E O ÍNDICE DE BIOSORTIVIDADE (QUANTIDADE TOTAL DE MICÉLIO EM g MULTIPLICADO PELA QUANTIDADE DE CORANTE (mg) ADSORVIDO POR g DE MICÉLIO) DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. CULTIVADO EM DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE CARBONO

Fonte de Carbono e concentração (g/L)	Biomassa micelial seca (mg)	Capacidade biosortiva (mg/g)	Índice de biosortividade (mg)
Glucose 1	1,2 ± 0,2 <sup>aN</sup>	ND	ND
Glucose 5	11,2 ± 0,7 <sup>bFGH</sup>	5,8 ± 0,1 <sup>aCDEFGH</sup>	0,07
Glucose 10	22,3 ± 3,4 <sup>cD</sup>	4,9 ± 0,5 <sup>bEFGHIJ</sup>	0,11
Glucose 15	30,8 ± 3,2 <sup>dB</sup>	5,0 ± 0,4 <sup>bEFGHI</sup>	0,16
Frutose 1	1,3 ± 0,4 <sup>aN</sup>	ND	ND
Frutose 5	6,8 ± 1,1 <sup>bIJK</sup>	7,6 ± 0,4 <sup>aBC</sup>	0,05
Frutose 10	8,6 ± 1,1 <sup>bHIJ</sup>	2,8 ± 0,3 <sup>bIJKL</sup>	0,03
Frutose 15	14,0 ± 3,2 <sup>cEFG</sup>	3,9 ± 1,7 <sup>bHIJKL</sup>	0,06
Sacarose 1	1,5 ± 0,3 <sup>aN</sup>	ND	ND
Sacarose 5	14,7 ± 2,1 <sup>bEF</sup>	4,3 ± 0,3 <sup>aGHIJK</sup>	0,06
Sacarose 10	26,5 ± 2,4 <sup>cC</sup>	5,3 ± 0,4 <sup>aCDEFG</sup>	0,14
Sacarose 15	35,3 ± 1,1 <sup>dA</sup>	4,8 ± 1,0 <sup>aDEFGHIJ</sup>	0,17
Maltose 1	2,0 ± 0,3 <sup>aLMN</sup>	ND	ND
Maltose 5	8,2 ± 1,3 <sup>bHIJ</sup>	6,4 ± 0,2 <sup>aCDEFG</sup>	0,05
Maltose 10	15,2 ± 0,8 <sup>cE</sup>	4,1 ± 0,2 <sup>bHIJK</sup>	0,06
Maltose 15	32,9 ± 2,6 <sup>dAB</sup>	6,9 ± 1,4 <sup>aBCDE</sup>	<b>0,24</b>
Galactose 1	1,7 ± 0,4 <sup>aMN</sup>	ND	ND
Galactose 5	8,4 ± 0,3 <sup>bHIJ</sup>	5,1 ± 0,3 <sup>bCDEFGHI</sup>	0,04
Galactose 10	6,6 ± 0,9 <sup>cIJK</sup>	5,7 ± 0,7 <sup>abCDEFG</sup>	0,04
Galactose 15	6,7 ± 0,6 <sup>cIJK</sup>	6,4 ± 0,1 <sup>aCDEFG</sup>	0,04
Glicerol 1	1,1 ± 0,3 <sup>aN</sup>	ND	ND
Glicerol 5	4,1 ± 0,6 <sup>bKLMN</sup>	8,9 ± 1,0 <sup>aAB</sup>	0,04
Glicerol 10	15,7 ± 1,6 <sup>cE</sup>	7,2 ± 1,5 <sup>aBCD</sup>	0,11
Glicerol 15	17,5 ± 0,5 <sup>cE</sup>	10,3 ± 2,1 <sup>aA</sup>	<b>0,18</b>
Celulose 1	2,4 ± 0,1 <sup>aLMN</sup>	ND	ND
Celulose 5	7,1 ± 0,9 <sup>bIJK</sup>	2,2 ± 0,4 <sup>abKL</sup>	0,02

Continua pág. 37

Conclusão Tabela 4

Fonte de Carbono e concentração (g/L)	Biomassa micelial seca (mg)	Capacidade bioassortiva (mg/g)	Índice de bioassortividade (mg)
Celulose 10	5,5 ± 1,0 <sup>bJKLM</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>bL</sup>	0,01
Celulose 15	5,7 ± 1,6 <sup>bJKL</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>aJKL</sup>	0,02
Amido 1	1,6 ± 0,9 <sup>aAB</sup>	ND	ND
Amido 5	10,3 ± 0,5 <sup>bGHI</sup>	4,5 ± 0,8 <sup>bFGHIJK</sup>	0,05
Amido 10	10,3 ± 0,5 <sup>bGHI</sup>	5,2 ± 0,2 <sup>bDEFGH</sup>	0,05
Amido 15	14,8 ± 0,2 <sup>cEF</sup>	6,8 ± 0,1 <sup>aBCDEF</sup>	0,10

NOTA: ND: fungos inoculados nas fontes de carbono com concentrações de 1g/L cresceram pouco e não foi possível recuperar material após o processamento, não sendo possível o ensaio de atividade descolorante. As letras representam as análises estatísticas pelo programa JMP-Starter com nível de significância de 5%. Letras minúsculas são comparações entre as concentrações de uma mesma fonte de C., e letras maiúsculas são comparações entre todas as fontes de C. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

Para a análise da capacidade bioassortiva foram utilizados 1,5 mg de biomassa processada do fungo *Paecilomyces* sp., sendo o ensaio de atividade descolorante realizado com o corante Azul RB220 na concentração de 100 mg/L.

A capacidade bioassortiva do fungo cultivado em meios de cultivo com diferentes fontes de carbono, em geral, não apresentou aumento de bioassorção em relação ao aumento na concentração de carboidrato disponível no meio, de acordo com as análises estatísticas pelo programa JMP-Starter com nível de significância de 5 % (TABELA 4). A capacidade bioassortiva foi variável para cada fonte de carbono e concentração, sendo a maior capacidade bioassortiva da biomassa cultivada observada no meio com glicerol 15 g/L (10,3 mg/g), seguido de glicerol 5 g/L (8,9 mg/g) e frutose 5 g/L (7,6 mg/g).

Em um estudo do potencial de descoloração do corante reativo preto HFGR pelo fungo ascomiceto *Aspergillus sulphureus*, Kumar *et al.* (2012) obtiveram uma maior descoloração pelo fungo crescido em meio com sacarose (93 %), seguido de glucose (85,3 %) e frutose (78,7 %).

Uma espécie de *Aspergillus ninger* isolada de ambiente marinho, mostrou um aumento no potencial de descoloração de efluente têxtil quando cultivado em meio com sacarose, em relação a outras fontes de carbono. Para este fungo, com o aumento da concentração de sacarose presente no meio de 0,5 g/L para 12,5 g/L foi mensurado um aumento na descoloração do efluente de 93,6 % para 96,2 % (ASSADI *et al.*, 2003).

Miquelante (2011) obteve para os fungos ascomicetos isolados de ambiente marinho: *Acremonium* sp3, um aumento de 91 % na bioadsorção quando crescido em meio com maltose 10 g/L em relação ao fungo crescido com glucose 10 g/L, e para o fungo *Trichoderma* sp3 a capacidade bioadsorvente foi maior pela biomassa cultivada com frutose 10 g/L (15 mg/g), seguido de amido 10 g/L (14,9 mg) de corante bioadsorvido por grama de biomassa. Neste estudo, o resultado obtido por Miquelante (2011) para ambos os fungos, mostrou que o aumento crescente da concentração da fonte de carbono não estava relacionado com o aumento da capacidade bioadsorvente.

Como nem sempre a fonte de carbono que determina o melhor crescimento da biomassa é a mais favorável à capacidade bioadsorvente do micélio, foram selecionadas para os testes com fontes e concentrações de nitrogênio duas fontes de carbono que apresentaram resultados diferentes no experimento de fonte de carbono: maltose 15 g/L e glicerol 15 g/L. O meio contendo maltose 15 g/L produziu uma das maiores quantidades de biomassa seca (32,9 mg), porém apenas 6,9 mg/g de corante foi removido no ensaio de atividade descolorante. Já com o meio contendo glicerol 15 g/L foi obtida uma menor quantidade biomassa seca (17,5 mg), porém com melhor capacidade bioadsorvente, sendo 10,3 mg de corante removido por grama de biomassa micelial seca.

Sendo assim, foi necessário estabelecer um **índice de bioadsorvidade** (TABELA 4, pág. 36), que se refere à quantidade total de micélio seco em gramas multiplicado pela quantidade de corante em miligramas adsorvido por grama de micélio, e representa a relação entre o crescimento micelial e sua capacidade bioadsorvente (MIQUELANTE, 2011). Desta maneira, foi possível estabelecer um meio de cultivo favorável, tanto para o crescimento, quanto para o aumento da capacidade bioadsorvente do fungo. As fontes de carbono, maltose 15 g/L e glicerol 15 g/L, selecionadas para o experimento de fonte de nitrogênio apresentaram os melhores índices de bioadsorvidade, sendo 0,24 e 0,18 mg, respectivamente (TABELA 4, pág. 36).

De acordo com Ene *et al.* (2012), em um estudo com o fungo ascomiceto *Candida albicans*, diferentes fontes de carbono promovem uma remodelação da parede celular afetando processos relacionados com a superfície das células.

#### 4.1.2 Fonte de nitrogênio

Para cada fonte de carbono selecionada (maltose 15 g/L e glicerol 15 g/L), foram testadas diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, uréia, cloreto de amônio, tartarato de amônio e oxalato de amônio) em três concentrações distintas, sendo 20, 60 e 100 mM (que podem ser utilizadas para o crescimento de diferentes espécies de fungos), buscando analisar o efeito da fonte e da concentração de nitrogênio no crescimento e na capacidade biossortiva da biomassa micelial de *Paecilomyces* sp.

Os cultivos realizados avaliando as diferentes fontes de nitrogênio apresentaram diferentes comportamentos, tanto para o crescimento micelial, quanto para a capacidade biossortiva.

Em geral, as concentrações de 60 e 100 mM de cada fonte de nitrogênio, tanto para os cultivos com fonte de carbono maltose 15 g/L quanto glicerol 15 g/L, não apresentaram diferenças estatísticas significativas no crescimento (FIGURA 5, TABELA 5), com exceção das culturas realizadas em nitrato de sódio e glicerol, nitrato de sódio e maltose, e as realizadas em oxalato de amônio e maltose que mantiveram o crescimento independente da concentração de nitrogênio disponível. As fontes de nitrogênio na concentração de 20 mM mostraram um menor crescimento na maioria dos cultivos, com exceção dos cultivos com uréia e glicerol, oxalato de amônio e glicerol e cloreto de amônio e maltose, o que permite supor que altas concentrações destas fontes possam inibir o crescimento do fungo.

Entre todas as fontes de nutrientes analisadas, o cultivo com oxalato de amônio 100 mM e maltose 15 g/L apresentou a maior quantidade de biomassa sendo 40,1 mg, seguido por tartarato de amônio 100 mM e maltose 15 g/L com 33,0 mg (TABELA 5).

Em um estudo com *Paecilomyces tenuipes*, Xu *et al.* (2003), avaliaram o crescimento do fungo em sete fontes de nitrogênio diferentes, sendo o maior crescimento do micélio observado nos cultivos com peptona (13,2 g/L) e triptona (13,9 g/L).

Para a análise da capacidade biossortiva foram utilizados 1,5 mg de biomassa processada do fungo *Paecilomyces* sp., sendo o ensaio de atividade descorante realizado com o corante Azul RB 220 na concentração de 100 mg/L.

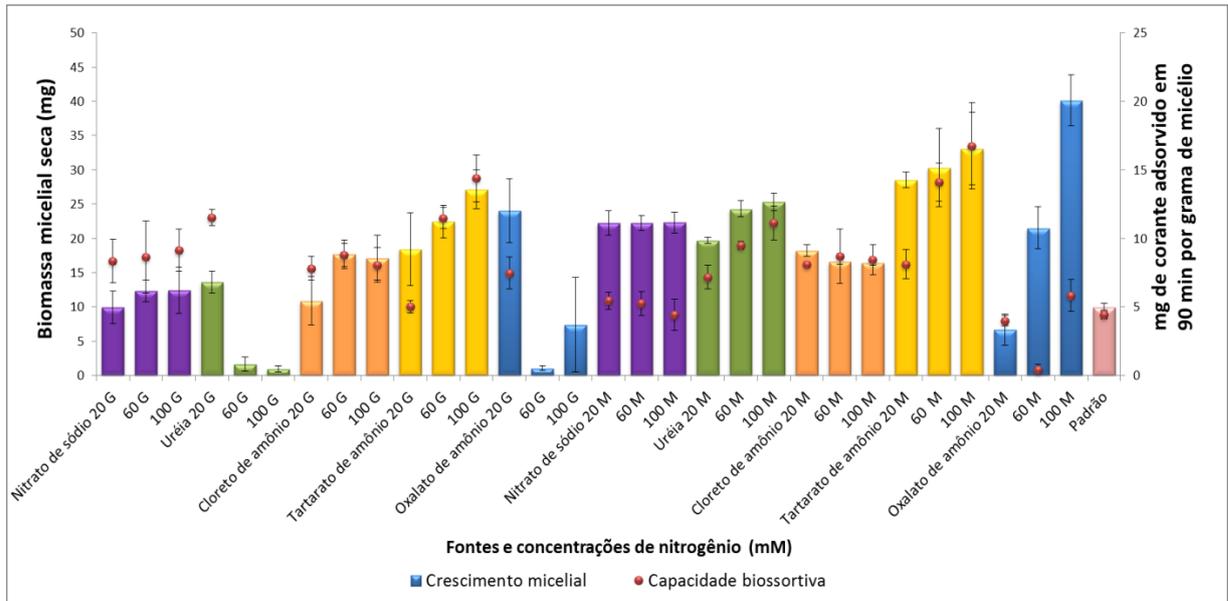


FIGURA 5 - EFEITO DAS DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIODSORTIVA DA BIOMASSA MICELIAL DE *Paecilomyces* sp. NOTA: O corante azul RB220 (100 mg/L) foi utilizado para avaliar a capacidade bioadsorvente do micélio. A letra G representa os cultivos com a fonte de carbono glicerol 15 g/L e M corresponde a maltose 15 g/L.

Em relação à capacidade bioadsorvente, as biomassas cultivadas com nitrato de sódio e cloreto de amônio não apresentaram diferença significativa nas diferentes concentrações, já as biomassas provenientes dos meios contendo ureia 20 mM com maltose 15 g/L e tartarato de amônio 20 mM com maltose 15 g/L, apresentaram uma melhor capacidade bioadsorvente, com o aumento da concentração de nitrogênio disponível para 60 e 100 mM (FIGURA 5).

A capacidade bioadsorvente do micélio foi maior, quando a fonte de nitrogênio tartarato de amônio 100 mM foi combinada com maltose 15 g/L (16,7 mg/g), seguido pelo micélio proveniente do meio de cultivo com tartarato de amônio 100 mM e glicerol 15 g/L (14,3 mg/g) e tartarato de amônio 60 mM e maltose 15 g/L, com 14,0 mg de corante adsorvido por grama de micélio (TABELA 5).

Em um trabalho com o fungo ascomiceto *Aspergillus fumigatus* XC6 Jin *et al.* (2007) observaram que a adição das fontes de nitrogênio cloreto de amônio e sulfato de amônio no meio de cultivo aumentaram a bioadsorção de corantes reativos presentes em um efluente têxtil, sugerindo que o amônio é uma fonte de nitrogênio que favorece a descoloração de corantes têxteis comparado com outras fontes como peptona e nitrato de potássio.

TABELA 5 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO (mg), E DA CAPACIDADE BISSORTIVA (mg/g) E ÍNDICE DE BISSORTIVIDADE (mg) DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. CULTIVADO EM DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO

Fonte de Nitrogênio (mM) com Glicerol 15g/L (G) e Maltose 15g/L (M) e concentração (mM)	Biomassa micelial seca (mg)	Capacidade bioassortiva (mg/g)	Índice de bioassortividade (mg)
Nitrato de sódio 20 (G)	9,9 ± 2,3 <sup>aJKL</sup>	8,3 ± 1,5 <sup>aCDEFGHI</sup>	0,08
Nitrato de sódio 60 (G)	12,4 ± 1,5 <sup>aHIJKL</sup>	8,6 ± 2,6 <sup>aCDEFGH</sup>	0,10
Nitrato de sódio 100 (G)	12,4 ± 3,3 <sup>aHIJKL</sup>	9,1 ± 1,5 <sup>aCDEF</sup>	0,11
Uréia 20 (G)	13,6 ± 1,5 <sup>aHIJKL</sup>	11,5 ± 0,5 <sup>BC</sup>	0,16
Uréia 60 (G)	1,6 ± 1,0 <sup>bM</sup>	ND	ND
Uréia 100 (G)	0,9 ± 0,4 <sup>bM</sup>	ND	ND
Cloreto de amônio 20 (G)	10,9 ± 3,5 <sup>bFGHI</sup>	7,8 ± 0,8 <sup>aDEFGHIJ</sup>	0,08
Cloreto de amônio 60 (G)	17,6 ± 2,0 <sup>aFGHI</sup>	8,7 ± 0,8 <sup>aCDEFG</sup>	0,16
Cloreto de amônio 100 (G)	17,1 ± 3,2 <sup>aFGHIJ</sup>	8,0 ± 1,2 <sup>aCDEFGHI</sup>	0,14
Tartarato de amônio 20 (G)	18,4 ± 5,3 <sup>bFGHI</sup>	5,0 ± 0,4 <sup>cIJK</sup>	0,09
Tartarato de amônio 60 (G)	22,4 ± 2,4 <sup>abDEFG</sup>	11,4 ± 0,7 <sup>bBC</sup>	0,26
Tartarato de amônio 100 (G)	27,1 ± 2,8 <sup>aBCDE</sup>	14,3 ± 1,7 <sup>aAB</sup>	0,39
Oxalato de amônio 20 (G)	24,0 ± 4,6 <sup>aCDEFG</sup>	7,4 ± 1,1 <sup>DEFGHIJK</sup>	0,18
Oxalato de amônio 60 (G)	1,0 ± 0,3 <sup>bM</sup>	ND	ND
Oxalato de amônio 100 (G)	7,4 ± 6,9 <sup>bKLM</sup>	ND	ND
Nitrato de sódio 20 (M)	22,2 ± 1,7 <sup>aDEFG</sup>	5,4 ± 0,6 <sup>aGHIJK</sup>	0,12
Nitrato de sódio 60 (M)	22,2 ± 1,1 <sup>aDEFG</sup>	5,2 ± 0,8 <sup>aHIJK</sup>	0,12
Nitrato de sódio 100 (M)	22,3 ± 1,5 <sup>aDEFG</sup>	4,4 ± 1,1 <sup>aJK</sup>	0,10
Uréia 20 (M)	19,7 ± 0,4 <sup>bEFGH</sup>	7,1 ± 0,8 <sup>bEFGHIJK</sup>	0,14
Uréia 60 (M)	24,3 ± 1,1 <sup>aCDEF</sup>	9,5 ± 0,2 <sup>aCDE</sup>	0,23
Uréia 100 (M)	25,3 ± 1,2 <sup>aBCDEF</sup>	11,1 ± 1,2 <sup>aBCD</sup>	0,28
Cloreto de amônio 20 (M)	18,2 ± 0,8 <sup>aFGHI</sup>	8,1 ± 0,1 <sup>aCDEFGHI</sup>	0,15
Cloreto de amônio 60 (M)	16,5 ± 0,3 <sup>bGHIJK</sup>	8,6 ± 1,9 <sup>aCDEFGH</sup>	0,14
Cloreto de amônio 100 (M)	16,4 ± 0,2 <sup>bGHIJK</sup>	8,4 ± 1,0 <sup>aCDEFGHI</sup>	0,14
Tartarato de amônio 20 (M)	28,5 ± 1,1 <sup>aBCD</sup>	8,1 ± 1,0 <sup>bCDEFGHI</sup>	0,23

Continua pág. 42

Conclusão Tabela 5

Fonte de Nitrogênio (mM) com Glicerol 15g/L (G) e Maltose 15g/L (M) e concentração (mM)	Biomassa micelial seca (mg)	Capacidade biossortiva (mg/g)	Índice de biossortividade (mg)
Tartarato de amônio 60 (M)	30,3 ± 5,7 <sup>a BC</sup>	14,0 ± 1,3 <sup>a AB</sup>	0,42
Tartarato de amônio 100 (M)	33,0 ± 5,3 <sup>a AB</sup>	16,7 ± 3,1 <sup>a A</sup>	0,55
Oxalato de amônio 20 (M)	6,6 ± 2,3 <sup>c LM</sup>	3,9 ± 0,3 <sup>b K</sup>	0,03
Oxalato de amônio 60 (M)	21,5 ± 3,0 <sup>b DEFG</sup>	0,3 ± 0,3 <sup>c L</sup>	0,01
Oxalato de amônio 100 (M)	40,1 ± 3,7 <sup>a A</sup>	5,8 ± 1,1 <sup>a FGHIJK</sup>	0,23
Padrão	9,9 ± 0,6 <sup>JKL</sup>	4,4 ± 0,3 <sup>JK</sup>	0,04

NOTA: **G:** fonte de carbono glicerol 15g/L. **M:** fonte de carbono maltose 15g/L. **PADRÃO:** fonte de carbono glucose 10g/L e fonte de nitrogênio nitrato de sódio 70 mM. **ND:** não determinado. **Análise estatística:** as letras minúsculas são comparações entre as concentrações de uma mesma fonte de N., e letras maiúsculas são comparações entre todas as fontes de N. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

Analisando os resultados de crescimento e capacidade biossortiva, podemos observar que as fontes de nutrientes (carbono e nitrogênio) disponíveis no cultivo onde se obtém o maior crescimento de biomassa não produzem necessariamente um micélio que apresente o melhor resultado em relação à capacidade biossortiva. Portanto foi utilizado novamente o índice de biossortividade para definir as fontes de nutrientes em que fosse possível obter um bom resultado entre a razão crescimento/capacidade biossortiva. Sendo assim, o meio contendo tartarato de amônio 100 mM e maltose 15 g/L apresentou o maior índice de biossortividade (0,55 mg), dentre as fontes e concentrações de nitrogênio e carbono testadas (TABELA 5), sendo definido como o meio de cultivo padrão para os próximos experimentos.

Os resultados obtidos com a variação de nutrientes (fontes de carbono e nitrogênio) no meio de cultura estão de acordo com estudos que demonstram que a estrutura da parede celular microbiana depende da composição do substrato (AGUILAR-USCANGA; FRANÇOIS, 2003).

#### 4.1.3 Suplementação dos cultivos de *Paecilomyces* sp.

Dados na literatura mostram que o cálcio exógeno e N-acetil-glucosamina induzem a síntese de quitina levando ao aumento da parede celular fúngica (MUNRO *et al.*, 2007; BULIK *et al.*, 2003).

Assim, com o objetivo de analisar o efeito do cálcio e do NAG no crescimento e na capacidade biossorbitiva da biomassa micelial de *Paecilomyces* sp., foram selecionados meios de cultura contendo diferentes fontes e concentrações de carbono e nitrogênio, as quais apresentaram alto, médio e baixo crescimento, e alta, média e baixa, capacidade biossorbitiva da biomassa micelial. Para o ensaio de atividade descorante de cada experimento, foram utilizados 1,5 mg de micélio processado e solução do corante azul RB220 na concentração de 100 mg/L.

##### 4.1.3.1 Suplementação dos cultivos com cálcio

Avaliando o efeito da suplementação dos cultivos com cálcio, em geral, as amostras suplementadas apresentaram um crescimento significativo em relação aos controles não suplementados, sendo o aumento na quantidade de biomassa micelial 1,16 vezes maior do que o controle no caso do cultivo A1 com maltose 15 g/L e tartarato de amônio 100 mM (42,9 mg), seguido do cultivo D1 com glicerol 15 g/L e tartarato de amônio 100 mM (39,6 mg) que apresentou um aumento de 0,8 vezes no crescimento em relação ao controle (D2) (FIGURA 6, TABELA 6).

A síntese de quitina e de glucanas desempenham papéis fundamentais na manutenção da integridade da célula fúngica durante o crescimento e morfogênese e na adaptação destas ao stress do meio (GOODAY, 1995; LAGORCE *et al.*, 2002). Perturbações na síntese da parede celular por mutações em genes relacionados com a síntese ou por adição de compostos que interferem no desenvolvimento e na morfologia normal de parede celular desencadeiam uma resposta compensatória para garantir a integridade da parede. Esta resposta inclui um aumento nos níveis de quitina e também promove um aumento da transcrição do *gfaA*, gene que codifica a glutamina : frutose-6-fosfato amidotransferase, enzima responsável pelo primeiro passo limitante da velocidade da síntese da quitina (RAM *et al.*, 2004).

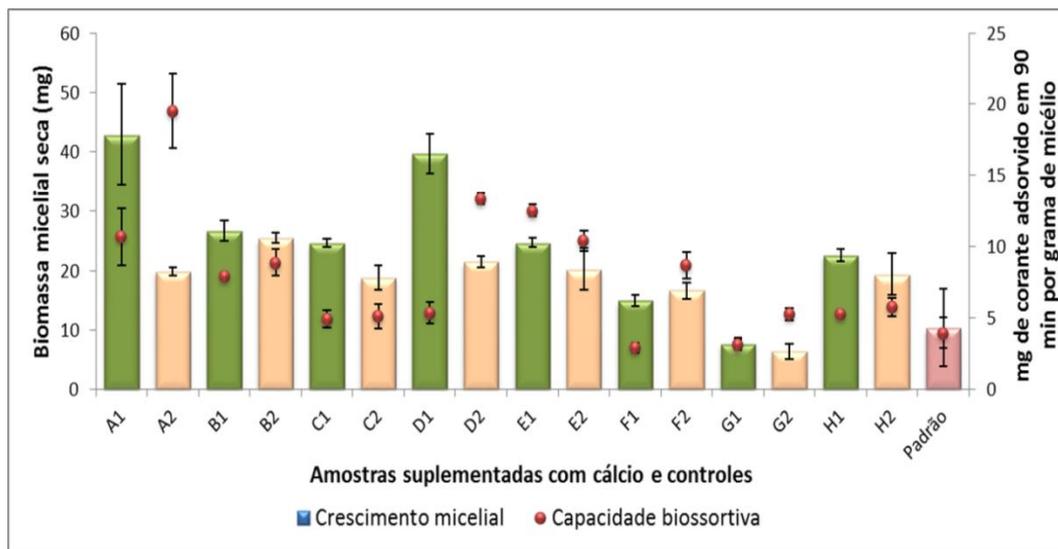


FIGURA 6 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DOS CULTIVOS COM CÁLCIO 0,2 M NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIOSSORTIVA DA BIOMASSA MICELIAL DE *Paecilomyces* sp. NOTA: O corante azul RB220 (100 mg/L) foi utilizado para avaliar a capacidade bioassortiva do micélio. Amostras **1** foram suplementadas com cálcio e amostras **2** são os respectivos controles. Cada letra refere-se à um cultivo com diferentes fontes de carbono e nitrogênio sendo: **A** (maltose 15g/L com tartarato de amônio 100 mM) **B** (maltose 15g/L com tartarato de amônio 20 mM) **C** (maltose 15 g/L com nitrato de sódio 100 mM) **D** (glicerol 15 g/L com tartarato de amônio 100 mM) **E** (glicerol 15 g/L com cloreto de amônio 100 mM) **F** (glicerol 15 g/L com tartarato de amônio 20 mM) **G** (sacarose 5 g/L com nitrato de sódio 70 mM) **H** (frutose 15 g/L com nitrato de sódio 70 mM) **Padrão** (glucose 10 g/L com nitrato de sódio 70 mM). FONTE: O autor (2014)

De acordo com Munro *et al.* (2007) em seu estudo com o fungo ascomiceto *Candida albicans*, o cálcio exógeno promove um stress induzindo a expressão do gene responsável pela síntese de quitina, levando ao aumento da parede celular fúngica.

Em relação à capacidade bioassortiva do micélio, a maioria dos cultivos suplementados com cálcio apresentou uma redução desta, quando comparados aos respectivos controles. A biomassa proveniente do cultivo A2 com maltose 15 g/L e tartarato de amônio 100 mM sem suplementação, apresentou a maior capacidade bioassortiva (19,5 mg/g), sendo 0,8 vezes maior em relação ao cultivo suplementado com cálcio (A1), já o cultivo D2 com glicerol 15 g/L e tartarato de amônio 100 mM (sem suplementação) mostrou uma capacidade bioassortiva menor (13,3 mg/g), porém sendo 1,5 vezes maior do que o cultivo suplementado (D1) que bioassorveu 5,3 mg de corante por grama de micélio (TABELA 6).

Os cultivos G1 (sacarose 5 g/L e nitrato de sódio 70 mM) com 3,1 mg/g e F1 (glicerol 15 g/L e tartarato de amônio 20 mM) com 2,9 mg/g, apresentaram uma capacidade bioassortiva significativamente menor comparado aos outros cultivos (TABELA 6).

TABELA 6: MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO (mg), E DA CAPACIDADE BISSORTIVA (mg/g) E ÍNDICE DE BISSORTIVIDADE (mg) DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. DE CULTIVOS SUPLEMENTADOS COM CÁLCIO E RESPECTIVOS CONTROLES

Abrev.	Condições de cultivo	Biomassa micelial seca (mg)	Capacidade bioassortiva (mg/g)
A1	Maltose 15g/L com Tartarato de amônio 100 mM (S)	42,9 ± 1,5 <sup>a</sup>	10,7 ± 2,0 <sup>cd</sup>
A2	Maltose 15g/L com Tartarato de amônio 100 mM controle	19,8 ± 0,7 <sup>bcd</sup>	19,5 ± 2,6 <sup>a</sup>
B1	Maltose 15g/L com Tartarato de amônio 20 mM (S)	26,7 ± 1,7 <sup>b</sup>	7,9 ± 0,1 <sup>ef</sup>
B2	Maltose 15g/L com Tartarato de amônio 20 mM controle	25,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	8,9 ± 0,9 <sup>de</sup>
C1	Maltose 15 g/L com Nitrato de sódio 100 mM (S)	24,6 ± 0,7 <sup>bc</sup>	4,9 ± 0,5 <sup>gh</sup>
C2	Maltose 15 g/L com Nitrato de sódio 100 mM controle	18,7 ± 2,0 <sup>bcd</sup>	5,1 ± 0,8 <sup>gh</sup>
D1	Glicerol 15 g/L com Tartarato de amônio 100 mM (S)	39,6 ± 3,3 <sup>a</sup>	5,3 ± 0,7 <sup>fgh</sup>
D2	Glicerol 15 g/L com Tartarato de amônio 100 mM controle	21,4 ± 0,9 <sup>bcd</sup>	13,3 ± 0,3 <sup>b</sup>
E1	Glicerol 15 g/L com Cloreto de amônio 100 mM (S)	24,6 ± 0,8 <sup>bc</sup>	12,5 ± 0,4 <sup>bc</sup>
E2	Glicerol 15 g/L com Cloreto de amônio 100 mM controle	20,2 ± 3,5 <sup>bcd</sup>	10,4 ± 0,7 <sup>cde</sup>
F1	Glicerol 15 g/L com Tartarato de amônio 20 mM (S)	14,9 ± 0,9 <sup>def</sup>	2,9 ± 0,3 <sup>h</sup>
F2	Glicerol 15 g/L com Tartarato de amônio 20 mM controle	16,6 ± 1,3 <sup>cde</sup>	8,7 ± 0,9 <sup>de</sup>
G1	Sacarose 5 g/L com Nitrato de sódio 70 Mm (S)	7,6 ± 0,9 <sup>fg</sup>	3,1 ± 0,7 <sup>h</sup>
G2	Sacarose 5 g/L com Nitrato de sódio 70 mM controle	6,3 ± 1,0 <sup>g</sup>	5,2 ± 0,4 <sup>gh</sup>
H1	Frutose 15 g/L com Nitrato de sódio 70 mM (S)	22,5 ± 1,0 <sup>bcd</sup>	5,2 ± 0,2 <sup>gh</sup>
H2	Frutose 15 g/L com Nitrato de sódio 70 mM controle	19,3 ± 3,5 <sup>bcd</sup>	5,7 ± 0,6 <sup>fg</sup>
Padrão	Glucose 10 g/L com Nitrato de sódio 70 mM controle	10,3 ± 3,5 <sup>efg</sup>	3,9 ± 1,1 <sup>gh</sup>

NOTA: **ABREV**: abreviatura. **(S)**: cultivos suplementados com cálcio. A análise estatística foi feita separadamente para o crescimento e atividade decolorante. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

#### 4.1.3.2 Suplementação dos cultivos de *Paecilomyces* sp. com N-acetil-D-glucosamina (NAG)

Avaliando os cultivos suplementados com N-Acetil-D-glucosamina, de maneira geral, as amostras suplementadas (1) apresentaram crescimento até 0,4 vezes maior em relação as não suplementadas (2) (FIGURA 7). O cultivo com maior crescimento foi B1 com maltose

15 g/L e tartarato de amônio 20 mM, suplementado com NAG, com 32,1 mg de biomassa seca, seguido do cultivo F1 com glicerol 15 g/L com tartarato de amônio 100 mM, suplementado com NAG (28,9 mg). Os cultivos com glucose 10 g/L e nitrato de sódio 70 mM sem suplementação (padrão) e G2 com sacarose 5 g/L e nitrato de sódio 70 mM sem suplementação apresentaram a menor quantidade de biomassa micelial sendo 7,8 mg e 7,25 mg respectivamente (TABELA 7).

O aumento na quantidade de biomassa pela suplementação do meio de cultivo já foi relatado por Bulik *et al*, 2003, em um estudo com o fungo ascomiceto *Saccharomyces cerevisiae*, onde os níveis de quitina da parede celular aumentaram de três a quatro vezes com a adição de glucosamina no meio de cultivo.

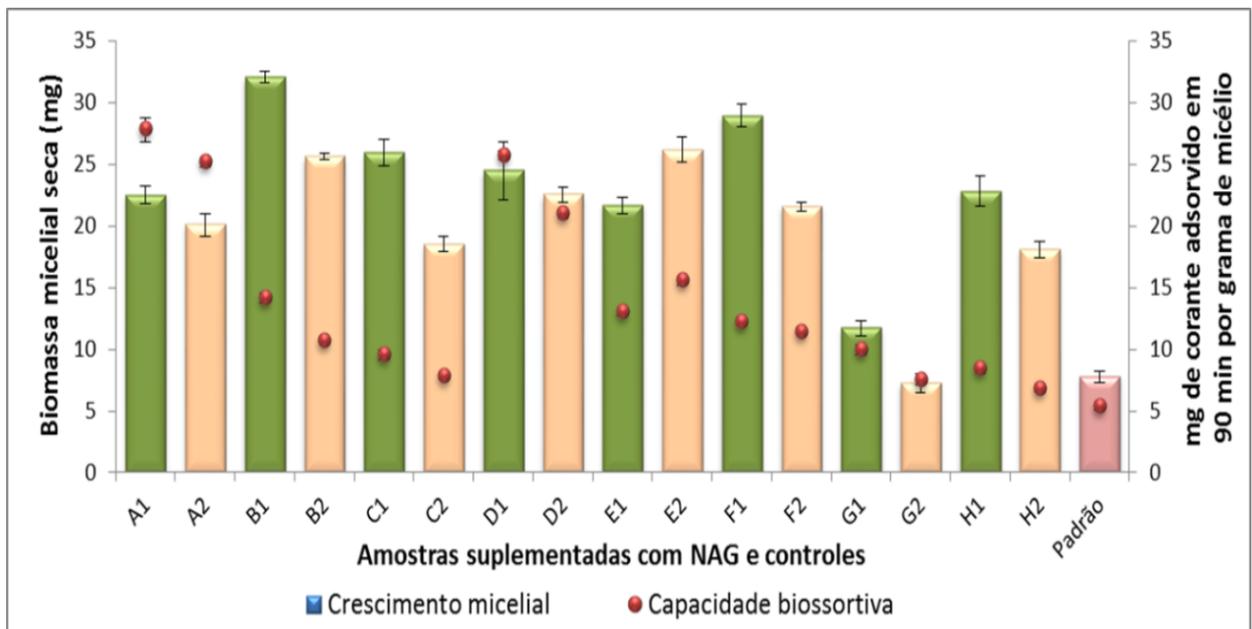


FIGURA 7 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DOS CULTIVOS COM NAG 23 Mm, NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIOSSORTIVA DA BIOMASSA MICELIAL DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: O corante azul RB220 (100 mg/L) foi utilizado para avaliar a capacidade bioadsorvente do micélio. Amostras 1 foram suplementadas com NAG e amostras 2 são os respectivos controles. Cada letra refere-se à um cultivo com diferentes fontes de carbono e nitrogênio sendo: **A** (maltose 15g/L com tartarato de amônio 100 mM) **B** (maltose 15g/L com tartarato de amônio 20 mM) **C** (maltose 15 g/L com nitrato de sódio 100 mM) **D** (glicerol 15 g/L com tartarato de amônio 100 mM) **E** (glicerol 15 g/L com cloreto de amônio 100 mM) **F** (glicerol 15 g/L com tartarato de amônio 20 mM) **G** (sacarose 5 g/L com nitrato de sódio 70 mM) **H** (frutose 15 g/L com nitrato de sódio 70 mM) **Padrão** (glucose 10 g/L com nitrato de sódio 70 mM). FONTE: O autor (2014)

Avaliando a capacidade bioadsorvente, de maneira geral, os micélios provenientes de cultivos suplementados com NAG apresentaram capacidade de bioadsorver o corante azul RB220 aproximadamente 0,3 vezes maior em relação aos controles. A biomassa cultivada em meio A1 com maltose 15 g/L e tartarato de amônio 100 mM, suplementado com NAG

apresentou a maior capacidade bioassortiva (27,8 mg/g), seguida de D1 com glicerol 15 g/L e tartarato de amônio 100 mM, suplementado com NAG, bioassorvendo 25,7 mg de corante por grama de micélio (FIGURA 7, pág. 46).

Os cultivos com menor capacidade bioassortiva foram H2 com frutose 15 g/L e nitrato de amônio 70 mM sem suplementação (6,7 mg/g) e o padrão com glucose 10 g/L e nitrato de sódio 70 mM sem suplementação (5,3 mg/g) (TABELA 7).

TABELA 7 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO (mg), E DA CAPACIDADE BIOSSORTIVA (mg/g) E O ÍNDICE DE BIOSSORTIVIDADE (mg) DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. DE CULTIVOS SUPLEMENTADOS COM NAG E RESPECTIVOS CONTROLES

Abrev.	Condições de cultivo	Biomassa micelial seca (mg)	Capacidade bioassortiva (mg/g)
A1	Maltose 15g/L com Tartarato de amônio 100 mM (S)	22,5 ± 0,7 <sup>de</sup>	27,8 ± 0,9 <sup>a</sup>
A2	Maltose 15g/L com Tartarato de amônio 100 mM controle	20,1 ± 0,9 <sup>fg</sup>	25,1 ± 0,3 <sup>b</sup>
B1	Maltose 15g/L com Tartarato de amônio 20 mM (S)	32,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	14,1 ± 0,4 <sup>e</sup>
B2	Maltose 15g/L com Tartarato de amônio 20 mM controle	25,6 ± 0,2 <sup>c</sup>	10,6 ± 0,3 <sup>hi</sup>
C1	Maltose 15 g/L com Nitrato de sódio 100 mM (S)	25,9 ± 1,0 <sup>c</sup>	9,5 ± 0,4 <sup>j</sup>
C2	Maltose 15 g/L com Nitrato de sódio 100 mM controle	18,5 ± 0,5 <sup>g</sup>	7,8 ± 0,2 <sup>kl</sup>
D1	Glicerol 15 g/L com Tartarato de amônio 100 mM (S)	24,5 ± 2,3 <sup>cd</sup>	25,7 ± 0,3 <sup>b</sup>
D2	Glicerol 15 g/L com Tartarato de amônio 100 mM controle	22,5 ± 0,5 <sup>de</sup>	21,0 ± 0,4 <sup>c</sup>
E1	Glicerol 15 g/L com Cloreto de amônio 100 mM (S)	21,6 ± 0,6 <sup>ef</sup>	13,0 ± 0,3 <sup>f</sup>
E2	Glicerol 15 g/L com Cloreto de amônio 100 mM controle	26,1 ± 1,0 <sup>c</sup>	15,5 ± 0,3 <sup>d</sup>
F1	Glicerol 15 g/L com Tartarato de amônio 20 mM (S)	28,9 ± 0,9 <sup>b</sup>	12,2 ± 0,3 <sup>fg</sup>
F2	Glicerol 15 g/L com Tartarato de amônio 20 mM controle	21,5 ± 0,3 <sup>ef</sup>	11,4 ± 0,1 <sup>gh</sup>
G1	Sacarose 5 g/L com Nitrato de sódio 70 mM (S)	11,7 ± 0,6 <sup>h</sup>	9,9 ± 0,4 <sup>ij</sup>
G2	Sacarose 5 g/L com Nitrato de sódio 70 mM controle	7,2 ± 0,7 <sup>i</sup>	7,5 ± 0,4 <sup>kl</sup>
H1	Frutose 15 g/L com Nitrato de sódio 70 mM (S)	22,8 ± 1,2 <sup>de</sup>	8,4 ± 0,3 <sup>k</sup>
H2	Frutose 15 g/L com Nitrato de sódio 70 mM controle	18,1 ± 0,6 <sup>g</sup>	6,7 ± 0,2 <sup>l</sup>
Padrão	Glucose 10 g/L com Nitrato de sódio 70 mM controle	7,8 ± 0,4 <sup>i</sup>	5,3 ± 0,2 <sup>m</sup>

NOTA: **ABREV:** abreviaturas. **(S):** cultivos suplementados com NAG. A análise estatística foi feita separadamente para o crescimento e atividade decolorante. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

Levando em consideração que as fontes de nutrientes e a suplementação dos cultivos são capazes de alterar o crescimento celular e a morfologia da parede celular (AGUILAR-USCANGA; FRANÇOIS, 2003; KUMAR *et al.*, 2012), podemos sugerir que alguns meios de cultivo suplementados com NAG podem promover uma maior exposição de componentes da membrana como proteínas e polissacarídeos favorecendo a interação entre estes e a estrutura do corante aumentando a capacidade bioassortiva do fungo como mostram os resultados

obtidos neste trabalho, porém não são encontrados na literatura trabalhos que mostrem o efeito de suplementações com NAG ou cálcio na capacidade biossortiva por fungos.

#### 4.2 EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO E DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIOSSORTIVA DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

Buscando avaliar o efeito do tempo de cultivo e da concentração de inóculo no crescimento micelial e na capacidade biossortiva do micélio foi realizado um ensaio coletando o micélio após 5, 10 e 15 dias de crescimento. A capacidade biossortiva foi avaliada frente ao corante padrão azul RB220 (TABELA 8).

TABELA 8 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO (mg), E DA CAPACIDADE BIOSSORTIVA (mg/g) E O ÍNDICE DE BIOSSORTIVIDADE (mg) DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. CULTIVADO EM DIFERENTES TEMPOS E CONCENTRAÇÕES DE INÓCULOS

Amostra	Biomassa micelial seca (mg)	Capacidade biossortiva corante RB220 (mg/g)	Índice de biossortividade corante RB220 (mg)
A5	7,70 ± 1,0 <sup>d</sup>	21,79 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,17
B5	1,70 ± 0,8 <sup>e</sup>	ND	ND
A10	<b>27,67</b> ± 2,9 <sup>a</sup>	24,99 ± 0,4 <sup>b</sup>	<b>0,69</b>
B10	24,50 ± 0,8 <sup>ab</sup>	<b>27,83</b> ± 0,2 <sup>a</sup>	<b>0,68</b>
A15	20,97 ± 0,4 <sup>bc</sup>	24,99 ± 0,6 <sup>b</sup>	0,52
B15	17,88 ± 1,7 <sup>c</sup>	22,80 ± 0,2 <sup>c</sup>	0,41

NOTA: **ND**: não determinado. **A**: amostras inoculadas com a concentração de  $3 \times 10^5$  esporos por mL e **B**: amostras inoculadas com a concentração de  $3 \times 10^4$  esporos por mL. os números 5, 10 e 15 referem-se à idade do cultivo (dias de crescimento). A análise estatística foi feita separadamente para o crescimento e atividade descorante. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

Os micélios coletados em 5 dias após inoculação (A5 e B5) apresentaram baixo crescimento, no caso do cultivo inoculado com  $3 \times 10^4$  esporos por mL (B5) não obteve-se micélio suficiente para o teste de atividade descorante. Já os cultivos após 10 e 15 dias de crescimento (A10 e B10) inoculados com  $3 \times 10^5$  e  $3 \times 10^4$ , respectivamente não apresentaram

diferença significativa e produziram os maiores valores de biomassa sendo 27,6 mg para A10 e 24,5 mg para B10 (FIGURA 8).

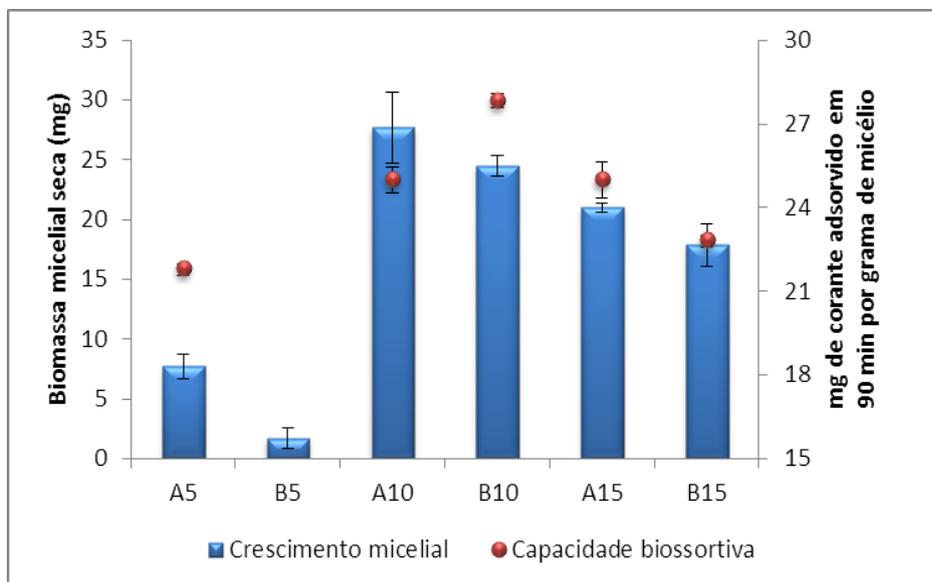


FIGURA 8 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPO DE CULTIVO NO CRESCIMENTO E NA CAPACIDADE BIODISSORTIVA DA BIOMASSA MICELIAL DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: O corante azul RB220 (100 mg/L) foi utilizado para avaliar a capacidade bioassortiva do micélio.

A: amostras inoculadas com a concentração de  $3 \times 10^5$  esporos por mL e B: amostras inoculadas com a concentração de  $3 \times 10^4$  esporos por mL. os números 5, 10 e 15 referem-se à idade do cultivo (dias de crescimento).

FONTE: O autor (2014)

Em relação à capacidade bioassortiva do micélio, o cultivo com 10 dias, inoculado com a concentração de  $3 \times 10^4$  esporos por mL apresentou a maior quantidade de mg de corante removido por grama de micélio, sendo 27,8 mg/g. O cultivo com 5 dias inoculado com  $3 \times 10^5$  esporos por mL, apresentou a capacidade bioassortiva mais baixa (21,7 mg/g) (FIGURA 8, TABELA 8). Avaliando-se a relação entre o crescimento micelial e a sua capacidade bioassortiva (índice de bioassortividade), as biomassas cultivadas durante 10 dias tiveram os melhores resultados em relação as demais, sendo 0,69 mg para amostra A10 e 0,68 mg para a amostra B10 (TABELA 8).

Visto que as diferenças de crescimento não foram significativas de acordo com os dados estatísticos, o período de crescimento por 10 dias foi estabelecido para cultivar a biomassa para as análises de carboidratos da parede celular de *Paecilomyces* sp., buscando-se otimizar o tempo de cultivo. A concentração de inóculo foi estabelecida em torno de  $10^5$  esporos por mL.

### 4.3 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE A DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS

A capacidade biossortiva do micélio processado de *Paecilomyces* sp. foi avaliada frente a diferentes corantes e demonstrado na FIGURA 9.

De acordo com os resultados obtidos avaliando-se a eficiência de descoloração pelo micélio processado de *Paecilomyces* sp. para os diferentes corantes, os corantes ácidos preto CR150 e marinho CRD150 apresentaram maior porcentagem de descoloração em relação aos demais corantes, 79 % e 63 %, respectivamente (FIGURA 9).

Os corantes ácidos correspondem a um grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos ionizáveis que tornam o corante solúvel em água. No processo de tintura, estes corantes previamente neutralizados, se ligam à fibra através de uma troca iônica envolvendo o par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilato das fibras protéicas, na forma não-protonada. Estes corantes caracterizam-se por substâncias com estrutura química baseada em compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, ketonimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação (GUARATINI; ZANONI, 2000).

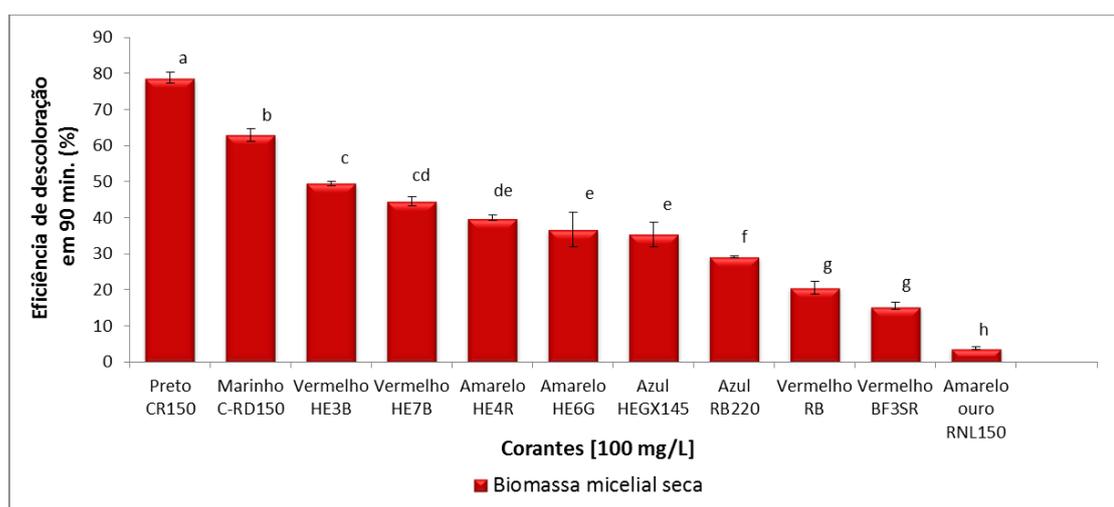


FIGURA 9 - EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE A DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS

NOTA: O experimento foi conduzido com tempo de contato de 90 minutos sendo utilizado 2 mg de micélio processado e corantes na concentração de 100 mg/L, pH 7,0. Dados estatísticos pelo programa JMP-Starter com nível de significância de 5%. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

Os demais corantes testados são classificados como corantes reativos em relação à forma de ligação entre a molécula de corante e a fibra têxtil. Estes corantes contêm um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas. Os principais corantes reativos contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos. Neste tipo de corante, a reação química se processa diretamente através da substituição do grupo nucleofílico pelo grupo hidroxila da celulose (GUARATINI; ZANONI, 2000; HUGER, 2003).

Dentre os corantes reativos deste experimento, os corantes vermelho HE3B e HE7B apresentaram remoção de 50 % e 45 %, respectivamente, pela biomassa de *Paecilomyces* sp.

O corante azul RB220 utilizado como corante padrão neste trabalho, teve uma bioissorção de 29 % pela biomassa de *Paecilomyces* sp. (TABELA 9). Pode-se sugerir que as diferenças na eficiência de descoloração entre os corantes reativos devem-se as diferentes estruturas químicas (antraquinona, azo, entre outras) que compõe cada corante.

TABELA 9 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE A DIFERENTES CORANTES TÊXTEIS

Corantes	Eficiência de descoloração (%)
Preto CR150	78,74 ± 1,5 <sup>a</sup>
Marinho C-RD150	62,95 ± 1,7 <sup>b</sup>
Vermelho HE3B	49,58 ± 0,6 <sup>c</sup>
Vermelho HE7B	44,55 ± 1,1 <sup>cd</sup>
Amarelo HE4R	39,94 ± 0,7 <sup>de</sup>
Amarelo HE6G	36,70 ± 2,7 <sup>e</sup>
Azul HEGX145	35,45 ± 3,4 <sup>e</sup>
Azul RB220	29,18 ± 0,3 <sup>f</sup>
Vermelho RB	20,71 ± 1,7 <sup>g</sup>
Vermelho BF3SR	15,45 ± 1,0 <sup>g</sup>
Amarelo ouro RNL150	3,81 ± 0,4 <sup>h</sup>

NOTA: Dados estatísticos pelo programa JMP-Starter com nível de significância de 5 %. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

Os corantes preto CR150, vermelho HE3B, amarelo HE4R e azul RB220, os quais apresentaram alta e média eficiência de descoloração foram selecionados para os testes com diferentes doses de bioissorvente, tratamento químico, tempo de contato, concentração de sal, diferentes temperaturas e dessorção, apresentados na sequência deste trabalho.

#### 4.4 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOSSORVENTE

A concentração de biossorvente é um fator que influencia na cinética de adsorção, podendo aumentar ou diminuir a eficiência de remoção do corante dependendo da quantidade de biomassa utilizada (FAN *et al.*, 2012).

Buscando-se avaliar a eficiência de descoloração do micélio de *Paecilomyces* sp., foram avaliadas diferentes concentrações de biossorvente: 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10 g/L, para quatro corantes diferentes: preto CR150, vermelho HE3B, amarelo HE4R e azul RB220, na concentração de 100 mg/L (FIGURA 10).

O efeito da concentração de biossorvente na eficiência de descoloração de corantes têxteis foi avaliado em temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C), sendo utilizada a dose mínima de biossorvente de 1 g/L e a máxima de 10 g/L.

De maneira geral, para todos os corantes, a eficiência de descoloração aumentou em até 2,8 vezes com o aumento da concentração de biossorvente de 1 g/L para 10 g/L, o que pode ser atribuído a um aumento no número de sítios de ligações ao corante, disponíveis na medida em que se aumenta a quantidade de biomassa. Este resultado está de acordo com os dados encontrados por Akar; Arslan e Akar (2013) na análise do efeito da concentração de biossorvente do fungo *Thamnidium elegans* (0,2 a 1,6 g/L), na descoloração do corante reativo vermelho (RR198), na qual o aumento da concentração de biossorvente também melhorou a remoção do corante. Já Fan *et al.* (2012), em estudo com o fungo *Cladosporium* sp., mostraram que a menor concentração de biossorvente (0,1 g/L) apresentou uma maior capacidade de adsorção do corante *azure blue* (básico) em relação a concentração de 0,5 g/L.

Segundo Sadhasivam *et al.* (2009) a disponibilidade da área de superfície sobre o adsorvente (micélio) pode ser a razão para o aumento da porcentagem de remoção de corante. Estes autores avaliaram diferentes concentrações (0,5-3,0 g/50 mL) de biomassa do fungo *Trichoderma harzianum* na biossorção do corante sintético rhodamine 6G, e observaram que a partir da dose de 1 g/50 mL a adsorção do corante não apresentava aumento significativo, o que pode ser devido à sobreposição ou agregação de corante nos sítios de adsorção, resultando na diminuição de área superficial disponível para o biossorvente.

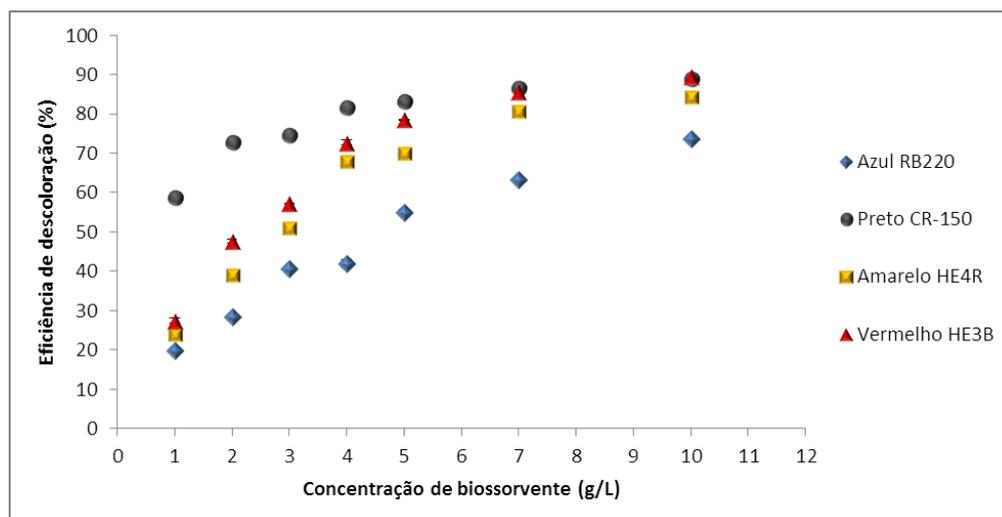


FIGURA 10 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOSSORVENTE NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B PELA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: O experimento foi conduzido com tempo de contato de 90 minutos, sendo utilizado diferentes concentrações de micélio processado (1-10 g/L) e corantes na concentração de 100 mg/L, pH 7,0.

FONTE: O autor (2014)

No presente trabalho, para o corante Azul RB220 a eficiência de descoloração aumentou em até 2,8 vezes com o uso da concentração de biossorvente de 10 g/L, seguido do corante Amarelo HE4R onde a concentração de biossorvente de 10 g/L removeu 2,5 vezes mais corante do que a concentração de 1 g/L. Para o corante vermelho HE3B a concentração de 10 g/L removeu 2,3 vezes mais corante comparado a menor concentração (1 g/L), e a biomassa na solução do corante preto CR150 apresentou a menor diferença de eficiência de descoloração entre as concentrações de biossorvente aumentando em 0,5 vezes a remoção do corante com 10 g/L (TABELA 10).

TABELA 10 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE AOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B

Concentração de biossorvente (g/L)	Eficiência de descoloração (%) Azul RB220	Eficiência de descoloração (%) Preto CR150	Eficiência de descoloração (%) Amarelo HE4R	Eficiência de descoloração (%) Vermelho HE3B
1	19,89 ± 0,5 <sup>f</sup>	58,73 ± 0,5 <sup>f</sup>	24,07 ± 1,1 <sup>g</sup>	27,43 ± 0,6 <sup>g</sup>
2	28,48 ± 0,3 <sup>e</sup>	72,88 ± 0,6 <sup>e</sup>	39,06 ± 0,4 <sup>f</sup>	47,72 ± 0,5 <sup>f</sup>
3	40,52 ± 0,3 <sup>d</sup>	74,74 ± 0,4 <sup>d</sup>	50,91 ± 0,7 <sup>e</sup>	57,15 ± 0,1 <sup>e</sup>
4	41,92 ± 1,0 <sup>d</sup>	81,75 ± 0,6 <sup>c</sup>	67,96 ± 0,9 <sup>d</sup>	72,72 ± 0,5 <sup>d</sup>
5	55,02 ± 0,6 <sup>c</sup>	83,27 ± 0,2 <sup>c</sup>	70,08 ± 0,4 <sup>c</sup>	78,48 ± 0,6 <sup>c</sup>
7	63,27 ± 0,7 <sup>b</sup>	86,64 ± 0,4 <sup>b</sup>	80,76 ± 0,4 <sup>b</sup>	85,52 ± 0,1 <sup>b</sup>
10	73,52 ± 0,1 <sup>a</sup>	88,96 ± 0,8 <sup>a</sup>	84,35 ± 0,3 <sup>a</sup>	89,37 ± 0,1 <sup>a</sup>

NOTA: Dados estatísticos pelo programa JMP-Startter com nível de significância de 5 %. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

Mesmo com a maior concentração de biossorvente testada (10 g/L), ainda não foi possível atingir o nível de saturação da biomassa micelial de *Paecilomyces* sp. com nenhum dos corantes testados. No entanto, para os experimentos seguintes, a concentração de biossorvente de 3 g/L foi estabelecida como sendo uma concentração com eficiência de descoloração intermediária que possibilitasse a visualização das respostas frente às alterações ocasionadas pelos tratamentos químicos.

#### 4.5 EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

Estudos tem mostrado que alguns tratamentos químicos aplicados na biomassa fúngica após o cultivo, podem causar alterações na parede celular removendo proteínas, ou causando rupturas na parede, o que pode alterar a capacidade biossortiva do micélio (FU; VIRARAGHAVAN, 2002; AMBRÓSIO *et al.*, 2012).

No presente trabalho foram analisadas a influência de quatro tratamentos químicos (NaOH, NaCl, HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, na concentração de 0,1 M) sobre a biomassa de *Paecilomyces* sp., avaliando seu potencial de biossorção sobre os corantes: azul RB220, preto CR150, amarelo HE4R, e vermelho HE3B, individualmente (FIGURA 11).

Em geral, os tratamentos ácidos proporcionaram um aumento de até 18 % com HCl e 24 % com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na eficiência de descoloração do micélio em relação ao controle (sem tratamento) para todos os corantes testados.

Chaves *et al.* (2008) analisando o efeito de tratamentos químicos na biomassa de *Aspergillus niger* frente a biossorção do corante sintético índigo carmim, obtiveram os melhores resultados de capacidade biossortiva com as biomassas tratadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M e HCl 0,2 M, aumentando a eficiência de descoloração em torno de 10 % em relação ao controle não tratado. Além disso, os autores observaram que eletromicrografias das biomassas tratadas com os ácidos H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HCl mostraram um micélio com espaços vazios e poros entre as hifas miceliais, o que pode influenciar positivamente na cinética de biossorção por aumentar a superfície de contato da biomassa com a molécula de corante.

O mesmo resultado com os ácidos foi obtido por Miquelante (2011) para o fungo halotolerante *Acremonium* sp3 em relação à biossorção dos corantes reativos amarelo RY84, azul RB220 e vermelho RR195 e que tiveram um aumento na sua remoção de 7,7 %, 11,3 % e

15,4 %, respectivamente, em relação ao controle sem tratamento pela biomassa tratada com HCl 0,1 M. Já os tratamentos com NaOH e NaCl 0,1 M diminuíram a capacidade biossorbitiva da biomassa micelial de *Acremonium* sp3.

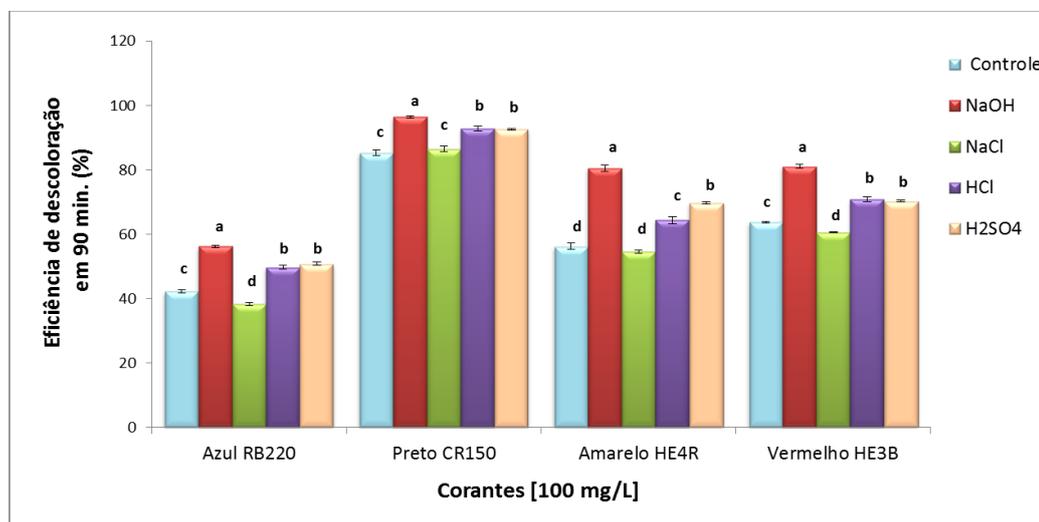


FIGURA 11 - EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA CAPACIDADE DE BIOSSORÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R, E VERMELHO HE3B PELA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: O experimento foi conduzido com tempo de contato de 90 minutos, com concentração de biossorbente de 3 mg e corantes na concentração de 100 mg/L, pH 7,0. Análise estatística: Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente sendo as análises feitas separadamente para cada corante.

FONTE: O autor (2014)

No entanto, neste trabalho, para a biomassa de *Paecilomyces* sp. o melhor resultado foi proporcionado pelo tratamento com hidróxido de sódio para todos os corantes, aumentando em até 43 % a eficiência de descoloração para o corante amarelo HE4R, seguido de um aumento de 33 % para o azul RB220, 27 % para o corante vermelho HE3B, e 13 % para o preto CR150, chegando este a apresentar eficiência de descoloração total de 96 % (TABELA 11).

TABELA 11 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO EFEITO DE TRATAMENTOS QUÍMICOS NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE AOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B

Tratamentos químicos (0,1 M)	Eficiência de descoloração (%) Azul RB220	Eficiência de descoloração (%) Preto CR150	Eficiência de descoloração (%) Amarelo HE4R	Eficiência de descoloração (%) Vermelho HE3B
Controle	42,2 ± 0,5 <sup>c</sup>	85,3 ± 0,8 <sup>c</sup>	56,2 ± 0,9 <sup>d</sup>	63,7 ± 0,2 <sup>c</sup>
NaOH	56,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	96,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	80,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	81,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
NaCl	38,2 ± 0,4 <sup>d</sup>	86,4 ± 0,8 <sup>c</sup>	54,5 ± 0,5 <sup>d</sup>	60,6 ± 0,1 <sup>d</sup>
HCl	49,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	92,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	64,3 ± 1,0 <sup>c</sup>	70,8 ± 0,7 <sup>b</sup>
H2SO4	50,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	92,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	69,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	70,2 ± 0,2 <sup>b</sup>

NOTA: Dados estatísticos pelo programa JMP-Startter com nível de significância de 5 %. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente. FONTE: O autor (2014)

Em um estudo com o fungo *Rhizopus stolonifer*, Zeroual *et al.* (2006) relataram um aumento na capacidade de bioadsorção para o corante Azul de Bromofenol após tratamento alcalino com NaOH, sugerindo que este tratamento remove algumas proteínas e alguns polissacarídeos da parede celular, deixando outros como a quitina mais expostos, o que pode permitir uma maior interação com o corante.

Abdallah e Taha (2012) analisando o efeito do tratamento com NaOH na bioadsorção do corante azul de metileno pela biomassa do ascomiceto *Aspergillus fumigatus* também encontraram um aumento na eficiência de descoloração (62 %) utilizando NaOH 0,1 M. Este aumento pode ser explicado pelo fato do pré-tratamento com um álcali hidrolisar a parede celular, causando uma dissociação de substâncias orgânicas, grupamentos álcool (OH), carboxílicos (COOH) e carboxilatos (COO), os quais aumentam a bioadsorção catiônica.

A eficiência de descoloração responde a interações entre as características do grupo reativo dos corantes e as dos grupos ativos na superfície das células fúngicas (ONAT *et al.*, 2010). Métodos de pré-tratamento podem alterar os sítios de ligação e aumentar a interação entre o corante e a superfície da parede celular, induzindo o processo de descoloração (AMBRÓSIO *et al.*, 2012).

Devido ao aumento na eficiência de descoloração de todos os corantes testados, o micélio de *Paecilomyces* sp., foi tratado com NaOH 0,1 M para ser utilizado nos experimentos de tempo de contato, concentração de sal e diferentes temperaturas.

#### 4.6 EFEITO DO TEMPO DE CONTATO NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

Outro fator que possui influência na capacidade de remoção do corante pela biomassa fúngica é o tempo de contato do bioadsorvente com a solução (SADHASIVAM *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2012).

Para avaliar a influência do tempo de contato na eficiência de descoloração dos corantes preto CR150, vermelho HE3B, amarelo HE4R e azul RB220, na concentração de 100 mg/L, foi realizado um ensaio de atividade decolorante nos tempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 min, utilizando-se 3 mg de biomassa micelial pré-tratada com NaOH 0,1 M por 1h (FIGURA 12).

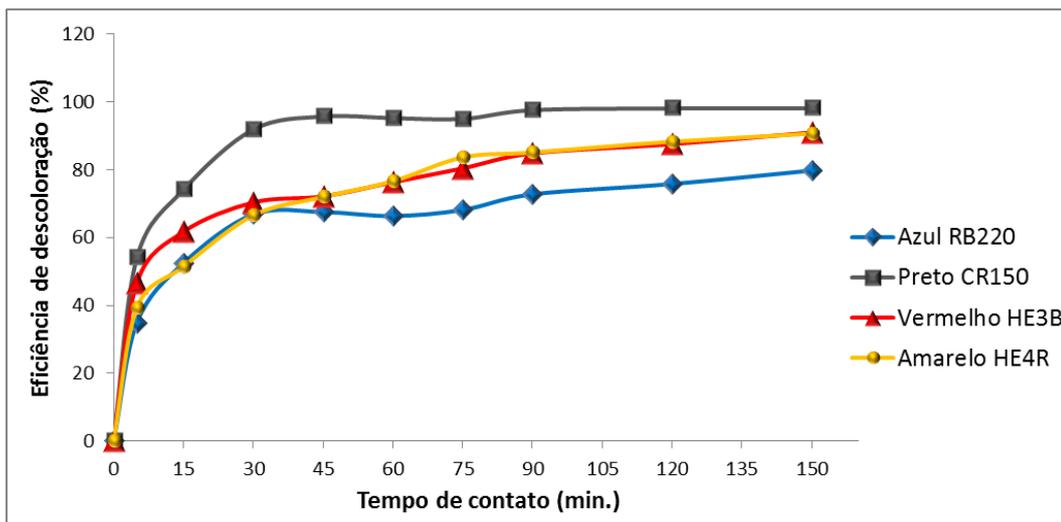


FIGURA 12 - EFEITO DO TEMPO DE CONTATO NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B PELA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: A biomassa foi tratada com NaOH 0,1 M por 1h sob agitação de 150 rpm, sendo posteriormente utilizada para o teste de atividade descorante. O experimento foi conduzido com concentração de biossorvente de 3 mg e corantes na concentração de 100 mg/L, pH 7,0. FONTE: O autor (2014)

Em geral, a eficiência de descoloração aumentou com o aumento do tempo de contato, apresentando uma rápida biossorção nos primeiros 30 min, aproximadamente 80 % para todos os corantes, e em seguida o processo tornou-se mais lento até atingir um equilíbrio (FIGURA 12). Esta mesma tendência foi observada em um estudo com *Aspergillus fumigatus*, onde a fase inicial mais rápida ocorre pelo número de sítios de ligação disponíveis no biossorvente, promovendo uma rápida adsorção do corante (ABDALLAH; TAHA, 2012).

Miquelante (2011) mostrou uma alta capacidade de biossorção do corante RB220 pela biomassa do fungo *Acremonium* sp3, já nos primeiros cinco minutos de contato (51,4 mg/g), com aumento gradual até o tempo de equilíbrio, no qual após 90 minutos de contato o biossorvente removeu 96,5 mg de corante por grama de biomassa micelial seca.

No presente trabalho, o corante preto CR150 apresentou a maior eficiência de descoloração, 90 % em 30 min., dentre os corantes analisados, e em seguida atingiu o equilíbrio da reação (TABELA 12). Já os outros corantes, mesmo sendo biossorvidos mais lentamente após 30 min, não atingiram um equilíbrio de reação no tempo total de 150 min. Os demais testes de atividade descorante do presente trabalho continuaram sendo realizados no tempo de contato de 90 min.

TABELA 12 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO EFEITO O TEMPO DE CONTATO NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE AOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B

Tempo de contato (min)	Eficiência de descoloração (%) Azul RB220	Eficiência de descoloração (%) Preto CR150	Eficiência de descoloração (%) Amarelo HE4R	Eficiência de descoloração (%) Vermelho HE3B
5	34,8 ± 0,5 <sup>g</sup>	54,0 ± 0,8 <sup>d</sup>	39,2 ± 0,8 <sup>i</sup>	46,6 ± 0,4 <sup>i</sup>
10	48,1 ± 1,0 <sup>f</sup>	72,0 ± 0,6 <sup>c</sup>	44,0 ± 0,8 <sup>h</sup>	50,3 ± 0,5 <sup>h</sup>
15	52,4 ± 1,6 <sup>e</sup>	74,0 ± 0,6 <sup>c</sup>	51,4 ± 1,1 <sup>g</sup>	61,6 ± 0,2 <sup>g</sup>
30	66,8 ± 0,9 <sup>d</sup>	91,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	66,5 ± 0,3 <sup>f</sup>	70,3 ± 0,4 <sup>f</sup>
45	67,5 ± 1,0 <sup>d</sup>	95,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	71,9 ± 0,9 <sup>e</sup>	72,1 ± 0,5 <sup>e</sup>
60	66,3 ± 1,4 <sup>d</sup>	95,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	76,6 ± 0,5 <sup>d</sup>	76,3 ± 1,1 <sup>d</sup>
75	68,1 ± 0,6 <sup>d</sup>	94,9 ± 3,0 <sup>ab</sup>	83,6 ± 0,4 <sup>c</sup>	80,3 ± 0,5 <sup>c</sup>
90	72,7 ± 0,9 <sup>c</sup>	97,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	85,0 ± 1,1 <sup>c</sup>	84,8 ± 0,8 <sup>c</sup>
120	75,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	98,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	88,2 ± 0,5 <sup>b</sup>	87,5 ± 0,3 <sup>b</sup>
150	79,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	98,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	90,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	90,9 ± 0,5 <sup>a</sup>

NOTA: Dados estatísticos pelo programa JMP-Starter com nível de significância de 5 %. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente. FONTE: O autor (2014)

#### 4.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL (NaCl) NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

Além da presença de corantes, as águas residuais da produção têxtil geralmente contêm vários compostos suspensos e dissolvidos que podem interferir no processo de remoção de corantes. Estes compostos podem ser ácidos, bases, íons metálicos e principalmente sal (NaCl), que é utilizado em grandes quantidades no processo de tingimento das fibras (AKSU, 2005; AKSU; BALIBEK, 2010).

No presente estudo, a eficiência de descoloração do micélio de *Paecilomyces* sp. foi avaliada para os corantes azul RB220, preto CR150, amarelo HE4R, vermelho HE3B na concentração de 100 mg/L, em diferentes concentrações de NaCl: 10, 20, 40, 60 e 80 g/L, em um ensaio de atividade descorante (FIGURA 13).

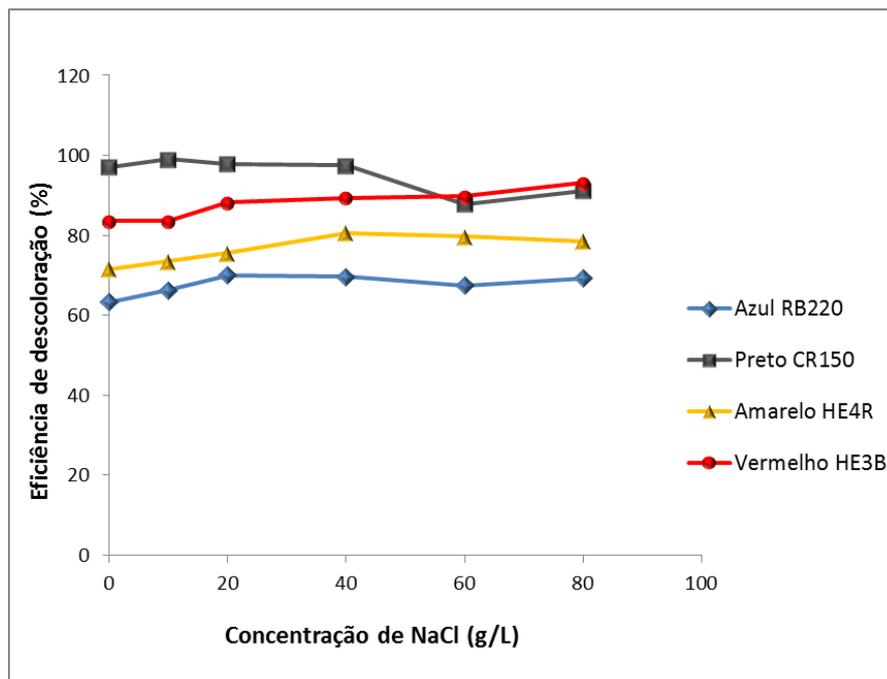


FIGURA 13 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B PELA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: A biomassa foi tratada com NaOH 0,1 M por 1h sob agitação de 150 rpm, sendo posteriormente utilizada para o teste de atividade descorante em 90 min. O experimento foi conduzido com concentração de biossorvente de 3 mg e corantes na concentração de 100 mg/L pH 7,0. FONTE: O autor (2014)

Analisando o comportamento da biossorção de cada corante frente a concentrações crescentes de NaCl, de maneira geral, a biossorção destes não foi alterada pelas concentrações de NaCl, sendo que para os corantes Amarelo HE4R e vermelho HE3B, o aumento da concentração do sal aumentou a eficiência de descoloração para 80 % e 93 %, respectivamente (TABELA 13). A biomassa de *Paecilomyces* sp. pode ser considerada um bom biossorvente para o uso em efluentes têxteis com diferentes corantes e alta concentração de NaCl, pois apresentou uma alta eficiência de descoloração mesmo em meio com concentração de NaCl de 80 g/L.

Em um estudo com a biomassa de *Thamnidium elegans*, Akar, Arslan e Akar (2013) observaram que o aumento da concentração de NaCl de 0,02 mol/L para 0,3 mol/L, diminuiu a eficiência de descoloração em 4,35 % para o corante RR19. A mesma tendência foi mostrada no trabalho de Abdallah e Taha (2012), onde o aumento da concentração de NaCl de 1 mM para 100 mM afetou o equilíbrio de adsorção reduzindo a eficiência de descoloração da biomassa de *Aspergillus fumigatus* sobre o corante azul de metileno de 62,5 % para 54 %.

TABELA 13 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE AOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B

Concentração de NaCl (g/L)	Eficiência de descoloração (%) Azul RB220	Eficiência de descoloração (%) Preto CR150	Eficiência de descoloração (%) Amarelo HE4R	Eficiência de descoloração (%) Vermelho HE3B
0	63,2 ± 1,1 <sup>b</sup>	97,1 ± 0,5 <sup>b</sup>	71,6 ± 0,7 <sup>c</sup>	83,5 ± 0,6 <sup>c</sup>
10	66,3 ± 3,4 <sup>a</sup>	99,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	73,5 ± 1,0 <sup>bc</sup>	83,5 ± 0,5 <sup>c</sup>
20	69,9 ± 1,9 <sup>a</sup>	97,8 ± 0,6 <sup>ab</sup>	75,6 ± 1,1 <sup>b</sup>	88,2 ± 0,3 <sup>b</sup>
40	69,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	97,4 ± 0,6 <sup>ab</sup>	80,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	89,3 ± 0,2 <sup>b</sup>
60	67,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	87,8 ± 0,6 <sup>d</sup>	79,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	89,7 ± 1,2 <sup>b</sup>
80	69,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	91,1 ± 0,9 <sup>c</sup>	78,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	93,1 ± 0,1 <sup>a</sup>

NOTA: Dados estatísticos pelo programa JMP-Starter com nível de significância de 5 %. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente. FONTE: O autor (2014)

A concentração de NaCl na água residual das indústrias têxteis é um fator importante que pode interferir nas interações eletrostáticas e não eletrostáticas entre a superfície do adsorvente e o corante adsorvido, afetando a capacidade de biossorção, pois uma alta concentração de NaCl possibilita o mecanismo de troca de íons na solução. O Na<sup>+</sup> presente no sal, pode competir com os cátions presentes na estrutura de alguns corantes competindo pelos sítios de ligações no adsorvente (DOGAN; ABAK; ALKAN, 2008).

Além disso, os processos de tingimento e acabamento das indústrias têxteis utilizam grandes quantidades de sal, a fim de reduzir a solubilidade do corante, por aumentar o grau de agregação das moléculas. Alguns corantes necessitam entre 250 e 300 g/L de sal para aumentar o banho de exaustão do corante (AKSU; BALIBEK, 2010). Assim sendo, os organismos tolerantes a ambientes ricos em sal, apresentam vantagem e potencial para aplicação no tratamento deste tipo de efluente.

#### 4.8 EFEITO DA TEMPERATURA NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

Buscando-se avaliar o efeito da temperatura no processo de biossorção pelo micélio de *Paecilomyces* sp., a eficiência de descoloração foi avaliada para os corantes azul RB220, preto CR150, amarelo HE4R, vermelho HE3B na concentração de 100 mg/L, em diferentes condições de temperatura: 10, 20, 30, 40 e 50°C (KAUSHIK; MALIK, 2010), em um ensaio de atividade descorante, onde as amostras foram colocadas em incubadora refrigerada com agitador orbital sob agitação de 170 rpm por 90 min (FIGURA 14).

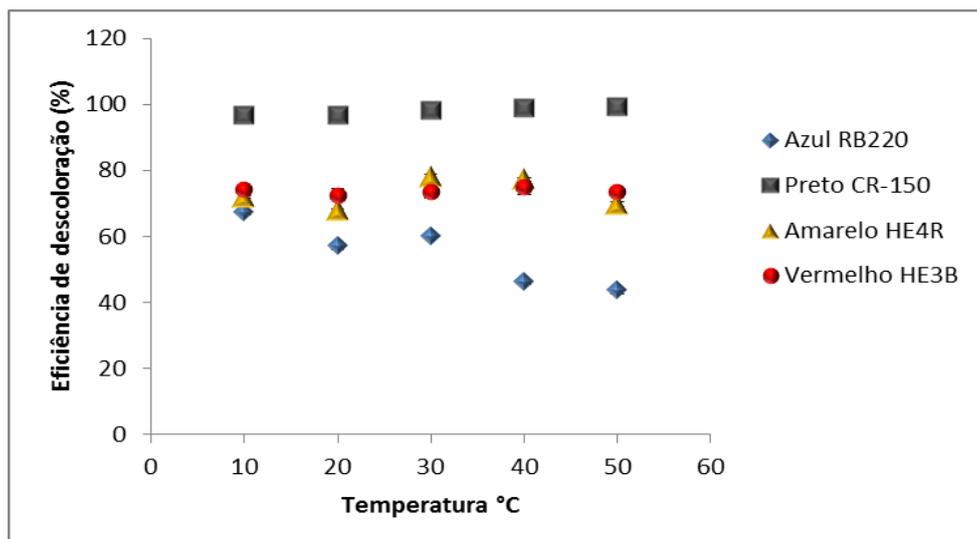


FIGURA 14 - EFEITO DA TEMPERATURA NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B PELA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: A biomassa foi tratada com NaOH 0,1 M por 1h sob agitação de 150 rpm, sendo posteriormente utilizada para o teste de atividade descorante em 90 min. O experimento foi conduzido com concentração de biossorvente de 3 mg e corantes na concentração de 100 mg/L. FONTE: O autor (2014)

Neste estudo, o efeito da temperatura na biossorção de quatro corantes foi analisado, observando-se que a eficiência de descoloração manteve-se constante com o aumento da temperatura até 50 °C para os corantes preto CR150, amarelo HE4R e vermelho HE3B. Já o corante azul RB220 apresentou um comportamento contrário diminuindo a eficiência de descoloração de 67 % em 10 °C para 43 % com o aumento crescente de temperatura. (TABELA 14).

TABELA 14 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp. FRENTE AOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B

Temperatura (°C)	Eficiência de descoloração (%) Azul RB220	Eficiência de descoloração (%) Preto CR150	Eficiência de descoloração (%) Amarelo HE4R	Eficiência de descoloração (%) Vermelho HE3B
10	67,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	96,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	71,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	74,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>
20	56,8 ± 1,0 <sup>c</sup>	96,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	68,0 ± 0,3 <sup>d</sup>	72,4 ± 0,4 <sup>c</sup>
30	59,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	98,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	78,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	73,2 ± 0,6 <sup>bc</sup>
40	46,0 ± 0,5 <sup>d</sup>	98,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	77,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	74,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
50	43,4 ± 1,0 <sup>e</sup>	99,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	69,7 ± 0,8 <sup>c</sup>	73,2 ± 0,5 <sup>bc</sup>

NOTA: Dados estatísticos pelo programa JMP-Starter com nível de significância de 5 %. Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente. FONTE: O autor (2014)

O efeito da temperatura no potencial de biossorção do fungo *Thamnidium elegans* foi avaliado por Akar, Arslan e Akar (2013) nas temperaturas de 10, 20 e 40 °C, sendo que a capacidade biossortiva se manteve em 191 mg de corante reativo vermelho 198 (RR198) por grama de micélio, não apresentando uma variação significativa entre as diferentes

temperaturas. Anjaneya *et al.* (2009) em um estudo com o fungo ascomiceto *Penicillium* sp. observaram o efeito de diferentes temperaturas (15- 45 °C) na biossorção do corante ácido violeta sendo que a capacidade biossortiva da biomassa aumentou de 3,7 mg/g para 5,67 mg/g com o aumento da temperatura de 15 °C para 30 °C, porém após 35 °C a capacidade biossortiva diminuiu drasticamente chegando a 0,42 mg/g na temperatura de 45 °C. O fato da eficiência de descoloração manter-se constante em função do aumento da temperatura pode ser considerado uma vantagem para o uso da biomassa fúngica.

#### 4.9 DESSORÇÃO DO CORANTE DO MICÉLIO DE *Paecilomyces* sp.

Os estudos de dessorção ajudam a elucidar a possibilidade de regeneração do adsorvente após seu uso, para reutilização, buscando-se um processo de biossorção eficiente e econômico (ANSARI; MOSAYEBZADEH, 2010). Certas substâncias químicas, como álcalis, ácidos e agentes quelantes, vêm sendo testados em processos de dessorção (BINUPRIYA *et al.*, 2008).

A dessorção do corante da biomassa micelial nos processos de descoloração foi avaliada pela exposição a diferentes tratamentos (FIGURA 15), onde as biomassas carregadas com os corantes: azul RB220, preto CR150, amarelo HE4R e vermelho HE3B após ensaio de atividade descorante em 90 min. foram lavadas com água destilada, para a remoção do corante não adsorvido, e em seguida submetidas ao ensaio de dessorção (ZHOU; BANKS, 1993) (FIGURA 16). Como controle foi utilizada água destilada.

Neste estudo, para todos os corantes, analisando separadamente os tempos de 1 h e 24 h, os resultados seguiram uma mesma tendência. O tratamento com NaOH 0,1 M se mostrou mais eficiente na dessorção dos corantes em relação ao tratamento com NaOH 1 M. Para o corante azul RB220, o tratamento por 1 h com NaOH 0,1 M teve uma eficiência de dessorção 0,8 vezes maior do que com NaOH 1 M (FIGURAS 15 e 16).

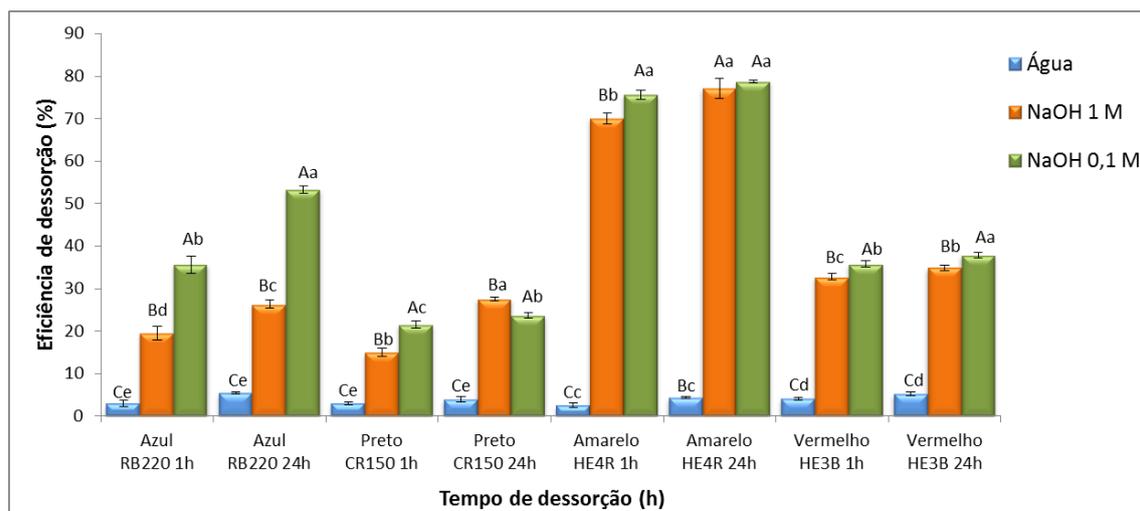


FIGURA 15 - DESSORÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R, VERMELHO HE3B DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: Os experimentos foram conduzidos com 3 mg de biossorbente, em tempo de contato de 1 h, e agitação de 170 rpm. A análise estatística foi feita separadamente para cada tempo de descoloração de cada corante (dados representados pelas letras maiúsculas) e também entre os tempos de 1 h e 24 h de cada corante (dados representados pelas letras minúsculas). Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente. FONTE: O autor (2014)

Dentre os corantes testados, a biomassa de *Paecilomyces* sp., com a solução de corante amarelo HE4R destacou-se sendo descolorida em média 75 % tanto com a concentração de NaOH 0,1 M, quanto 1 M, não apresentando diferença significativa pela análise estatística (Programa JMP-Stater) na eficiência de descoloração em 24 h, além de ser descolorida 16 vezes a mais do que o controle com água (TABELA 15).

TABELA 15 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DESSORÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, AMARELO HE4R E VERMELHO HE3B DA BIOMASSA MICELIAL DE *Paecilomyces* sp.

Tratamentos	Eficiência de descoloração (%) Azul RB220	Eficiência de descoloração (%) Preto CR150	Eficiência de descoloração (%) Amarelo HE4R	Eficiência de descoloração (%) Vermelho HE3B
H <sub>2</sub> O 1 h	3,0 ± 0,7 <sup>Ce</sup>	2,9 ± 0,3 <sup>Ce</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>Cc</sup>	4,0 ± 0,2 <sup>Cd</sup>
H <sub>2</sub> O 24 h	5,4 ± 0,2 <sup>Ce</sup>	3,9 ± 0,5 <sup>Ce</sup>	4,3 ± 0,2 <sup>Bc</sup>	5,2 ± 0,3 <sup>Cd</sup>
NaOH 0,1 M 1h	35,6 ± 1,9 <sup>Ab</sup>	21,5 ± 0,9 <sup>Ac</sup>	75,6 ± 1,0 <sup>Aa</sup>	35,7 ± 0,6 <sup>Ab</sup>
NaOH 0,1 M 24h	53,3 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	23,6 ± 0,5 <sup>Ab</sup>	78,7 ± 0,2 <sup>Aa</sup>	37,8 ± 0,6 <sup>Aa</sup>
NaOH 1 M 1h	19,5 ± 1,6 <sup>Bd</sup>	15,0 ± 0,9 <sup>Bd</sup>	70,1 ± 1,2 <sup>Bb</sup>	32,7 ± 0,7 <sup>Bc</sup>
NaOH 1 M 24h	26,3 ± 1,0 <sup>Bc</sup>	27,5 ± 0,3 <sup>Ba</sup>	77,1 ± 2,4 <sup>Aa</sup>	34,9 ± 0,6 <sup>Bb</sup>

NOTA: A análise estatística foi feita separadamente para cada tempo de descoloração de cada corante (dados representados pelas letras maiúsculas) e também entre os tempos de 1 h e 24 h de cada corante (dados representados pelas letras minúsculas). Tratamentos apresentando as mesmas letras não diferem estatisticamente. FONTE: O autor (2014)

De acordo com Kaushik e Malik (2009), a adição de substâncias alcalinas aumenta o pH, levando a repulsão eletrostática entre os locais de carga negativa e as moléculas aniônicas do corante, isto resulta na descoloração do corante a partir da biomassa.

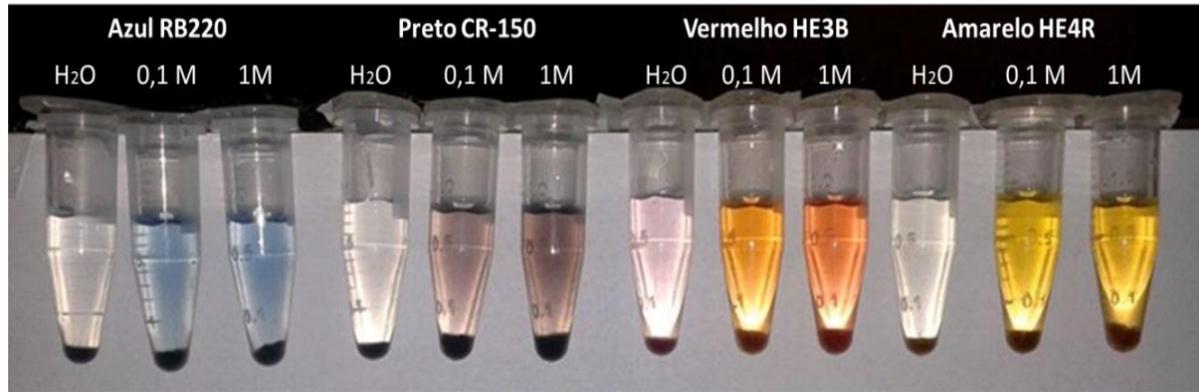


FIGURA 16 - DESSORÇÃO DOS CORANTES TÊXTEIS AZUL RB220, PRETO CR150, VERMELHO HE3B E AMARELO HE4R DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp. APÓS ENSAIO DE ATIVIDADE DESCORANTE

FONTE: O autor (2014)

Zeroual *et al.* (2006), utilizando NaOH 0,1 M como eluente, observou a dessorção de 90-100 % de azul de bromofenol da biomassa de *Rhizopus stolonifer*. Em um estudo com *Aspergillus foetidus*, Patel e Suresh (2008) obtiveram 90 % do reativo preto 5 (*Reactive Black 5*) dessorvido da biomassa micelial do fungo com solução de NaOH 0,1 M.

No entanto, altas concentrações de NaOH podem ser desvantajosas para processos de dessorção como encontrado por Patel e Suresh (2008) no uso de NaOH 1 M como eluente, tendo apenas 32 % de dessorção do corante (*reactive black 5*). Estes estudos sugerem que NaOH pode ser utilizado como eluente para processos de dessorção de corantes, apresentando o melhor efeito quando utilizado na concentração de 0,1 M

## 5 CONCLUSÕES PARTE I

- O crescimento e a capacidade biossorbitiva do fungo *Paecilomyces* sp. são alterados pela composição (fontes de carbono, nitrogênio e suplementação) do meio de cultivo;
- O crescimento do fungo em meio de cultivo contendo maltose 15 g/L e tartarato de amônio 100 mM gerou a biomassa com o melhor índice de biossorbitividade (0,55 mg);
- Indutores do aumento da parede celular fúngica (Cálcio e NAG) não promoveram melhora na capacidade biossorbitiva da biomassa;
- O micélio de *Paecilomyces* sp. apresentou capacidade biossorbitiva para corantes têxteis de diferentes classes e estruturas químicas, tendo uma maior eficiência de descoloração para os corantes ácidos (79 % para o preto CR150);
- Os tratamentos químicos com os ácidos HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> proporcionaram um aumento na eficiência de descoloração pelo micélio de *Paecilomyces* sp. (18 % e 24 % respectivamente), no entanto o maior aumento na descoloração de todos os corantes foi obtido com a biomassa tratada com álcali, NaOH (45 % para o amarelo HE4R);
- A eficiência de descoloração dos corantes Azul RB220, preto CR150, vermelho HE3B, e amarelo HE4R apresentou melhora com o aumento do tempo de contato entre a biomassa micelial e a solução de corante (15-150 min.) e o aumento na concentração de biossorbitivo (1-10 mg). Estes dados serão utilizados posteriormente para modelagem matemática do processo de biossorção;
- O processo de biossorção não foi alterado pela concentração de sal, mantendo a eficiência de descoloração acima de 70 % em todas as condições avaliadas.
- A eficiência de descoloração dos corantes testados neste trabalho foi mantida em relação ao aumento da temperatura (10- 50 °C);
- O tratamento da biomassa de *Paecilomyces* sp. com solução 0,1 M de NaOH mostrou-se mais eficiente no processo de biossorção dos corantes testados, biossorbitando 75 % no caso do corante amarelo HE4R em relação ao controle.

## PARTE II

### 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO REFERENTES À CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES DE PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

Buscando-se analisar a estrutura e a composição dos polissacarídeos de parede celular do fungo filamentosso, halotolerante, *Paecilomyces* sp., para posteriormente avaliar o envolvimento destes no processo de biossorção de corantes, nesta etapa do trabalho, o fungo foi cultivado em frascos contendo 250 mL de MMS líquido. Como fonte de carbono foi utilizada maltose 15 g/L e como fonte de nitrogênio o tartarato de amônio 100 mM, sendo estas condições, o tempo de cultivo e a concentração de inóculo, descritos anteriormente (Itens 4.1 pág. 34 e 4.2 pág. 48 dos resultados).

Inicialmente a biomassa foi retirada do cultivo e lavada exaustivamente com água para a remoção dos exopolissacarídeos produzidos, e dos açúcares presentes no meio de cultivo. O procedimento de lavagem foi repetido até que a água de lavagem apresentasse resultado negativo para carboidratos totais (DUBOIS, 1956). Posteriormente, a biomassa foi submetida a sucessivas extrações aquosa e alcalina, a partir das quais foram analisados os componentes polissacarídicos extraídos da parede celular fúngica.

Como os fungos foram crescidos em partidas diferentes, primeiramente foram feitas hidrólises da biomassa bruta de cada partida (C1 a C7), sendo a análise da composição monossacarídica feita por CG-EM (TABELA 16).

De acordo com os resultados obtidos pela composição monossacarídica da biomassa bruta, todas as partidas apresentaram glc (~50 %) e man (~42 %) como monossacarídeos majoritários e menores proporções de galactose (~6 %) e ara (~1 %) (TABELA 16).

Assim, a biomassa dos diferentes cultivos foi, posteriormente, congelada, liofilizada e reunida, sendo submetida a sucessivas extrações aquosa e alcalina, a partir das quais foram analisados os componentes polissacarídicos extraídos da parede celular fúngica.

TABELA 16 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA BIOMASSA BRUTA DO FUNGO *Paecilomyces* sp.

Biomassa bruta <sup>a</sup>	Composição monossacarídica <sup>b</sup> (%) <sup>c</sup>			
	Ara	Man	Gal	Glc
C1	1	37	1	61
C2	1	50	2	47
C3	1	36	12	51
C4	ND	44	2	54
C5	1	37	2	60
C6	ND	35	22	43
C7	1	57	2	40

<sup>a</sup> Amostra da biomassa bruta de *Paecilomyces* sp. C1 a C7 correspondem a partidas de crescimento nas mesmas condições, porém em dias diferentes.

<sup>b</sup> Analisado por CG-EM após hidrólise ácida total (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% a 100 °C por 15 h), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>c</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

FONTE: O autor (2014)

## 6.1 EXTRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

A biomassa seca de *Paecilomyces* sp. (15,35 g) foi macerada e submetida à extração aquosa sob refluxo em banho fervente (~98 °C) por 4 h. O sobrenadante foi filtrado ainda quente e centrifugado. Este processo foi repetido por mais seis vezes, sendo os extratos reunidos e concentrados por rotaevaporação. O extrato aquoso foi precipitado com etanol, centrifugado, dialisado contra água corrente em membrana de 6-8 kDa por 24 h, congelado e liofilizado, gerando o extrato aquosa à quente, HW (1,04 g) (FIGURA 17).

O resíduo proveniente das extrações aquosas foi submetido a cinco extrações alcalinas com hidróxido de potássio (KOH) 2 M, na presença de borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) por 4 h em banho fervente (~98 °C), sob refluxo. Os extratos foram filtrados ainda quentes e neutralizados com ácido acético, dialisados contra água corrente em membrana de 6-8 kDa por 24 h. Os extratos obtidos foram reunidos, congelados e liofilizados, gerando o extrato alcalino K2 (2,90 g) (FIGURA 17).

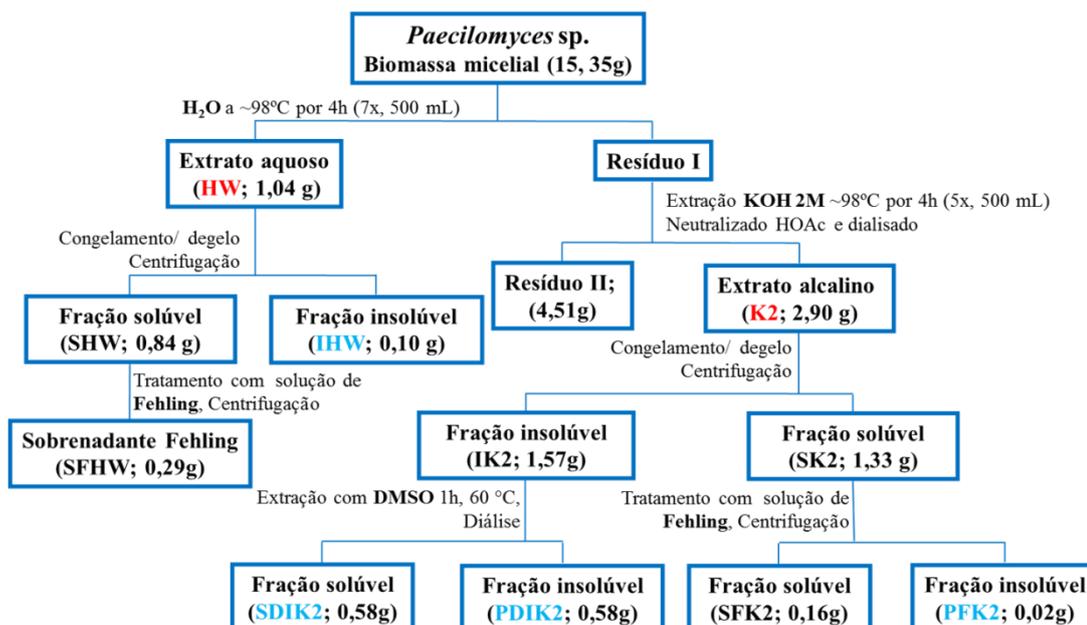


FIGURA 17 - FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS, A PARTIR DA BIOMASSA MICELIAL DO FUNGO *Paecilomyces* sp.

NOTA: Siglas na cor vermelha correspondem ao extrato proveniente da extração aquosa (HW) e alcalina (K2), e siglas na cor azul correspondem às frações polissacarídicas insolúveis usadas posteriormente para ensaios de biossorção. FONTE: O autor (2014)

## 6.2 PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

As frações correspondentes aos extratos aquoso (HW) e alcalino (K2) foram analisadas quanto à sua composição monossacarídica. A fração correspondente ao extrato aquoso (HW) mostrou ser composta pelos monossacarídeos Man (49 %), Gal (37 %) e Glc (14 %). Enquanto o extrato alcalino (K2) mostrou ser composto por Gal (46 %), Man (38 %), e Glc (16 %) (Tabela 17).

Ambos os extratos foram então submetidos a passos sequenciais de purificação, sendo o primeiro, congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984). Ao final do processo, os materiais foram congelados e liofilizados, originando para os extratos HW e K2, as frações solúveis SHW (0,84 g) e SK2 (1,33 g), e insolúveis em água fria, IHW (0,10 g) e IK2 (1,57 g), respectivamente.

A fração SHW tem como componentes monossacarídicos Man (52 %), Gal (40 %) e Glc (8 %), e a fração IHW é composta pelos monossacarídeos Glc (84 %), Man (10 %), e Gal, (6 %) (TABELA 17).

TABELA 17 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

Fração	Rendimento (g%)	Composição monossacarídica <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>			
		Ara	Man	Gal	Glc
HW	6,8	-	49	37	14
SHW	80,7	-	52	40	8
SFHW	34,5	-	50	40	10
IHW	7,1	-	10	6	84
K2	18,9	-	38	46	16
SK2	45,8	-	26	54	20
SFK2	12,0	-	29	51	19
RSFK2	37,5	-	46	36	18
ESFK2	50,0	8	30	42	20
PFK2	1,5	-	28	49	23
IK2	54,1	-	25	27	48
SDIK2	36,9	-	17	26	57
PDIK2	36,9	-	30	17	53

<sup>a</sup> Analisado por CG-EM após hidrólise ácida total (TFA 1M a 100 °C por 15 h), redução (NABH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>b</sup> Percentual relativo às áreas de todos os picos.

FONTE: O autor (2014)

A análise de metilação da fração IHW, insolúvel em água fria, proveniente do congelamento e degelo do extrato aquoso a quente (HW) mostrou-se principalmente composta por unidades (1→4)-ligadas (55,2 %) e (1→3)-ligadas (33,4 %) (TABELA 18). Os dados de metilação em conjunto com a composição monossacarídica, sugerem que a estrutura presente na fração IHW seja a de uma galactomanoglucana de estrutura complexa.

TABELA 18 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO IHW OBTIDA DA PAREDE CELULAR DO FUNGO *Paecilomyces* sp. ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO AQUOSA.

Alditol acetatos parcialmente metilados <sup>1</sup>	Tr (min) <sup>2</sup>	Fração (mol%)	Tipo de ligação <sup>3</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Manose	7,858	3,01	Manose-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Galactose	7,924	3,08	Galactose-(1→
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glucose	9,760	33,39	→3)-Glucose-(1→
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Manose	9,940	1,26	→3)-Manose-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Manose	10,412	0,88	→4)-Manose-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glucose	10,688	55,18	→4)-Glucose-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Glucose	14,649	1,84	→4,6)-Glucose-(1→
3,4-Me <sub>2</sub> -Manose	14,828	1,4	→2,6)-Manose-(1→

<sup>1</sup> Analisado em CG-EM após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaBD<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>2</sup> Tr – Tempo de retenção.

<sup>3</sup> Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

FONTE: O autor (2014)

A fração IHW também foi analisada por RMN-<sup>13</sup>C, apresentando um espectro com pelo menos três sinais de <sup>13</sup>C na região anomérica ( $\delta$ 100,9, 100,4 e 99,4) (FIGURA 18). A ausência de sinais de <sup>13</sup>C em ppm mais alto que  $\delta$  100,9 sugere que as unidades monossacarídicas presentes nesta fração estejam na configuração  $\alpha$  (GORIN; MAZUREK, 1975).

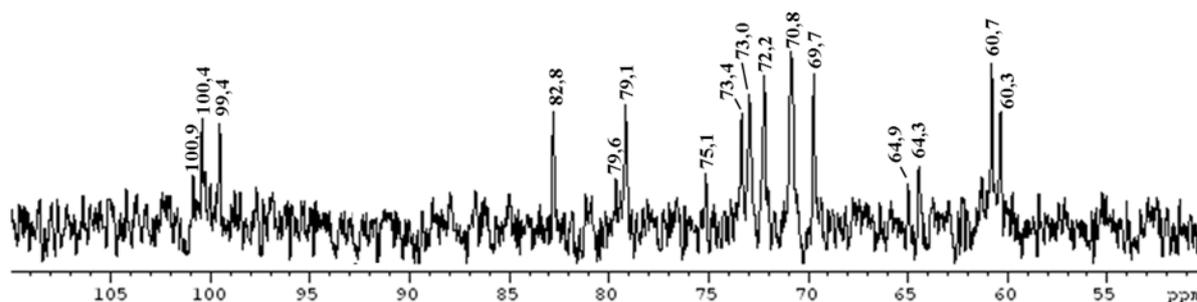


FIGURA 18. ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO IHW OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: Amostra solubilizada em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (30 mg/0,4 ml), analisada a 70 °C; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm). FONTE: O autor (2014)

O sinal em  $\delta$  82,8 sugere a presença de unidades (1→3)-ligadas, enquanto que os sinais em  $\delta$  79,6 e 79,1, a presença de unidades (1→4)-ligadas (FIGURA 18). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos através da análise de metilação (TABELA 18). De acordo com a literatura, polímeros de  $\alpha$ -(1→3)-glucana são geralmente encontrados em frações insolúveis em água para os fungos ascomicetos (JOHNSTON, 1965; DOMENECH *et*

al., 1994). No entanto, análises adicionais são necessárias para finalizar a caracterização estrutural do heteropolissacarídeo presente na fração IHW.

Por sua vez, a fração solúvel SHW, também proveniente do congelamento e degelo do extrato aquoso a quente (HW) foi analisada por HPSEC-MALLS-RI apresentando um perfil heterogêneo obtido a partir da detecção por índice de refração, e pela análise de espalhamento de luz também é possível detectar uma família de moléculas com alta massa molecular, porém em concentração baixa não detectada pelo índice de refração (FIGURA 19).

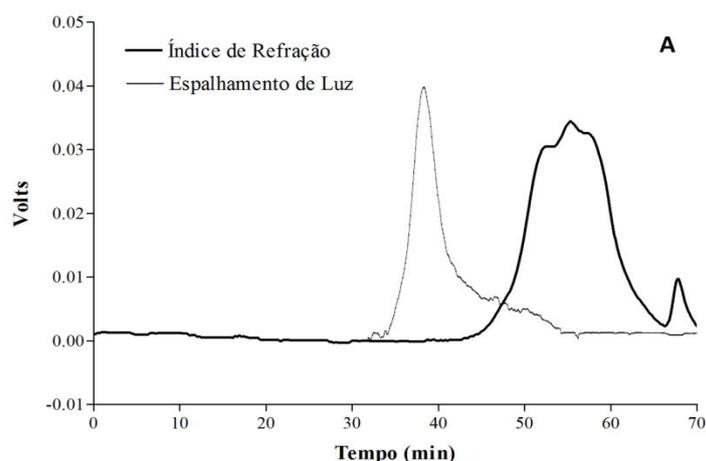


FIGURA 19 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO SHW, OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: Amostra solubilizada em solução 0,1 mol/L de  $\text{NaNO}_2$  (nitrito de sódio) e 0,2 g/L  $\text{NaN}_3$  (azida de sódio), filtrada em membrana com poro de 0,22 $\mu\text{m}$ . FONTE: O autor (2014)

Sendo assim, a fração SHW foi submetida ao tratamento com solução de Fehling (JONES; STOODLEY 1965). O tratamento com solução de Fehling para a fração SHW gerou apenas uma fração solúvel, denominada SFHW (0,29 g) (FIGURA 20).

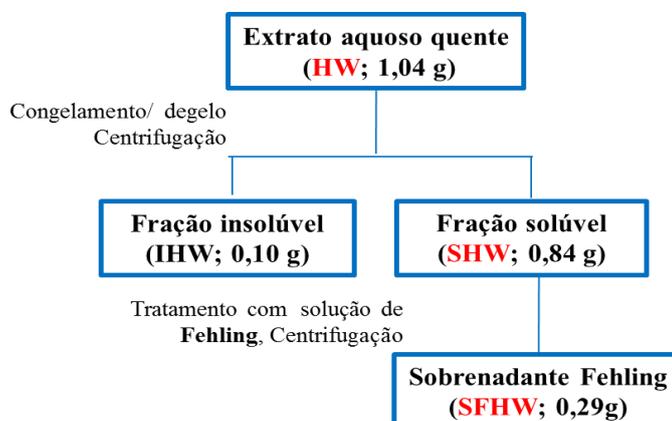


FIGURA 20 – FRACIONAMENTO POR PRECIPITAÇÃO COM SOLUÇÃO DE FEHLING DA FRAÇÃO SHW OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.  
FONTE: O autor (2014)

A fração solúvel, SFHW, obtida a partir da purificação da fração SHW por solução de Fehling, apresentou em sua composição os monossacarídeos Man (50 %), Gal (40 %), Glc (10 %) (TABELA 17, pág. 69).

Quando submetida à análise por HPSEC-MALLS-RI (FIGURA 21), a fração SFHW mostrou um perfil homogêneo, a partir da detecção por índice de refração, com massa molecular ponderal média em peso ( $M_w$ ) estimada de  $1.297 \times 10^4$ .

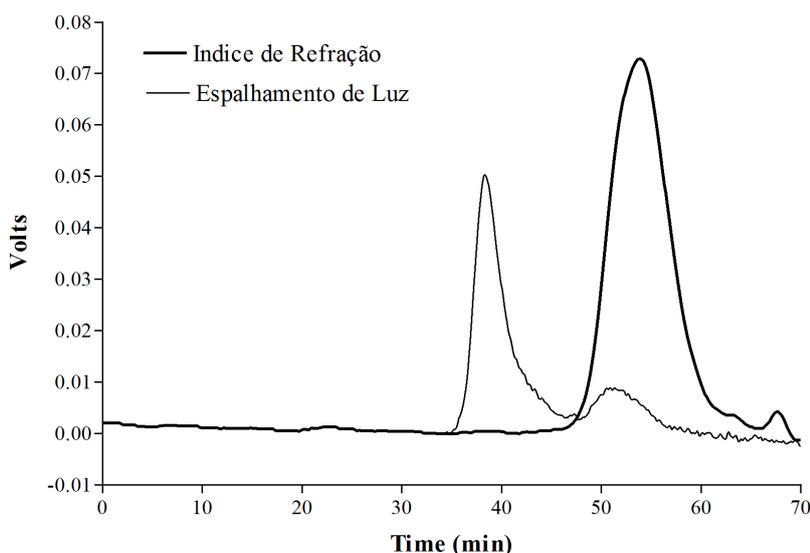


FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO SFHW OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.  
NOTA: Amostra solubilizada em solução 0,1 mol/L de  $\text{NaNO}_2$  (nitrito de sódio) e 0,2 g/L  $\text{NaN}_3$  (azida de sódio), filtrada em membrana com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . FONTE: O autor (2014)

O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração SFHW apresentou vários sinais da região de carbono anomérico, indicando a presença de um heteropolissacarídeo de manose, galactose e glucose, podendo ser de acordo com a composição monossacarídica, uma glucogalactomanana de estrutura complexa.

Os sinais de C1 em campo baixo, em  $\delta$  107,7 e 106,9 (FIGURA 22) indicam que as unidades de galactose estejam na conformação furanosídica (Gal<sub>f</sub>), com configuração  $\beta$  (GORIN; MAZUREK, 1975; DOMENECH *et al.*, 1994), e podem ser atribuídos ao C1 das unidades de  $\beta$ -D-galactofuranose 5-*O* e 5,6-di-*O*-substituídas, respectivamente. Outros sinais em  $\delta$  81,7 (C4), 81,3 (C2), 76,6 (C3), 75,5 (C5 *O*-substituído) e 61,0 (C6) são característicos da presença de unidades de  $\beta$ -D-Gal<sub>f</sub>-(1 $\rightarrow$ 5)-ligadas (GORIN; MAZUREK, 1975; LEAL *et al.*, 1993; AHRAZEM *et al.*, 2007; CORDEIRO *et al.*, 2005, 2008; RUTHES *et al.*, 2010).

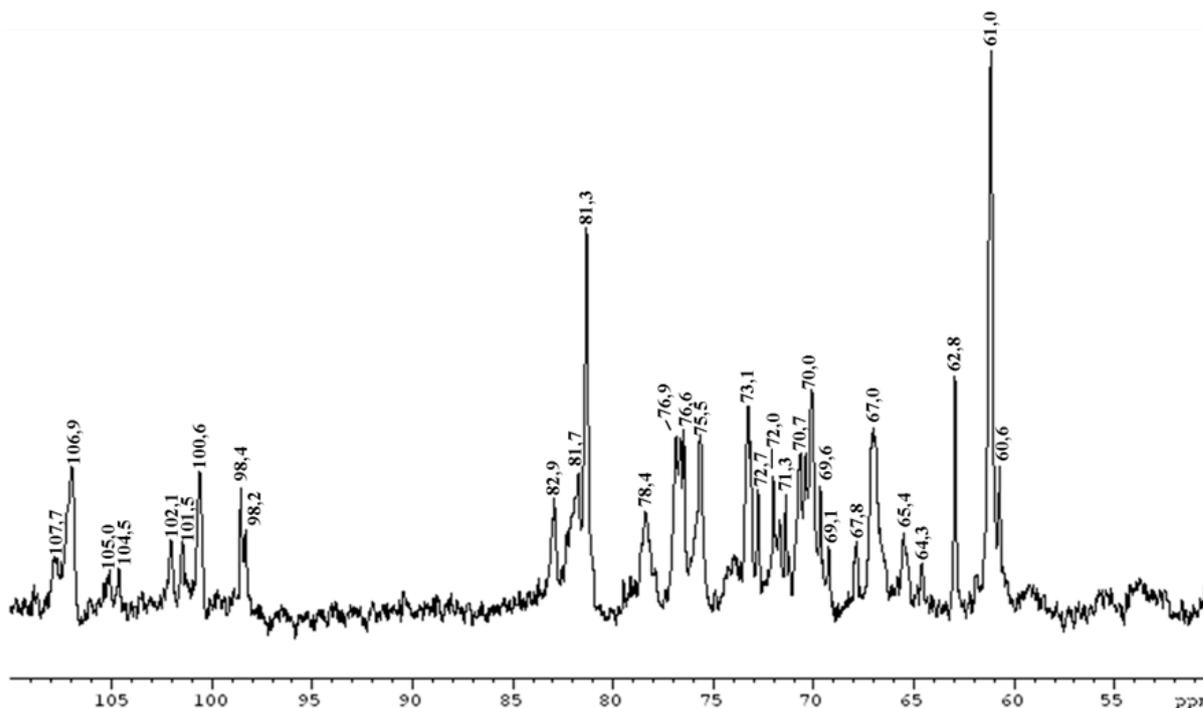


FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO SFHW OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp. FONTE: O autor (2014)

Além dos sinais típicos da presença de cadeias de β-D-galactofuranose (1→5)-ligadas, 6-*O*-substituídas, também podem ser observados sinais em δ 105,0 e 104,5 (FIGURA 22) os quais podem ser atribuídos à presença de terminais não redutores de α-D-galactofuranose (CHAMBAT *et al.*, 1978; SASSAKI *et al.*, 2005; PRIETO *et al.*, 2008; SMIDERLE *et al.*, 2013).

Outros sinais presentes na região anomérica do espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração SFHW são atribuídos a unidades com configuração α, em δ 100,6, 98,4 e 98,2 (FIGURA 22). Baseado em dados de literatura o sinal em δ 100,6 refere-se a unidades de α-D-manopirranose (DOMENECH *et al.*, 1994,1996; SMIDERLE *et al.*, 2013). Enquanto aqueles em, δ 98,4 e 98,2 podem ser atribuídos a unidades de α-D-galactopirranose (GORIN; IACOMINI, 1985; PERRY; MACLEAN, 2004; SMIDERLE *et al.*, 2008; 2013), e os sinais em δ 102,1 e 101,5 a unidades de β-D-glucopirranose (SMIDERLE *et al.*, 2013).

No entanto, para a determinação da estrutura do heteropolissacarídeo presente nesta fração (SFHW), a análise de metilação, bem como experimentos adicionais de RMN tornam-se indispensáveis, uma vez que se trata de um polímero de estrutura bastante complexa, e que os principais assinalamentos foram feitos apenas tendo como base dados de literatura.

Com relação às frações derivadas do extrato alcalino (K2), a fração SK2, solúvel em água mostrou ser composta por Gal (54 %), Man (26 %) e Glc (20 %), enquanto a fração IK2 insolúvel em água apresentou os monossacarídeos Glc (48 %) Gal (27 %), Man (25 %) (TABELA 17, pág. 69).

Domenech *et al.* (1996) em um trabalho com diferentes cepas de *Paecilomyces furnosoroseus* e *Paecilomyces farinosus* obteve através da análise da composição monossacarídica por GLC também os monossacarídeos Man (28,5-53 %), Glc (17,7-38,1 %) e Gal (8,3-31,6 %) para frações extraídas com álcali (NaOH) solúveis em água. Já para frações insolúveis em água os autores obtiveram uma maior quantidade de Glc (47,6-69,9 %) e menores quantidades de Man (6,5-15,4 %) e Gal (5,7-12,2 %). Em um estudo com o fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, Silva *et al.* (2008) obtiveram 91 % de glucose em uma fração extraída com KOH insolúvel em água (K1P). No presente trabalho, a fração insolúvel em água IK2 também apresentou glucose (48 %) como principal monossacarídeo.

A fração SK2 apresentou um perfil heterogêneo, quando analisada por HPSEC-MALLS-RI (FIGURA 23).

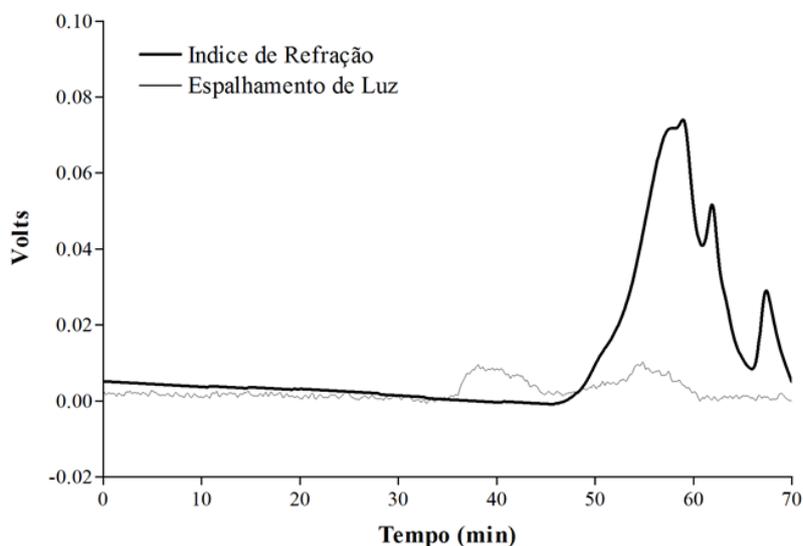


FIGURA 23 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO SK2, OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.  
NOTA: Amostra solubilizada em solução 0,1 mol/L de NaNO<sub>2</sub> (nitrito de sódio) e 0,2 g/L NaN<sub>3</sub> (azida de sódio), filtrada em membrana com poro de 0,22 µm. FONTE: O autor (2014)

Sendo assim, a fração SK2 foi submetida ao tratamento com solução de Fehling (JONES; STOODLEY 1965). A partir deste tratamento foram originadas duas novas frações, uma solúvel, SFK2 (0,16 g) e um complexo cúprico insolúvel, PFK2 (0,02 g) (FIGURA 24).

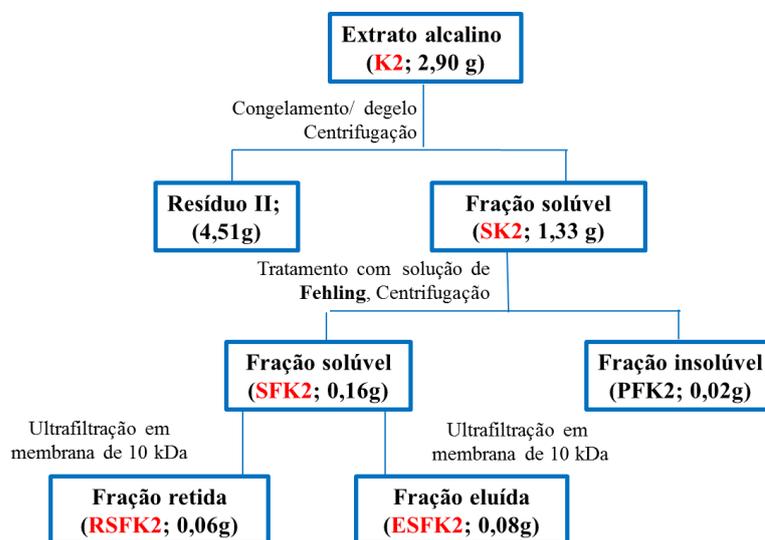


FIGURA 24 – FRACIONAMENTO POR PRECIPITAÇÃO COM SOLUÇÃO DE FEHLING DA FRAÇÃO SK2 OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp.  
FONTE: O autor (2014)

A fração PFK2 apresentou Gal (49 %) Man (28 %), e Glc (23 %) em sua composição monossacarídica, mas devido ao baixo rendimento (0,02 g), não foi dada continuidade à caracterização estrutural do polissacarídeo presente nesta fração.

A fração SFK2, composta pelos monossacarídeos Gal (52 %) Man (29 %), e Glc (19 %) (TABELA 17, pag. 69) apresentou um perfil de eluição heterogêneo (FIGURA 25A) e foi submetida à ultrafiltração em membrana de 10 kDa, originando uma fração retida RSFK2 (0,06 g) e outra eluída ESFK2 (0,08 g). Ambas as frações foram analisadas quanto à composição monossacarídica, homogeneidade e por espectroscopia de RMN (HSQC e HSQC acoplado).

A fração RSFK2 apresentou em sua composição os monossacarídeos Man (46 %), Gal (36 %), e Glc (18 %), sugerindo a presença de glucogalactomanana e a fração ESFK2 os monossacarídeos Gal (42 %), Man (30 %), Glc (20 %) e Ara (8 %) sugerindo a presença de uma glucomanogalactana. As duas frações mostraram-se homogêneas, pela análise de HPSEC-MALLS-RI (FIGURA 25B e C, respectivamente), pelo índice de refração, após serem submetidas à ultrafiltração. Estes resultados mostram que o processo de ultrafiltração foi eficiente para a purificação destas frações.

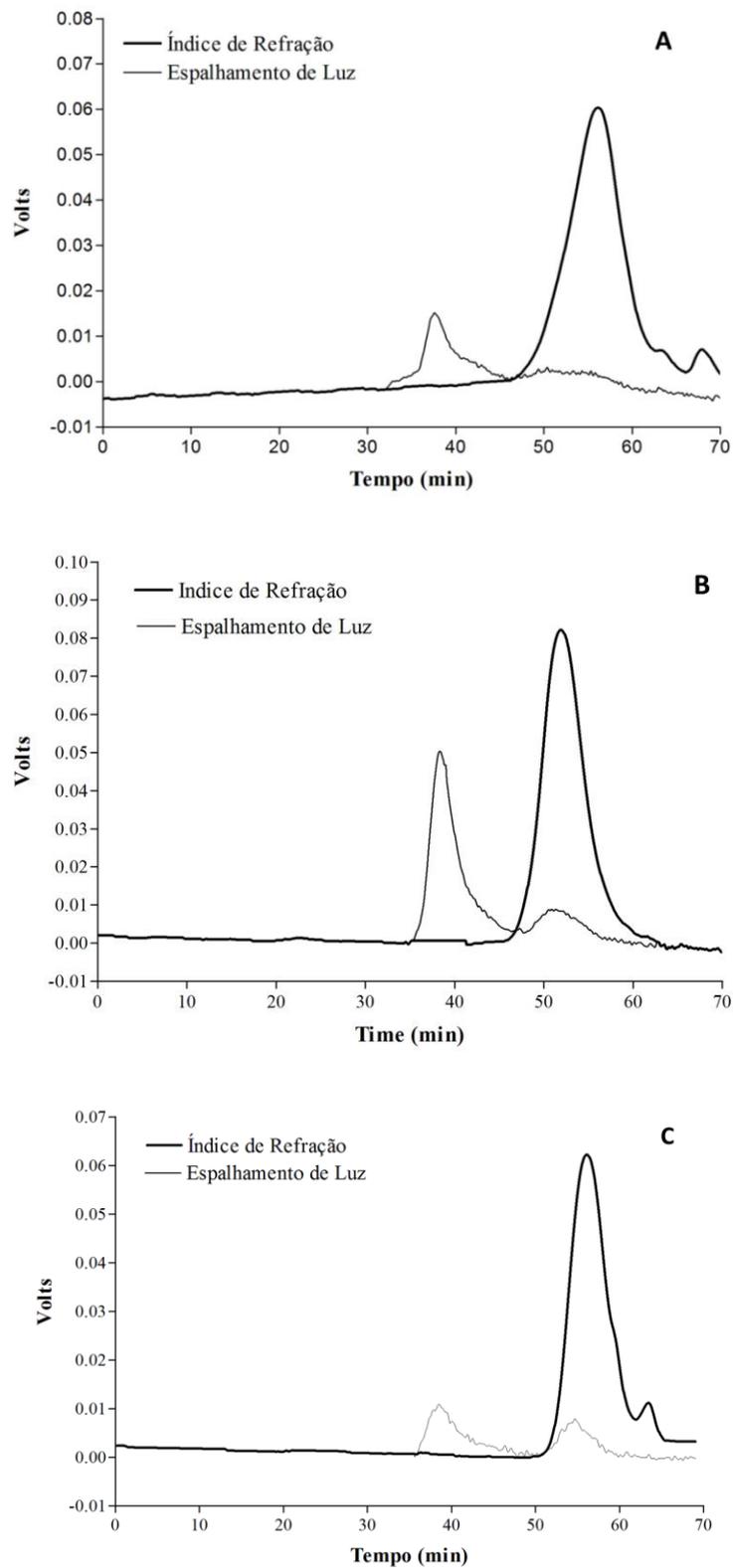


FIGURA 25 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RI DAS FRAÇÕES (A) SFK2, (B) RSFK2, (C) ESK2 OBTIDAS A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp. NOTA: Amostras solubilizadas em solução 0,1 mol/L de  $\text{NaNO}_2$  (nitrito de sódio) e 0,2 g/L  $\text{NaN}_3$  (azida de sódio), filtradas em membrana com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . FONTE: O autor (2014)

A fração RSFK2 apresentou uma massa molecular ponderal média em peso ( $M_w$ ) estimada de  $1.250 \times 10^4$ .

Analisando o espectro de HSQC podem ser observados sinais (C1/H1) na região anomérica em  $\delta$  107,6/5,03, 107,0/5,21, 105,1/5,19, 104,7/5,15, 101,5/5,13, 100,9/5,20, 100,7/5,25, 98,4/4,97, 98,2/5,10 (FIGURA 26A). O grande número de sinais na região anomérica sugere que a fração RSFK2 é composta por um heteropolissacarídeo (glucogalactomanana) de estrutura bastante complexa.

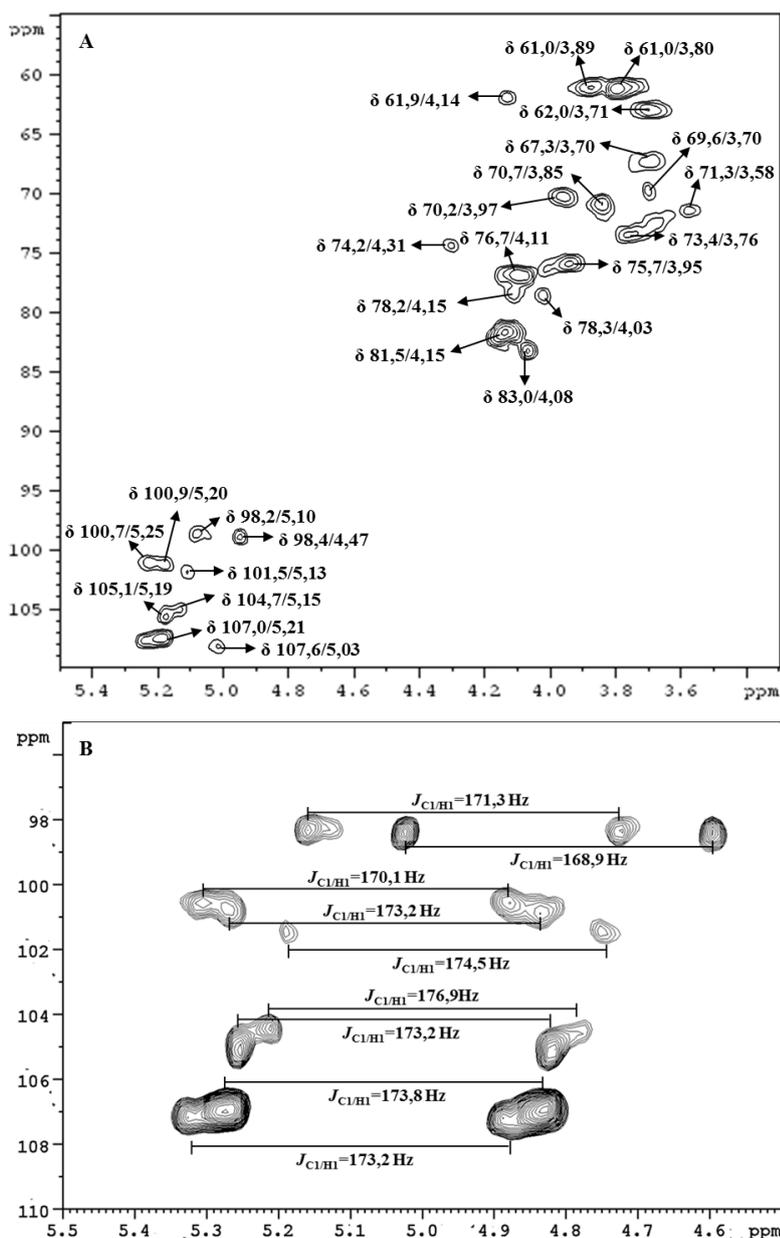


FIGURA 26 - ESPECTRO DE  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DA FRAÇÃO RSFK2 (A), OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp., E DETALHE DA REGIÃO ANOMÉRICA DO HSQC ACOPLADO (B)

NOTA: Amostra solubilizada em  $\text{D}_2\text{O}$  (6 mg/0,4 ml), analisada a  $50^\circ\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm). FONTE: O autor (2014)

Os sinais em  $\delta$  107,6/5,03 e 107,0/5,21 podem ser atribuídos às unidades de galactose na conformação furanosídica e configuração  $\beta$  (GORIN; MAZUREK, 1975). Os sinais em  $\delta$  105,1/5,19 e 104,7/5,15 sugerem a presença de unidades também de galactofuranose, mas com configuração  $\alpha$ , a qual foi confirmada pelas constantes de acoplamento ( $J_{C-1,H-1}$ ) de 173,2 e 176,9 Hz, respectivamente (FIGURA 26B) (CHAMBAT *et al.*, 1978; PRIETO *et al.*, 2008; SASSAKI *et al.*, 2005; SMIDERLE *et al.*, 2013). Os outros sinais observados em campo mais alto de C1/H1 em  $\delta$  101,5/5,13, 100,9/5,20, 100,7/5,25, 98,4/4,97, 98,2/5,10 podem ser atribuídos a unidades de manopirranose, galactopirranose e glucopirranose com configurações  $\alpha$ . A configuração  $\alpha$  foi confirmada pelos valores das constantes de acoplamento obtidas através da análise do HSQC acoplado,  $J_{C-1,H-1}$  de 174,5, 173,2, 170,1, 168,9 e 171,4 Hz, respectivamente (FIGURA 26B).

No entanto, para a determinação da estrutura do heteropolissacarídeo presente nesta fração (RSFK2), a análise de metilação, bem como experimentos adicionais de RMN tornam-se indispensáveis, uma vez que se trata de um polímero de estrutura bastante complexa, e que os principais assinalamentos foram feitos apenas tendo como base dados de literatura.

A fração eluída no processo de ultrafiltração, ESFK2 apresentou uma massa molecular ponderal média em peso ( $M_w$ ) estimada de  $1.209 \times 10^4$ .

Analisando o espectro de HSQC podem ser observados sinais (C-1/H-1) na região anomérica em  $\delta$  108,1/5,33, 107,8/5,26 e 99,3/5,03 (FIGURA 27A). Os sinais em  $\delta$  108,1 e 107,8 podem ser atribuídos às unidades de arabinose e galactose, presentes na conformação furanosídica, nas configurações  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente (GORIN; MAZUREK, 1975).

Os valores das constantes de acoplamento ( $J_{C-1,H-1}$ ), determinados através do experimento de HSQC acoplado (FIGURA 27B), confirmaram estes dados, uma vez que apresentam  $J_{C-1,H-1}$  de 173,5, 174,8 e 170,2 Hz, respectivamente, indicando configuração  $\alpha$  para as unidades representadas pelos sinais em  $\delta$  108,1 e 99,3 e  $\beta$  para as unidades representadas pelo sinal em  $\delta$  107,8 (PERLIN; CASU, 1969).

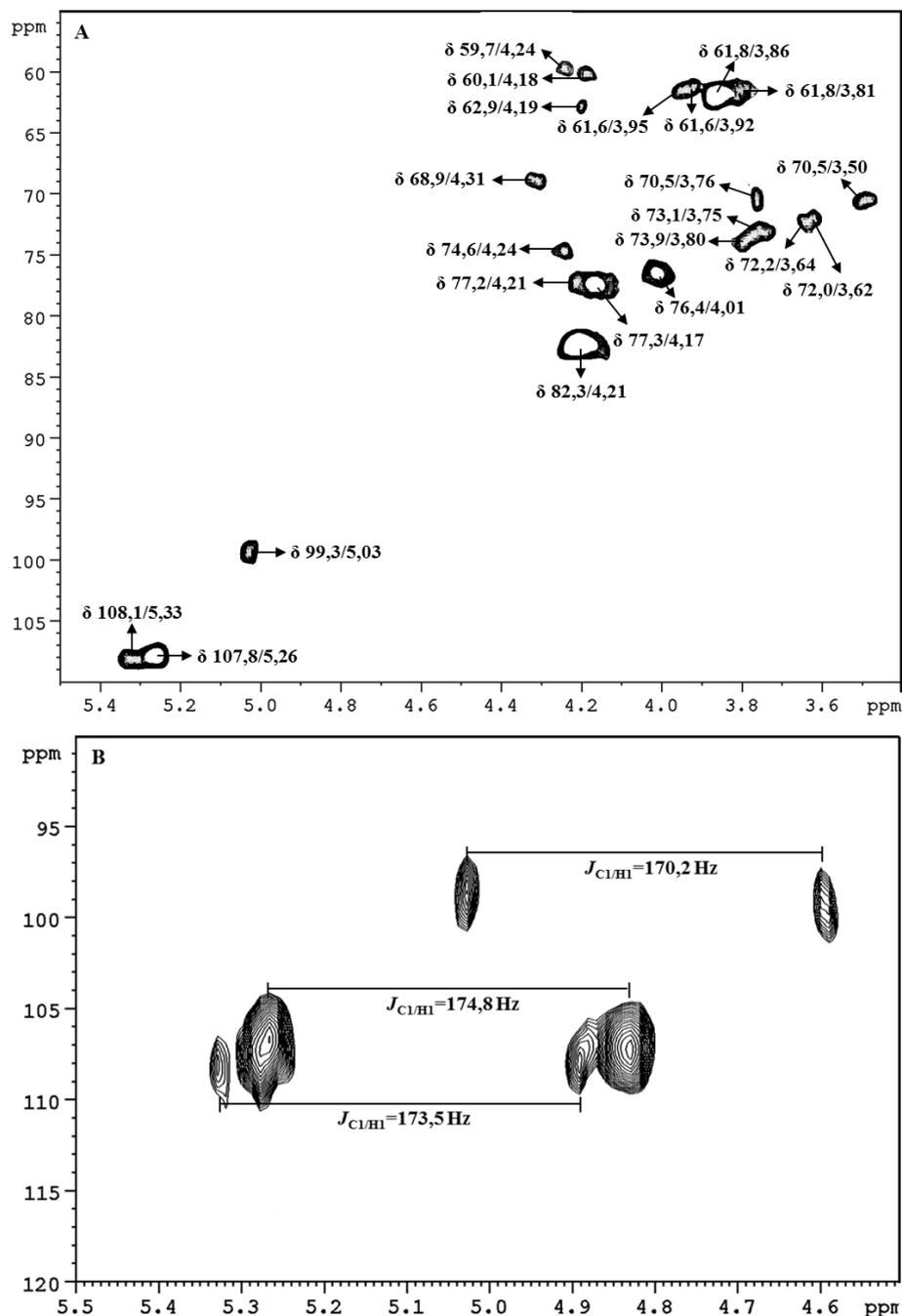


FIGURA 27 - ESPECTRO DE  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DA FRAÇÃO ESK2 (A), OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE *Paecilomyces* sp., E DETALHE DA REGIÃO ANOMÉRICA DO HSQC ACOPLADO (B)

NOTA: Amostra solubilizada em  $\text{D}_2\text{O}$  (8 mg/0,4 ml), analisada a 50 °C; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm). FONTE: O autor (2014)

No entanto, para a determinação da estrutura do heteropolissacarídeo presente na fração eluída (ESFK2), a análise de metilação, bem como experimentos adicionais de RMN tornam-se indispensáveis, para a determinação de sua estrutura química.

Todas as frações polissacarídicas obtidas de parede celular do fungo *Paecilomyces* sp. mostraram ser compostas pelos monossacarídeos manose, galactose e glucose, variando na proporção destes monossacarídeos e os tipos de ligação.

Yu *et al.* (2009), em um trabalho com o fungo ascomiceto *Cordyceps militaris*, a partir de extração alcalina com NaOH obteve uma fração solúvel (CBP-1) composta por glucomanogalactana, já Smiderle *et al.* (2013) também em estudo com uma espécie do gênero *Cordyceps*, *Cordyceps militaris*, observaram a estrutura de glucogalactomanana em uma fração extraída com álcali (KOH).

A fração insolúvel (IK2) proveniente da purificação por congelamento e degelo do extrato alcalino K2, apresentou glc (48 %) gal (27 %) e man (25 %), como componentes monossacarídicos (TABELA 17, pág. 69). Como esta fração se mostrou insolúvel foi submetida a uma extração com dimetilsulfóxido (DMSO), gerando uma fração solúvel SDIK2 (0,58 g) e outra insolúvel em DMSO, PDIK2 (0,58 g) (FIGURA 28).

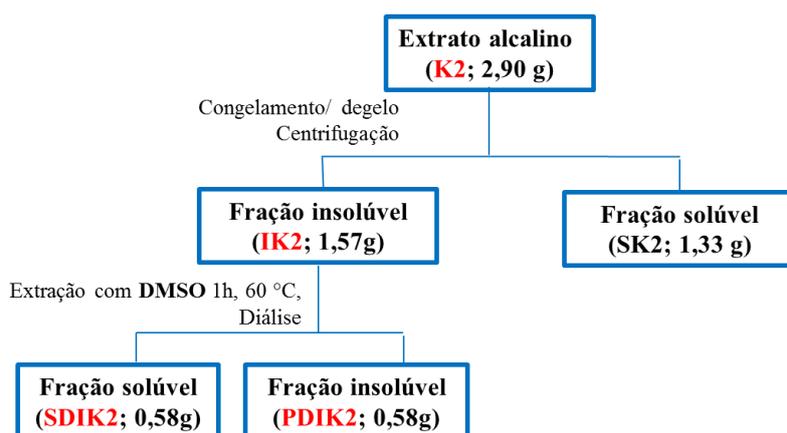


FIGURA 28 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO COM DMSO DA FRAÇÃO IK2, OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO ALCALINA  
FONTE: O autor (2014)

A fração SDIK2 tem como componentes monossacarídicos Glc (57 %), Gal (26 %) e Man (17 %), mas quando analisada por RMN-<sup>13</sup>C (dados não mostrados) foram observados apenas sinais referentes à presença de proteína. A fração PDIK2, por sua vez, apresentou Glc (53 %), Man (30 %) e Gal (17 %), quando analisada sua composição monossacarídica (TABELA 17, pág. 69).

Como a fração insolúvel PDIK2 apresentou um resultado interessante, quando a sua capacidade biossortiva foi avaliada, resultado apresentado a seguir (item 7, pág. 82), e assim como a fração SDIK2, quando analisada por RMN-<sup>13</sup>C (dados não mostrados), apresentou apenas sinais referentes à presença de proteína, utilizando Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> como solvente.

Buscando um solvente alternativo, foi obtido espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ , ainda com pouca definição dos sinais, quando utilizada uma mistura de  $\text{D}_2\text{O}$  e  $\text{NaOH}$  (FIGURA 29).

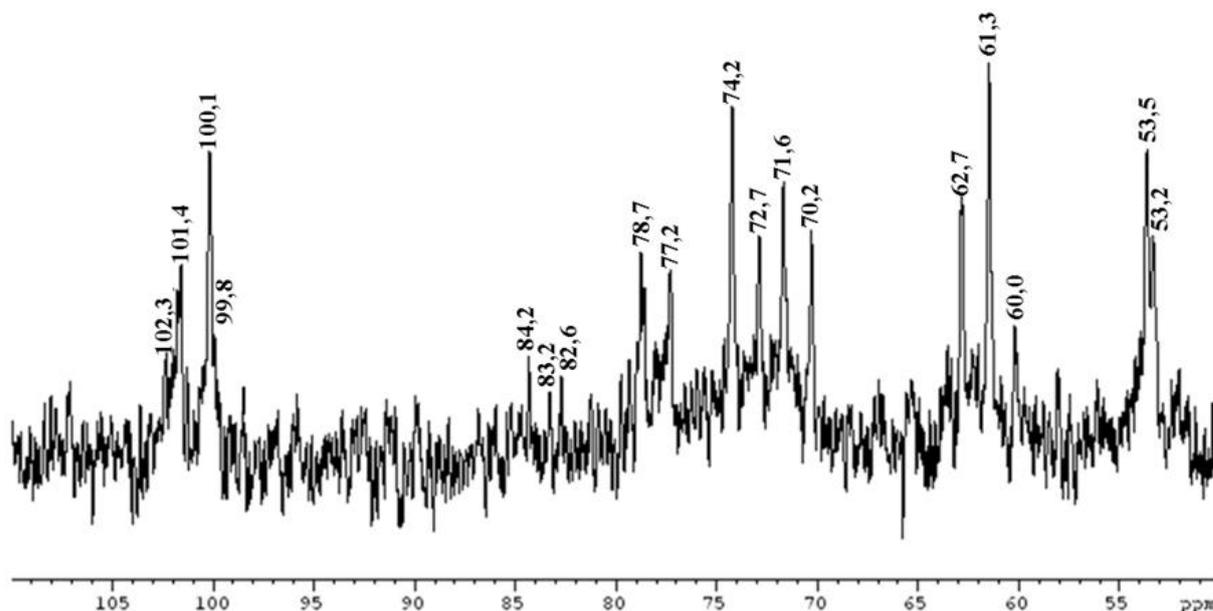


FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO PDIK2 OBTIDA A PARTIR DE EXTRAÇÃO COM DMSO DA FRAÇÃO IK2

NOTA: Amostra solubilizada em  $\text{D}_2\text{O}$  +  $\text{NaOH}$  (30 mg/0,4 ml), analisada a 70 °C; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm). FONTE: O autor (2014)

A ausência de sinais em campo mais baixo que  $\delta$  102,3 indica que a galactose presente, não está na conformação furanosídica. Os sinais em  $\delta$  102,3 e 101,4 podem ser atribuídos a unidades com configuração  $\beta$ , enquanto que os sinais em  $\delta$  100,1 e 99,8, a unidades com configuração  $\alpha$  (GORIN; MAZUREK, 1975).

Os sinais em  $\delta$  84,2, 83,2 e 82,6 podem indicar a presença de unidades (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas, enquanto que os sinais em  $\delta$  78,7 e 77,2, a presença de unidades (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas (FIGURA 29). Estes resultados só serão confirmados através da análise de metilação desta fração, que juntamente com análises adicionais de RMN permitirão a caracterização da estrutura química deste heteropolissacarídeo.

Na região de campo alto entre  $\delta$  40,0 e 20,0 (dados não mostrados) alguns sinais puderam ser observados, indicando a presença de proteína nesta fração, a qual pode estar ou não complexada com o heteropolissacarídeo, o que o torna mais insolúvel.

Ainda analisando o espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  desta fração, um sinal em campo mais baixo, em  $\delta$  169,1 (N-C $\equiv$ O; C8) e outro em campo mais alto, em  $\delta$  23,6 (N-CH $_3$ ; C7) (dados não mostrados) puderam ser observados, estes sinais, em conjunto com alguns sinais em  $\delta$

102,3 (C1), 53,2-53,5 (C2), 70,2-74,2 (C3), 82,6-84,2 (C4), 70,2-74,2 (C5) e 60,0 (C6) podem sugerir a presença de quitina (KASAAI, 2010)

No entanto, para finalizar a caracterização da estrutura química do heteropolissacarídeo presente na fração PDIK2, bem como determinar a presença de quitina, a análise de metilação e outras análises de RMN são necessárias.

## 7. ANÁLISE DA CAPACIDADE BIOSORTIVA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS INSOLÚVEIS EXTRAÍDAS DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

De acordo com a hipótese levantada neste trabalho de que os polissacarídeos de parede celular estariam envolvidos no processo de biossorção de corantes pelo micélio do fungo *Paecilomyces* sp., buscou-se avaliar a capacidade biossortiva das frações insolúveis em água (FIGURA 17, pág. 68), em um ensaio de atividade descorante. Para isso, foram utilizados 2 mg de quatro frações polissacarídicas (PDIK2, SDIK2, IHW E PFK2), como biossorvente, e um mL de solução do corante azul RB220 na concentração de 100 mg/L (FIGURA 30).

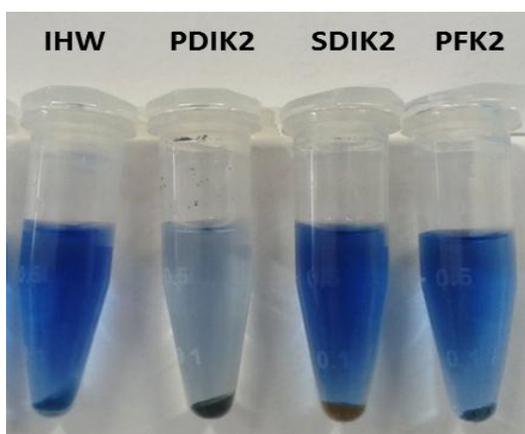


FIGURA 30 - ATIVIDADE DESCORANTE COM AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS INSOLÚVEIS PDIK2, SDIK2, IHW E PFK2 EXTRAÍDAS DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.  
FONTE: O autor (2014)

Após ensaio de atividade descorante, a fração PDIK2 apresentou a melhor eficiência de descoloração sendo 86 % do corante biossorvido pela fração (FIGURA 31). Esta fração foi obtida através da extração da fração insolúvel IK2 com DMSO (FIGURA 28, pág. 80) e apresenta na sua composição os monossacarídeos glc (52 %), man (30 %) e gal (17 %). Além disso, analisando o espectro de RMN-<sup>13</sup>C (FIGURA 29, pág. 81) é possível sugerir a presença

de quitina nesta fração, que poderia por sua vez estar relacionada a eficiência de descoloração observada para a fração PDIK2.

Já para as demais frações polissacarídicas, a eficiência de descoloração foi de 16 % para a fração PFK2, 10 % para a fração IHW, e 5 % para a fração SDIK2. O micélio processado do fungo *Paecilomyces* sp. foi utilizado como controle e apresentou eficiência de descoloração em torno de 39 % (FIGURA 31).

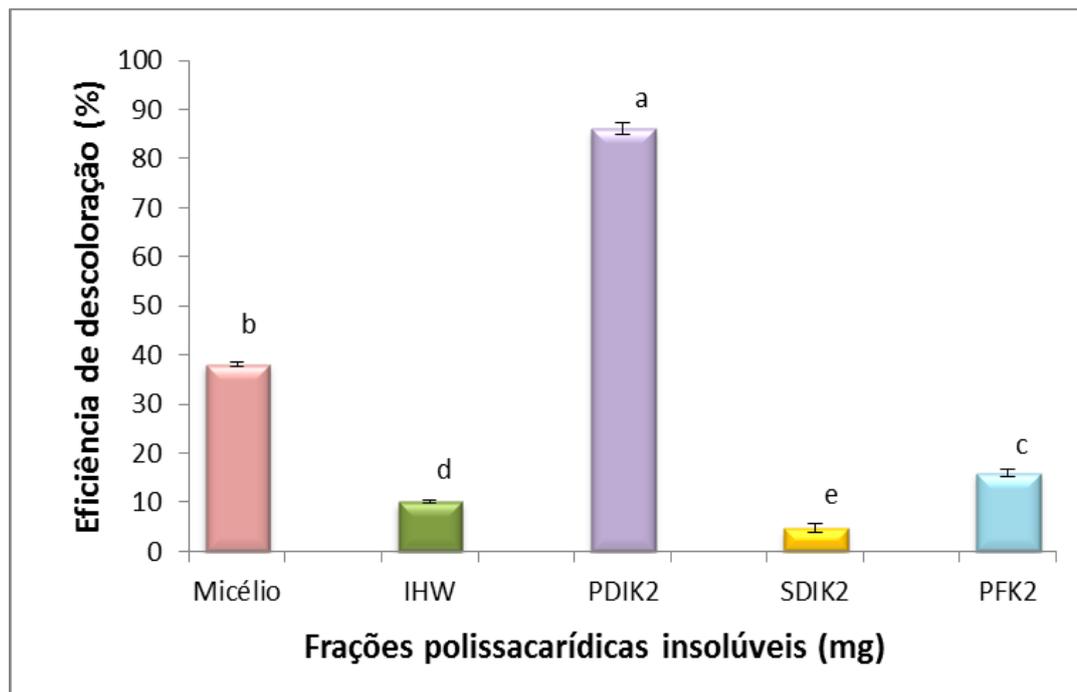


FIGURA 31 - CAPACIDADE BIOSORTIVA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS INSOLÚVEIS PDIK2, SDIK2, IHW E PFK2 EXTRAÍDAS DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

NOTA: O teste de atividade descorante foi realizado com 2 mg de cada fração polissacarídica insolúvel, utilizando-se o corante RB220 (100 mg/L) e o micélio de *Paecilomyces* sp. como controle do experimento.

FONTE: O autor (2014)

Devido à elevada eficiência de descoloração (86 %) pela fração PDIK2 foi analisado o envolvimento das proteínas e polissacarídeos presentes nesta fração, no processo de biossorção. Para isso, foram realizadas digestões enzimáticas utilizando-se protease (Pronase E) (FIGURA 32) e glicosidase (FIGURA 34), buscando-se avaliar o comportamento da fração tratada em um ensaio de atividade descorante com o corante azul RB220.

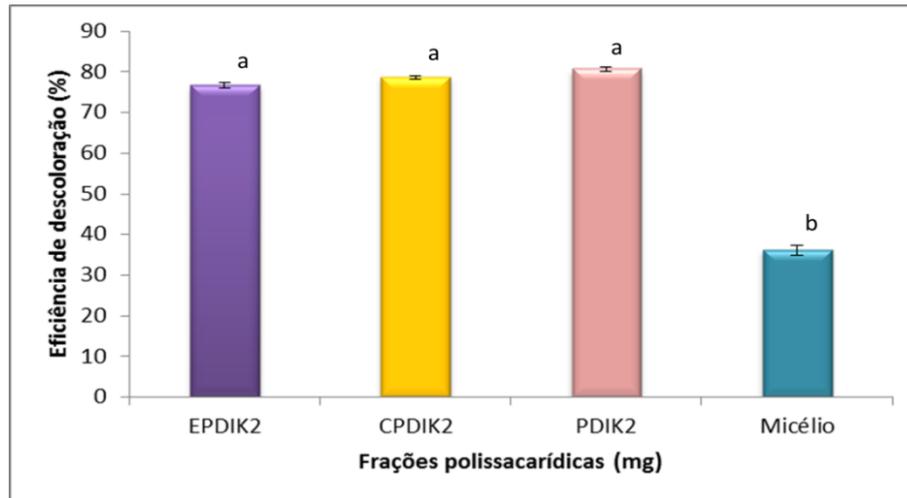


FIGURA 32 - CAPACIDADE BIOSORTIVA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA INSOLÚVEL PDIK2 EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp., TRATADA COM PROTEASE (PRONASE E)  
 NOTA: O teste de atividade descorante foi realizado com 2 mg de cada fração polissacarídica insolúvel, utilizando-se o corante RB220 (100 mg/L) e o micélio de *Paecilomyces* sp. como controle do experimento de atividade descorante. EPDIK2: fração PDIK2 tratada com pronase E. CPDIK2: controle do experimento de tratamento enzimático (fração PDIK2 exposta as mesmas condições que a amostra EPDIK2, porém, sem tratamento com protease). PDIK2 (fração pura, utilizada somente para o teste de atividade descorante).  
 FONTE: O autor (2014)

Analisando-se o resultado obtido no ensaio de atividade descorante com a amostra EPDIK2 (fração PDIK2 tratada com proteinase) pode-se sugerir que a porção proteica da fração não está diretamente envolvida com o processo de biossorção de corante. Após o tratamento com a proteinase, ou seja, clivagem das ligações peptídicas, a eficiência de descoloração manteve-se acima de 70 % similar ao controle CPDIK2 (fração PDIK2 apenas com tampão, sem enzima) (FIGURAS 32 e 33).

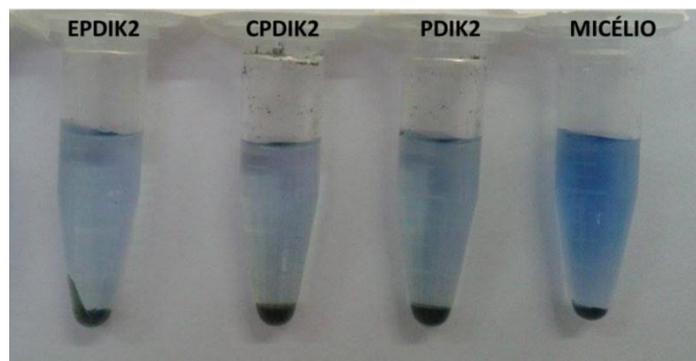


FIGURA 33 - ENSAIO DE ATIVIDADE DESCORANTE COM A FRAÇÃO POLISSACARÍDICA INSOLÚVEL PDIK2, EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp., TRATADA COM PROTEASE (PRONASE E)  
 NOTA: O teste de atividade descorante foi realizado com 2 mg de cada fração polissacarídica insolúvel, utilizando-se o corante RB220 (100 mg/L) e o micélio de *Paecilomyces* sp. como controle do experimento de atividade descorante. EPDIK2: fração PDIK2 tratada com pronase E. CPDIK2: controle do experimento de tratamento enzimático (fração PDIK2 exposta às mesmas condições que a amostra EPDIK2, porém, sem tratamento com protease). PDIK2 (fração pura, utilizada somente para o teste de atividade descorante).  
 FONTE: O autor (2014)

Buscando-se analisar o perfil de aminoácidos presentes nas frações PDIK2 e EPDIK2 foi feita uma hidrólise com HCl 6 M com 1 % de fenol (SASSAKI *et al.*, 2008). Os aminoácidos presentes na fração PDIK2 estão descritos na TABELA 19.

TABELA 19 - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA INSOLÚVEL PDIK2, EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp.

Aminoácidos	Tr (min)	%
Isoleucina (Ile)	5,7	20,3
Prolina (Pro)	6,9	7,5
Asparagina (Asn)	7,1	17,3
Glutamato (Glu)	8,9	4,7
Fenilalanina (Phe)	10,3	50,0

NOTA: Tr: tempo de retenção. FONTE: O autor (2014)

Para a fração EPDIK2 tratada com proteinase, não foi possível determinar um perfil de aminoácidos, pois apenas alguns fragmentos de cada aminoácido puderam ser visualizados, porém, nenhum aminoácido apresentou a fragmentação completa na análise por CG-EM. Com isso, é possível sugerir que o tratamento com a proteinase foi efetivo rompendo ligações peptídicas, e que a hidrólise com HCl pode ter degradado os aminoácidos livres.

Para avaliar o envolvimento dos carboidratos presentes na fração PDIK2 no processo de bioadsorção, esta fração foi tratada com a enzima glicosidase (*Lysing Enzymes from Trichoderma harzianum*). As amostras foram incubadas com a enzima em tampão acetato por 12 h a 30 °C. Posteriormente a fração tratada (GPDIK2) e o controle (CPDIK2) foram submetidos ao ensaio de atividade descorante (FIGURA 34).

A amostra PDIK2, após o tratamento com a glicosidase, apresentou uma diminuição na eficiência de descoloração de 29 % em relação ao controle CPDIK2 (controle do tratamento enzimático, não tratado com glicosidase). Pode-se sugerir que a diminuição da eficiência de descoloração da solução de corante pela fração tratada (FIGURAS 34 E 35), ocorreu pela clivagem de algumas ligações glicosídicas. No entanto, pelo fato da enzima utilizada ser inespecífica, este tratamento enzimático foi insuficiente para a digestão completa do material.

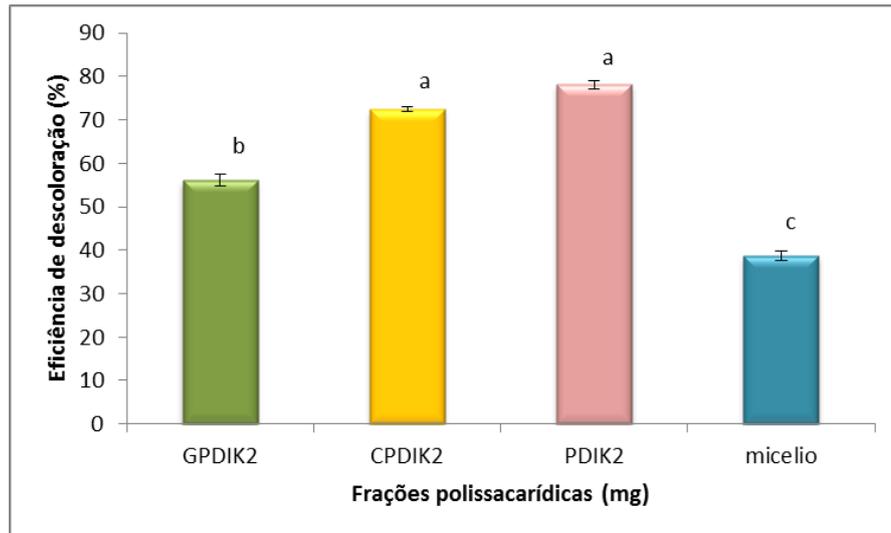


FIGURA 34 – CAPACIDADE BIOSORTIVA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA INSOLÚVEL PDIK2, EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp., TRATADA COM GLICOSIDASE

NOTA: O teste de atividade descorante foi realizado com 2 mg de cada fração polissacarídica insolúvel, utilizando-se o corante azul RB220 (100 mg/L) e o micélio de *Paecilomyces* sp. como controle do experimento de atividade descorante. GPDIK2: fração PDIK2 tratada com glicosidase. CPDIK2: controle do experimento de tratamento enzimático (fração PDIK2 exposta às mesmas condições que a amostra GPDIK2, porém, sem tratamento com glicosidase). PDIK2 (fração pura, utilizada somente para o teste de atividade descorante).

FONTE: O autor (2014)

Assim, ainda são necessários experimentos complementares, além de tratamentos com outras enzimas como galactosidases e mananases, as quais clivam polissacarídeos específicos, para que seja possível confirmar o papel do heteropolissacarídeo presente na fração PDIK2 na biossorção de corantes.

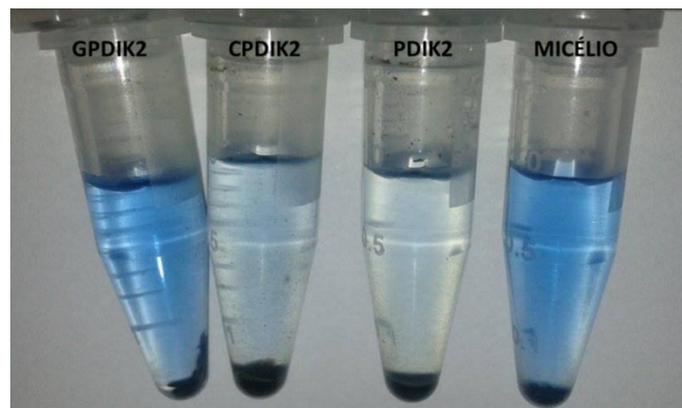


FIGURA 35 - ENSAIO DE ATIVIDADE DESCORANTE COM A FRAÇÃO POLISSACARÍDICA INSOLÚVEL PDIK2, EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE *Paecilomyces* sp., TRATADA COM GLICOSIDASE

NOTA: O teste de atividade descorante foi realizado com 2 mg de cada fração polissacarídica insolúvel, utilizando-se o corante azul RB220 (100 mg/L) e o micélio de *Paecilomyces* sp. como controle do experimento de atividade descorante. GPDIK2: fração PDIK2 tratada com glicosidase. CPDIK2: controle do experimento de tratamento enzimático (fração PDIK2 exposta às mesmas condições que a amostra GPDIK2, porém, sem tratamento com glicosidase). PDIK2 (fração pura, utilizada somente para o teste de atividade descorante).

FONTE: O autor (2014)

## 8 CONCLUSÃO PARTE II

- Quanto a caracterização química dos carboidratos de parede celular de *Paecilomyces* sp. foram purificadas cinco frações polissacarídicas, IHW (1,04 g), SFHW (0,29 g), RSFK2 (0,06 g), ESFK2 (0,08 g) e PDIK2 (0,58 g), todas compostas por heteropolissacarídeos de manose, galactose e glucose, variando as proporções destes monossacarídeos.
- Dados preliminares de RMN-<sup>13</sup>C da fração PDIK2 indicam a presença de quitina.
- Dentre as frações polissacarídicas insolúveis (PDIK2, SDIK2, IHW e PFK2) testadas, a fração PDIK2 proveniente da extração da fração IK2 com DMSO, apresentou a melhor eficiência de descoloração, 86%.
- A fração PDIK2 após o tratamento com a proteinase, manteve a eficiência de descoloração acima de 70%, sugerindo a isenção da porção proteica da fração no processo de biossorção de corante.
- A fração PDIK2 após o tratamento com a glicosidase apresentou diminuição na eficiência de descoloração, sugerindo que a porção polissacarídica seja a principal responsável pela capacidade biossortiva.
- De acordo com os resultados obtidos, a fração PDIK2 purificada, apresenta potencial para o uso em processos de biossorção de corantes têxteis, embora ainda sejam necessários estudos complementares relacionados a dinâmica do processo biossortivo.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, R.; TAHA, S. Biosorption of methylene blue from aqueous solution by nonviable *Aspergillus fumigatus*. **Chemical Engineering Journal**, v. 195, p. 69-76, 2012.
- ABIQUIM: Associação Brasileira da Indústria Química. Disponível em: <<http://abiquim.org.br/corantes/cor.asp>>. Acesso em 10/11/2013.
- ABIT: Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção. Disponível em: <<http://www.abit.org.br/Abit.aspx#4>>. Acesso em 10/11/2013.
- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2035, 2004.
- AGUILAR-USCANGA, B.; FRANÇOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 268-274, 2003.
- AHRAZEM, O. *et al.* Fungal cell wall polysaccharides isolated from *Discula destructiva* spp. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1138-1143, 2007.
- AKAR, T. ARSLAN, S.; AKAR, S. T. Utilization of *Thamnidium elegans* fungal culture in environmental cleanup: A reactive dye biosorption study. **Ecological Engineering**, v. 58, p. 363-370, 2013.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 997-1026, 2005.
- AKSU, Z.; E. BALIBEK. Effect of salinity on metal-complex dye biosorption by *Rhizopus arrhizus*. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 1546-1555, 2010.
- ALCÂNTARA, M. R. e DALTIM, D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 320-330, 1996.
- ALLEGRE, C. *et al.* Treatment and reuse of reactive dyeing effluents. **Journal of Membrane Science**, v. 269, p. 15-34, 2006.
- AMBRÓSIO, S. T. *et al.* A Biosorption Isotherm Model for the Removal of Reactive Azo Dyes by Inactivated Mycelia of *Cunninghamella elegans* UCP542. **Molecules**, v. 17, p. 452-462, 2012.
- ANJANEYA, O. *et al.* Biosorption of acid violet dye from aqueous solutions using native biomass of a new isolate of *Penicillium* sp. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 782-787, 2009.
- ANSARI, R.; MOSAYEBZADEH, J. Removal of Basic Dye Methylene Blue from Aqueous Solutions Using Sawdust and Sawdust Coated with Polypyrrole. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 7, p. 339-350, 2010.
- ASSADI, M. M. *et al.* Biosorption of Baftkar textile effluent. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, p. 900-904, 2003.
- AUER, D. P. F.; BRITZ, M. L.; RODDICK, F. A. Factors affecting lead biosorption by lead-tolerant strains of *Paecilomyces lilacinus*. **Global Environmental Biotechnology**, p. 9-26, 1997.
- BANAT, I. M. *et al.* Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.
- BAE, J. T. *et al.* Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 522-524, 2001.

- BERNABÉ, M. *et al.* Structures of wall heterogalactomannans isolated from three genera of entomopathogenic fungi. *Fungal biology*, v. 115, p. 862-870, 2011.
- BINUPRIYA, A. R. *et al.* Comparative studies on removal of Congo red by native and modified mycelial pellets of *Trametes versicolor* in various reactor modes. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1080-1088, 2008.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.
- BULIK, D. A. *et al.* Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryotic Cell*, v. 2, n. 5, p. 886-900, 2003.
- CALVO, A. M.; GALLETI, G. C.; GONZÁLEZ, A. E. Paper waste-water analyses by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry during biological decolorization with the fungi *Corioloopsis gallica* and *Paecilomyces variotii*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 33, p. 39-50, 1995.
- CARBONERO, A. R. *et al.* glucans of lichenized fungi: significance for taxonomy of the genera Parmotrema and Rimelia. *Phytochemistry*, New York, v. 66, n. 8, p. 929-934, 2005.
- CHAMBAT, G. *et al.* Presence of D-galactofuranose in the capsular polysaccharide of *Klebsiella* serotype K-41: Synthesis of 5,6-di-O-methyl-D-galactofuranose. *Carbohydrate Research*, v. 63, p. 323-326, 1978.
- CHAVES, K.O. *et al.* Adsorção de Índigo Carmim em biomassas mortas de *Aspergillus ninger*. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 13, n. 4, p. 351-355, 2008.
- CHEN, J; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans. *Mycological Research*, v. 111, p. 635-652, 2007.
- CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, v. 131, p. 209-217, 1984.
- CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente, Ministério do Meio Ambiente. Resolução do CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. Disponível em <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em 22/11/2013.
- CORDEIRO, L. M. C. *et al.* A fungus-type  $\beta$ -galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 244, p. 193-198, 2005.
- CORDEIRO, L. M. C. *et al.* Galactofuranose-rich heteropolysaccharide from *Trebouxia* sp., photobiont of the lichen *Ramalina gracilis* and its effects on macrophage activation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 42, p. 436-440, 2008.
- CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science*, v. 30, p. 38-70, 2005.
- DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes de estação de tratamento de águas residuárias de Americana, SP.** Tese de doutorado em Ecologia de Agroecossistemas da Universidade de São Paulo, USP, 2005.
- DOGAN, M.; ABAK, H.; ALKAN, M. Biosorption of methylene blue from aqueous solutions by hazelnut shells: equilibrium, parameters and isotherms. *Water Air Soil Pollut*, v. 192, p. 141-153, 2008.
- DOMENECH, J. *et al.* Cell wall polysaccharides of four strains of *Paecilomyces variotii*. *Current Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 169-173, 1994.
- DOMENECH, J. *et al.* An antigenic water-soluble glucogalactomannan extracted from cell walls of *Paecilomyces furnosoroseus* and *Paecilomyces farinosus*. *Microbiology*, v. 142, p. 3497-3503, 1996.
- DOMENECH, J. *et al.* Galactomannans from the cell walls of species of *Paecilomyces* sect. *Paecilomyces* and their teleomorphs as immunotaxonomic markers. *Microbiology*, v.145, p. 2789-2796, 1999.

- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ENE, L. V. *et al.* Carbon source-induced reprogramming of the cell wall proteome and secretome modulates the adherence and drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Proteomics**, v. 12, p. 3164-3179, 2012.
- FAN, H. *et al.* Removal of a low-molecular basic dye (Azure Blue) from aqueous solutions by a native biomass of a newly isolated *Cladosporium* sp.: Kinetics, equilibrium and biosorption simulation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 386–392, 2012.
- FORGACS, E; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment International**, v. 30, p. 953-971, 2004.
- FREIMUND, S. *et al.* New non – degrading isolation process for 1,3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 159-171, 2003.
- FU, Y. Z.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 251– 262, 2001.
- FU, Y. Z.; VIRARAGHAVAN, T. Removal of Congo Red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 239-247, 2002.
- FU, Z.; ZHANG, Y.; WANG, X. Textiles wastewater treatment using anoxic filter bed and biological wriggle bed-ozone biological aerated filter. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3748–3753, 2011.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.
- GOODAY, G. W. The dynamics of hyphal growth. **Mycological Research**, v. 4, p. 385-394, 1995.
- GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 142, p. 119-132, 1984.
- GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydrate Research**, v. 142, p. 253-267, 1985.
- GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further Studies on the Assignment of Signals in <sup>13</sup>C Magnetic Resonance Spectra of Aldoses and Derived Methyl Glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, p. 1212-1223, 1975.
- HUNGER, K. **Industrial Dyes - Chemistry, Properties, Applications**. Germany: Wiley-VCH, p.600, 2003. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=uAzS4Hk2TgwC&oi=fnd&pg=PR5&dq=HUNGER,+K.+Industrial+Dyes+%E2%80%93+Chemistry,+Properties,+Applications.+Germany:+Wiley-VCH,+2003,+660+p.&ots=e3CwBPO6>. Acesso em 09/11/2013.
- INGLIS, P. W.; TIGANO, M. S. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 132-136, 2006.
- JIN, X. Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 239-243, 2007.
- JOHNSTON I. R. The Composition of the Cell Wall of *Aspergillus niger*. **Biochemical Journal**, v. 96, p. 651-658, 1965.
- JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 36-38, 1965.
- KHANDEGAR, V.; SAROHA A. K. Electrocoagulation for the treatment of textile industry effluente – A Review. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 949-963, 2013.

- KASAAI, M. R. Determination of the degree of *N*-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 801–810, 2010.
- KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environment International**, v. 35, p. 127-141, 2009.
- KAUSHIK, P.; MALIK, A. Alkali, thermo and halo tolerant fungal isolate for the removal of textile dyes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 321-328, 2010.
- KHAMBHATY, Y. *et al.* Equilibrium Modeling for Biosorption of Safranin onto Chemically Modified Biomass of Marine *Aspergillus wentii*. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 215, p. 679-691, 2010.
- KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; P. W. J, DE GROOT. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. V. 23, p. 185-202, 2006.
- KUMAR, S. R. Decolorization of Reactive Black HFGR by *Aspergillus sulphureus*. **ISCA Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 55-61. 2012.
- KUMARI, K.; ABRAHAM, T. E. Biosorption of anionic textile dyes by nonviable biomass of fungi and yeast. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1704–1710, 2007.
- KUNZ, A. *et al.* Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.
- LAGORCE, A. *et al.* Involvement of GFA1, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1697-1707, 2002.
- LATGÉ, J-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 279-290, 2007.
- LATIF, A. *et al.* Different techniques recently used for the treatment of textile dyeing effluents: A review. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 32, n. 1, p. 115- 124, 2010.
- LEAL, J. A. *et al.* Structure and conformational features of an alkali- and water-soluble galactofuranan from the cell walls of *Eupenicillium crustaceum*. **Carbohydrate Research**, v. 244, p. 361-368, 1993.
- LEUNG, M. Y. K. *et al.* Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, p. 101-114, 2006.
- LILLO, L. *et al.* Structural Studies of Native *Paecilomyces sp.* Exopolysaccharide. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, p. 623-626, 2007.
- LU, R. *et al.* Structural studies of *Paecilomyces tenuipes* Samson polysaccharide-part-2. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 343–346, 2007.
- McMULLAN, G. *et al.* Microbial decolourization and degradation of textile dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 81-87, 2001.
- MIQUELANTE, F. A. **Prospecção de fungos filamentosos halotolerantes para uso na descoloração de corantes têxteis**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- MUNRO, C. A. *et al.* The PKC, HOG and Ca<sup>2+</sup> signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 63, n.5, p. 1399–1413, 2007.
- NIE, S. *et al.* Bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis*: Isolation, structure features and bioactivities. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 1, p. 38-52, 2013.

NIEBISCH, C. H. **Biodegradação do corante têxtil remazol azul por *Lentinus crinitus*, *Lepista sordida* e *Hydnopolyporus fimbriatus***. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

NIEBISCH, C. H. **Caracterização de extratos solúveis com atividade decolorante provenientes de dois fungos lignolíticos e determinação da estrutura primária parcial de um dos genes relacionados**. 138f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

ONAT, T. A. *et al.* Decolorization of textile azo dyes by ultrasonication and microbial removal. **Desalination**, v. 255, p. 154-158, 2010.

O'NEILL, C. *et al.* Colour in textile effluents - sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 1009-1018, 1999.

PANNO, L. *et al.* Diversity, ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*. **New Biotechnology**, v.30, p. 685-694, 2013.

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

PERLIN, A. S.; CASU, B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-13C. **Tetrahedron Letters**, v. 34, p. 2919-2924, 1969.

PERRY, M. B.; MACLEAN, L. L. Structural characterization of the antigenic O-polysaccharide in the lipopolysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 14. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 1399-1402, 2004.

PRIETO, A. *et al.* A polysaccharide from *Lichina pygmaea* and *L. confinis* supports the recognition of *Lichinomycetes*. **Mycological Research**, v. 112, p. 381-388, 2008.

PRIGIONE, V. *et al.* Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. **Water Research**, v. 42, p. 2911-2920, 2008.

RAM, A. F. J. *et al.* The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall. **Microbiology**, v. 150, p. 3315-3326, 2004.

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.

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

RODRIGUES M. L. Fungal polysaccharides: biological activity beyond the usual structural properties. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-4, 2011.

RUTHES A. C. *et al.* Polysaccharides present in cultivated *Teloschistes flavicans* symbiosis: Comparison with those of the thallus. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 500-505, 2008.

SADHASIVAN, S. *et al.* Metabolically inactive *Trichoderma harzianum* mediated adsorption of synthetic dyes: Equilibrium and kinetic studies. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 394-402, 2009.

SADHASIVAN, S. *et al.* Biosorption of RBBR by *Trichoderma harzianum* WL1 in stirred tank and fluidized bed reactor models. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 41, p. 326-332, 2010.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. Characterization of lyso-galactolipids, C-2 and C-3 O-acyl trigalactosylglycerol isomers, obtained from lichenized fungus *Dictyonema glabartum*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 194, p. 155-158, 2001.

- SASSAKI, G. L. *et al.* Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.
- SASSAKI, G. L. *et al.* Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, p. 215-222, 2008.
- SESHADRI, S.; BISHOP, P. L.; AGHA, A. M. Anaerobic/aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. **Waste Management**, v. 14, n. 2, p. 127-137, 1994.
- SILVA, M. de L. C. da. *et al.* Carbohydrate, glycopeptide and protein components of the lichen *Sticta sp.* And effect of storage. **Phytochemistry**, v. 33, n. 3, p. 547-552, 1993.
- SILVA, M. de L. C. da. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 85-92, 2006.
- SILVA, M. de L. C. da. *et al.* Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 793–798, 2008.
- SILVA, M. de L. C. da. *et al.* Glucogalactan: A polysaccharide isolated from the cell-wall of *Verticillium Lecanii*, **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1353-1359, 2013.
- SLABA, M.; DLUGONSKI, J. Efficient Zn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> uptake by filamentous fungus *Paecilomyces marquandii* with engagement of metal hydrocarbonates precipitation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 954-960, 2011.
- SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 6, p. 20-24, 1972.
- SMIDERLE, F. R. *et al.* A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2731-2736, 2008.
- SMIDERLE, F. R. *et al.* Isolation and chemical characterization of a glucogalactomannan of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 74-80, 2013.
- SOUZA, C.R.L. de; ZAMORA-P, Z. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 226-228, 2005.
- SRINIVASAN, A.; VIRARAGHAVAN, T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 1915-1929, 2010.
- STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 69-80. 2001.
- SUKHITHASRI, V. *et al.* Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. **Microbiological research**, v. 168, p. 396-406, 2013.
- TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Chemotypes of mannose containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. **Carbohydrate Research**, v. 266, p. 309-314, 1995.
- TORRES, J. M. *et al.* Dye Decolorization Activities of Marine-Derived Fungi Isolated from Manila Bay and Calatagan Bay, Philippines. **Philippine Journal of Science**, v. 140, n. 2, p. 133-143, 2011.
- 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.

- WYATT, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 272, p. 1-40, 1993.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-68. 1963a.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.2, p. 211-215. 1963b.
- XU, C. *et al.* Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1025-1030, 2003.
- YU, R. *et al.* Structural elucidation and biological activity of a novel polysaccharide by alkaline extraction from cultured *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 166-171, 2009.
- ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, v. 29, n. 174, p. 61-64, 2001.
- ZAPOTOCZNY, S. *et al.* Accumulation of copper by *Acremonium pinkertoniae*, a fungus isolated from industrial wastes. **Microbiological Research**, v. 162, p. 219-228, 2007.
- ZEE, F. P. van der. **Anaerobic azo dye reduction**. Tese de Doutorado, 142 p., Wageningen, Holanda: Wageningen University Research Center, 2002.
- ZEROUAL, Y. *et al.* Biosorption of bromophenol blue from aqueous solutions by *Rhizopus Stolonifer* biomass. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 177. P. 135-146, 2006.
- ZHANG, L. *et al.* Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentin. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, n. 8, p. 1515-1521, 2005.
- ZHOU, J. L.; BANKS, C. J. Mechanism of humic acid colour removal from natural waters by fungal biomass biosorption. **Chemosphere**, v. 27, p. 607-620, 1993.