UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

POTENCIAL BIOSSORTIVO E BIODEGRADATIVO DAS CÉLULAS DE "*Saccharomyces cerevisiae*" LIVRES E IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO NA REMOÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

HEIDE DAYANE PRATES RODRIGUES

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

Março - 2010

HEIDE DAYANE PRATES RODRIGUES

POTENCIAL BIOSSORTIVO E BIODEGRADATIVO DAS CÉLULAS DE "*Saccharomyces cerevisiae*" LIVRES E IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO NA REMOÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Corso

Rio Claro - SP

2010

576 Rodrigues, Heide Dayane Prates
R6962p Potencial biossortivo e biodegradativo da Saccharomyces cerevisiae imobilizada em alginato de cálcio e em células livres na remoção de corantes têxteis de efluente / Heide Dayane Prates Rodrigues. - Rio Claro : [s.n.], 2010
87 f. : il., figs., tabs., fots.

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

1. Microorganismos. 2. Biossorção. 3. Biodegradação. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por fazer de mim testemunha de toda a grandeza e de todo o amor que ele representa. Obrigada Senhor por abrir “portas” nos momentos em que eu mais precisei, por colocar pessoas amigas e benevolentes em meu caminho, por me levantar quando pensei não ter mais forças para seguir em frente, por me ajudar a superar todas as dificuldades do dia-a-dia e conseguir alcançar os meus objetivos. Obrigada por eu ser tão abençoada!

Agradeço à minha mãe e aos meus irmãos que mesmo distantes se fizeram presentes em todos os momentos de derrotas e vitórias, de tristezas e alegrias, de receios e superações, além de me darem suporte para chegar até aqui e vencer mais uma etapa da minha vida! Amo muito vocês! Agradeço à toda a minha família que eu “amo de paixão” e que sempre me apoiou e me incentivou a estudar e lutar pelos meus ideais. Como sou feliz por ter tios e avós tão maravilhosos! São minha base, minha vida!

Agradeço ao Eduardo por toda a dedicação, por todo o amor, paciência, carinho, amizade e companheirismo durante os 5 anos em que estamos juntos, e principalmente, durante esses 2 anos de mestrado em que nos momentos mais difíceis me fez sentir a pessoa “mais amada do mundo”, me incentivou e não me deixou desistir. Nunca vou me esquecer de tudo o que você fez por mim. Muito obrigada! Te amo muito!

Agradeço ao Prof. Corso e ao Beto que sabendo das minhas dificuldades por estar numa área diferente da qual estava acostumada, sempre tiveram muita paciência e disposição em me orientar, ensinar e ajudar na realização deste trabalho. Agradeço também pela amizade e pelo carinho, o Corso foi um “paizão” e o Beto, apesar de “pegar no meu pé” (rsrsrs....), se tornou um amigo muito querido. Aprendi muito com vocês e sou muito grata por isso!

Agradeço à Profª. Dejanira e à Profª. Sandra que no momento em que mais precisei, não hesitaram em me ajudar. Muito obrigada por todo o apoio que vocês me deram!

Agradeço à Flávia e à Grazy (Flávia minha companheira dos finais de semana e Grazy minha companheira da semana [rsrsrsrs....]), obrigada pelas horas de conversa, desabafos, pelas horas tristes e alegres que vocês estiveram ao meu lado, pelo carinho, por todas as palavras de conforto, obrigada por tudo. Vocês se tornaram muito especiais em minha vida, muito obrigada pela amizade sincera.

Agradeço ao Paulo e ao Renato, pela amizade, pela companhia, pelas conversas, pelas diversões no trabalho, pelas vezes em que me ajudaram com a informática, com o inglês, etc. Obrigada também ao Eduardo, a convivência com você foi curta, mas você me ajudou bastante. Foi muito bom conhecer vocês!

Agradeço à Luciana, à Kate, à Roberta e à Camila, pessoas iluminadas, das quais nunca irei me esquecer! Tenho um carinho enorme por vocês, obrigada pela amizade!

Agradeço à Adriana de Campos e à Suely que me ajudaram e me ensinaram a utilizar o FTIR, e especialmente ao Adriano, que além disso, teve toda a “paciência do mundo” em me ajudar e me ensinar a analisar e melhorar os gráficos. Muito obrigada! Agradeço também à Inês, à Luíza e ao Ronaldo que sempre tiveram boa vontade em me ajudar todas as vezes em que fui atormentá-los (rsrsrsrsr....)! Muito Obrigada!

Enfim, agradeço a todos vocês que direta ou indiretamente participaram deste trabalho, todos merecem o meu agradecimento talvez apenas por uma palavra dita no momento em que eu precisava ouvi-la, apenas por um sorriso confortante pelos corredores, apenas por um abraço sincero, por um “puxão de orelha” para fazer o que é certo; também merecem o meu agradecimento àqueles que distantes, rezaram por mim e torceram para que tudo desse certo, para que eu suportasse e superasse as dificuldades. E graças a Deus e a ajuda de muitos, alcancei mais uma vitória em minha vida!

Eu sou uma pessoa abençoada por Deus! A concretização do mestrado é mais uma prova disso!

“Bem - aventurado o homem que põe no Senhor a sua confiança e não pende para os arrogantes, nem para os afeiçoados à mentira. São muitas, Senhor, as maravilhas que tens operado e também os teus desígnios para conosco; ninguém há que se possa igualar contigo”.

(Salmo 40, 4-5)

RESUMO

Este trabalho apresenta uma avaliação comparativa do potencial biossortivo e biodegradativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na remoção de corantes têxteis de efluentes quando imobilizada em alginato de cálcio e quando em célula livre. Para isto foram preparadas soluções experimentais dos corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151, com concentrações equivalentes a 100 µg/mL e a estas foram adicionadas esferas com a levedura imobilizada a partir de uma suspensão 10% e gotas de células livres a partir de uma suspensão 2%. Os testes comparativos de remoção dos corantes foram analisados através de espectrofotômetros Ultravioleta-Visível e Infravermelho com Transformada de Fourier, com os quais foi possível determinar a porcentagem de remoção dos corantes das soluções, os valores das Absorbâncias Relativas que revelaram se o processo predominante na descoloração foi o da biossorção e/ou biodegradação, a quantidade de biomassa em miligramas (peso seco) necessária para fazer a remoção total da cor e também determinar as alterações moleculares ocorridas nas estruturas dos corantes após os tratamentos. Os resultados mostraram que a maior porcentagem de descoloração alcançada para o Acid Blue 40 foi de 61,7% após 360 horas de tratamento com 20 esferas com a levedura imobilizada e para o Acid Red 151 foi de 81,9% após 216 horas de tratamento também com 20 esferas com o microrganismo imobilizado. Através dos valores das Absorbâncias Relativas foi possível verificar que o processo predominante na remoção da cor do Acid Blue 40 com 72 horas de tratamento com 10 e 20 esferas com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada foi o da biossorção seguido da biodegradação e para o Acid Red 151 com esse mesmo tempo de tratamento e com a mesma quantidade de biomassa imobilizada foi o da biodegradação. A quantidade de biomassa imobilizada e livre para fazer a remoção total do Acid Blue 40 da solução foi de 87 e 38 mg/mL, respectivamente, e para remover totalmente o Acid Red 151, a quantidade necessária de biomassa imobilizada e livre foi de 64 e 2 mg/mL, respectivamente, o que mostra que a levedura teve maior afinidade pelo corante azóico, o Acid Red 151, fazendo a sua remoção com mais eficiência. Para os dois corantes foram observadas modificações em sua estrutura molecular através dos espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier, nos quais foi possível verificar bandas bem definidas referentes a diferentes grupos orgânicos tóxicos. A técnica de imobilização da *Saccharomyces cerevisiae* se mostrou promissora para uso em grande escala no tratamento de efluentes têxteis.

Palavras-chave: Corantes têxteis. Imobilização celular. Biossorção. Biodegradação. *Saccharomyces cerevisiae.* Alginato de cálcio.

ABSTRACT

This paper presents a comparative assessment of the biodegradative and biosorptive potential of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in textile dyes removal of effluents when in immobilized alginate and in free cells. Therefore, experimental solutions were prepared with concentrations of the dye Acid Blue 40 and Acid Red 151 equivalent to 100 mg/mL and those were added with beads containing the immobilized yeast from a 10% suspension and drops of free cells from a 2 % suspension. Comparative tests of dye removal were analyzed by UV-Visible spectrometers and Infrared Fourier Transform on which it was possible to determine the percentage of dye removal from the solutions, the values of Relatives Absorbances that the discoloration have been proved to predominant by biosorption and / or biodegradation, the amount of biomass in milligrams (dry weight) required for a complete color removal and also to determine the molecular changes occurring in the dye structures after the treatment. The results showed that the highest decolorization percentage achieved for Acid Blue 40 was 61.7% after 360 hours of treatment with 20 immobilized yeast beads and for the Acid Red 151 it was 81.9% after 216 hours of treatment with 20 beads also with immobilized microorganism. Through the values of Relatives Absorbances it was concluded that the predominant process in dye removal of Acid Blue 40 in 72 hours of treatment with 10 and 20 beads containing imobilized *Saccharomyces cerevisiae* was the biosorption followed by biodegradation and in Acid Red 151 with the same treatment time and the same amount of immobilized biomass it was the biodegradation. The amount of immobilized and free biomass to obtain total removal of Acid Blue 40 solution was 87 and 38 mg/mL, respectively, and to completely remove the Acid Red 151, the required amount of free and immobilized biomass was 64 and 2 mg/mL, respectively, which shows that the yeast has a greater affinity for the azo dye, which is the Acid Red 151, making the dye removal more efficiently. For these two dyes, changes on its molecular structures were observed by means of Infrared Fourier Transform spectra, where it is possible to verify bands with more evidence for different toxic organic groups. The technique of immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* has been proved to be promising in large-scale treatment of textile effluents.

Key-words: textile dyes. immobilization. biosorption. biodegradation. *Saccharomyces cerevisiae*. calcium alginate.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO---------- 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA---------- 3
2.1 Poluição Causada por Efluentes de Indústrias Têxteis---------- 3
2.2 Corantes Têxteis---------- 4
2.3 Sistemas de Tratamento de Efluentes---------- 5
2.4 Mecanismos de Remoção do Poluente---------- 6
2.4.1 Biossorção---------- 6
2.4.2 Biodegradação---------- 9
2.5 Imobilização Celular---------- 11
2.6 *Saccharomyces cerevisiae*---------- 16
3. MATERIAL E MÉTODOS---------- 17
3.1 Materiais e Aparelhos Utilizados---------- 17
3.2 Preparo da Suspensão da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*---------- 17
3.3 Teste de Viabilidade Celular---------- 18
3.4 Preparo das Soluções Estoque dos Corantes---------- 18
3.4.1 Acid Blue 40---------- 18
3.4.2 Acid Red 151---------- 19
3.5 Análise Qualitativa e Quantitativa dos Corantes---------- 19
3.6 Imobilização da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*---------- 20
3.7 Obtenção do Peso Seco das Esferas de Alginato de Cálcio com e sem Levedura Imobilizada e do Peso Seco das Células Livres---------- 20
3.7.1 Peso Seco das Esferas de Alginato de Cálcio com e sem Levedura Imobilizada---------- 20
3.7.2 Peso Seco das Células Livres a partir da Suspensão 2% da Levedura---------- 21
3.8 Análises Espectrofotométricas UV-Vis---------- 21
3.8.1 Testes de Biossorção---------- 21
3.8.2 Testes de Biodegradação---------- 22

3.9 Análises de FTIR das Soluções que foram Tratadas com Células Imobilizadas e com Células Livres---------- 23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO---------- 24
4.1 Microrganismo---------- 24
4.2 Teste de Viabilidade Celular---------- 25
4.3 Obtenção dos Espectros de Absorção dos Corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151---------- 25
4.4 Esferas de Alginato de Cálcio com e sem Levedura Imobilizada---------- 28
4.5 Obtenção do Peso Seco das Esferas de Alginato de Cálcio com e sem Levedura Imobilizada e do Peso Seco das Células Livres---------- 28
4.6 Análises Espectrofotométricas UV-Vis---------- 29
4.6.1 Testes de Biossorção---------- 29
4.6.2 Testes de Biodegradação---------- 36
4.7 Análises de FTIR das Soluções que foram Tratadas com Células Imobilizadas---------- 51
4.7.1 Análises de FTIR do Corante Acid Blue 40---------- 51
4.7.2 Análises de FTIR do Corante Acid Red 151---------- 57
4.8 Análises de FTIR das Soluções que foram Tratadas com Células Livres---------- 64
4.8.1 Análises de FTIR do corante Acid Blue 40 ---------- 64
4.8.2 Análises de FTIR do Corante Acid Red 151---------- 66
5. CONCLUSÃO---------- 68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS---------- 70

1. INTRODUÇÃO

O problema da poluição ambiental tem caráter mundial e teve origem na revolução industrial, intensificando-se com a explosão populacional humana. Em muitas regiões brasileiras que abrigam pólos industriais e densa população, o meio ambiente vem sofrendo uma degradação efetiva causada pelos esgotos domésticos e industriais, principalmente o ecossistema aquático (BALAN, 1999).

Do ponto de vista ambiental, a indústria têxtil apresenta grande potencial de poluição, dado o elevado consumo de corantes durante a etapa de tingimento e o consumo de aditivos durante as etapas de pré-tingimento e armazenagem. Estas indústrias são responsáveis pela geração de efluentes com elevados níveis de coloração, Demanda Química de Oxigênio (DQO) e sólidos suspensos. Dentre estes, o problema da coloração tem atraído a atenção de pesquisadores, ambientalistas e governos.

A indústria têxtil contribui significativamente para a poluição dos rios em algumas regiões do Brasil ao transformar fibras naturais e sintéticas em tecidos e outros produtos (CAMMAROTA; COELHO, 2001). O problema se agrava devido à baixa biodegradabilidade dos corantes nos sistemas convencionais de tratamento. Dentre os mais comuns encontram-se os corantes reativos do tipo azo, os quais podem sofrer biotransformação natural gerando subprodutos tóxicos.

Atualmente, a remoção de corantes de maneira econômica e eficiente tornou-se um estímulo à produção de pesquisas científicas que proponham soluções práticas e de aplicação viável por parte das indústrias. Inúmeras técnicas têm sido testadas com resultados promissores, tais como a utilização de eletrólise e do carvão ativado,

todavia a implementação em larga escala ainda é restrita em função do aspecto econômico.

O objetivo deste trabalho consiste na avaliação do potencial biossortivo e biodegradativo das células de *Saccharomyces cerevisiae* livres e imobilizadas em alginato de cálcio, na remoção de corantes têxteis azóico (Acid Red 151) e não azóico (Acid Blue 40), através de análises em espectrofotômetros de absorção Ultravioleta Visível (UV-Vis) e Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das soluções experimentais em diferentes intervalos de tempo de tratamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Poluição Causada por Efluentes de Indústrias Têxteis

Os problemas ambientais relacionados com a indústria têxtil são numerosos e bem documentados. Além dos problemas associados ao elevado volume de resíduos e à sua elevada carga orgânica, surgem os inconvenientes relacionados com a liberação de corantes não fixados e não-degradados nos processos convencionais de tratamento. A presença desses corantes representa elevado potencial de impacto ambiental, não apenas em função da toxicidade associada, mas também em relação à interferência em processos fotossintéticos (PERALTA-ZAMORA et al., 2002). A cor é um dos indicadores mais óbvios da poluição e a alta descarga de corantes sintéticos pode ser extensivamente prejudicial aos mananciais (NAWAR; DOMA, 1989; NINGAM et al., 1996).

A contaminação por corantes pode levar a uma variedade de problemas ambientais. A água colorida pode afetar a vida das plantas, ou mesmo um ecossistema inteiro pode ser destruído por contaminação da água com os corantes (WANG et al., 2005).

As indústrias têxteis se destacam por gerarem alta quantidade de efluentes coloridos por corantes sintéticos. O descarte destes efluentes não tratados de maneira eficiente, pode ocasionar danos biotóxicos e introduzir o perigo potencial de bioacumulação em decorrência da presença de produtos e subprodutos tóxicos e carcino-mutagênicos tanto para os seres vivos aquáticos quanto para o homem (CORSO et al., 1997).

Devido à baixa biodegradabilidade dos corantes, os tratamentos biológicos convencionais mostram-se ineficazes. Usualmente, esses efluentes são tratados com métodos físicos e químicos, que são tecnologias eficazes na remoção total da cor, mas que acabam gerando subprodutos difíceis de serem eliminados, além de serem tecnologias extremamente dispendiosas para as indústrias (BANAT et al.,1996; FU; VIRARAGHAVAN, 2001).

2.2 Corantes Têxteis

Os corantes orgânicos naturais, constituídos de compostos aromáticos, extraídos de plantas, insetos, fungos e líquens, no passado foram extensivamente explorados, até que em 1856, o químico inglês W. H. Perkin sintetizou acidentalmente uma substância com ótimas características coloríficas, a anilina “purple”. Após a síntese da anilina e a descoberta da estrutura molecular do benzeno, realizada por Kekulé, começaram a surgir pesquisas incessantes na busca da síntese de novos corantes. Assim, já nas primeiras décadas do século XX a produção de corantes sintéticos passou a substituir progressivamente a de corantes naturais (WELHAM, 2000).

Os corantes estão divididos em aniônicos (diretos, ácidos e reativos); catiônicos (corantes básicos) e não-iônicos (dispersos). A classe de corantes, com maior número de representantes listados no Colour Index (60 a 70%), é a dos azóicos, e sua participação entre reativos, ácidos e diretos é ainda maior. Pode-se assim supor que, os azóicos constituem a maior parte dos efluentes de indústrias têxteis. Os corantes do tipo azo são resistentes ao ataque microbiano dentro das condições normalmente encontradas nas estações de tratamento (MICHAELS; LEWIS, 1985; PAGGA; BROWN, 1986; SHAUL et al., 1991), além disso seu elevado teor de carga orgânica e sais inorgânicos dificulta a biodegradação (BALAN et al., 2001). Possíveis efeitos genotóxicos dos corantes têxteis azóicos são discutidos frequentemente, que por conterem o grupo azo (-N=N-), com a sua quebra podem formar aminas cancerígenas e genotóxicas (ex. Acid Red 85). O uso destes corantes tem sido reduzido drasticamente na Europa devido às regulamentações nacionais, mas ainda é um problema nos países de outros continentes (SCHNEIDER; HAFNER; JAGER, 2004).

Os corantes ácidos são aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos (-SO_3H), que lhes conferem afinidade com as fibras protéicas e poliamídicas, solúveis

em água, são produzidos na forma de sais sódicos e a sua utilização requer um meio ácido. A sua constituição química é baseada em compostos azóico, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, ketonimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação (GUARANTINI; ZANONI, 2000).

Corso e Almeida (2009) utilizaram *Aspergillus oryzae* como agente da biorremediação de corantes de efluentes têxteis e verificaram que era possível uma diminuição sensível de toxicidade a *Daphnia similis,* de vários corantes, após o tratamento com biomassa “pelletizada” ou biomassa na forma paramorfogênica, deste fungo.

Vitor e Corso (2008) com o objetivo de avaliar a biodegradação e descoloração do corante azóico Direct Violet 51 por *Candida albicans* e estudar os metabólitos formados após a sua degradação, realizaram análises espectrofotométricas UV-Vis e FTIR das soluções experimentais do corante preparadas em diferentes valores de pH, onde foi possível observar mudanças significativas na estrutura molecular do corante através das novas bandas que surgiram nos espectros de FTIR das soluções quando comparados com o espectro da solução controle. Os autores concluíram que a levedura possui potencial enzimático capaz de modificar a estrutura química do corante têxtil estudado.

2.3 Sistemas de Tratamento de Efluentes

Para tratar efluentes industriais várias etapas são necessárias, incluindo floculação físico-química combinada com flotação, eletrofloculação, floculação com Fe(II)/$Ca(OH)_2$, filtração por membrana, coagulação eletrocinética, destruição eletroquímica, troca iônica, irradiação, precipitação e o método que envolve o uso de carvão ativado (Katox) (BANAT et al.,1996). A escolha, segundo os autores, dependerá do tipo de efluente, porém, nenhuma delas é totalmente eficiente no caso dos corantes.

Uma das técnicas de remediação está no uso da capacidade adsortiva de certas substâncias e de diferentes tipos de biomassa. A adsorção, por materiais como o carvão ativado, foi observada como eficaz na remoção de alguns tipos de corante, porém seu custo impossibilita a aplicação em larga escala. Muitas pesquisas foram feitas para encontrar substituintes de baixo-custo como a turfa, cinzas, sílica, serragem e outros tipos de biomassa com alguma afinidade química pelos corantes

(EL-GEUNDI, 1991; RAMAKRISHNA; VIRARAGHAVAN, 1997). Entretanto, esses adsorventes têm capacidade reduzida quando comparados ao carvão ativado e grandes quantidades seriam necessárias para o tratamento, o que novamente limita seu uso.

Em geral, na indústria têxtil os processos de tratamento estão fundamentados na operação de sistemas físico-químicos de precipitação-coagulação, seguidos de tratamento biológico via sistema de lodos ativados. O sistema apresenta eficiência relativamente alta, permitindo a remoção de aproximadamente 80% da carga de corantes. Infelizmente, o problema relacionado com o acúmulo de lodo torna - se crítico, uma vez que o teor de corantes adsorvido é bastante elevado, impedindo qualquer possibilidade de reaproveitamento (KUNZ et al., 2002).

No caso dos tratamentos biológicos, procura-se imitar o metabolismo de estabilização dos seres vivos existentes nos rios e lagoas, que transformam a carga orgânica dissolvida em material celular. O que acontece com os rios é que o excesso de matéria orgânica tende a eliminar os seres aeróbios. As estações de tratamento tentam evitar que isso ocorra, removendo a carga de nutrientes com diferentes técnicas (VITOR, 2005).

Segundo Guarantini e Zanoni (2000) o tratamento eficiente das águas de rejeito da indústria têxtil requer programas de investimento a longo prazo e alto custo. A implantação destes sistemas necessita de trabalho substancial de engenharia civil com plantas de grandes áreas de construção e altos investimentos. É importante salientar que a adequação de qualquer um dos métodos de tratamento escolhido para degradação do corante será muito mais efetivo, mais fácil e mais barato, se realizado na estação de tratamento da indústria, isto é, antes de atingir os mananciais. O aumento da diluição destes compostos na presença de outras descargas de origem industrial e doméstica em sistemas de esgoto comum exigiriam procedimentos muito mais drásticos, sensíveis e caros para identificação e remoção específica destes corantes.

2.4 Mecanismos de Remoção do Poluente

2.4.1 Biossorção

Para as células vivas, há dois mecanismos através dos quais os microrganismos podem retirar a cor do efluente: a biodegradação e a biossorção. A primeira realiza-se por meio da utilização de enzimas que atacam e desfazem as ligações químicas mais importantes dos corantes (para que o corante possa ser utilizado como fonte alternativa de carbono); já a segunda ocorre pela retenção das moléculas do corante na parede celular do microrganismo (MOU et al*.,* 1991). Para as células mortas, o mecanismo também é o da biossorção, envolvendo interações físico-químicas tais como adsorção, a deposição e troca iônica (FU; VIRARAGHAVAN, 2001). Assim, o termo biossorção é utilizado para explicar os fenômenos de remoção de moléculas consideradas tóxicas de soluções aquosas, por adsorção à parede celular dos microrganismos ou pela absorção intracelular destas substâncias e que venham a ter afinidade com organelas ou estruturas existentes dentro da célula (CORSO, 1998).

As leveduras têm sido utilizadas para os processos biossortivos por apresentarem características desejáveis, tais como altas resistências mecânicas e osmóticas (TRINDADE, 1986).

AKSU (2001) investigou a biossorção de corantes reativos (Reactive Blue 2—RB2 and Reactive Yellow 2—RY2) com uma suspensão de lodo ativado seco**.** A capacidade de adsorção do corante no biossorvente foi mostrada em função do pH inicial, concentração de corante inicial e tipo de corante. Os dados de equilíbrio ajustaram-se bem para ambos os modelos de adsorção de Langmuir e Freundlich. Os resultados mostraram que a biossorção obedeceu a cinética de adsorção de segunda - ordem e que o lodo ativado tem alta capacidade de biossorção para ambos os corantes

Além de fungos, outro grupo de microrganismo já foi utilizado no processo biossortivo. Vecchio et al. (1998) testaram a biossorção de metais pesados por células bacterianas.

A fim de descobrir se apenas há a ligação externa da membrana com o corante ou se há a sua internalização, Brahimi-Horn et al. (1992) estudaram a compartimentalização das células e observaram as células intactas e não-intactas, concluindo que depois de 24 horas a biossorção era maior no caso das células com membrana intacta. Isso sugere que a integridade da célula é importante para manter sua capacidade de reter o corante.

Zhang et al. (2003) com o objetivo de testar a biossorção dos corantes reativos Reactive Blue 19, Reactive Red 241 e Reactive Yellow 141 por “pellets” de *Penicillium oxalicum*, prepararam soluções dos corantes e a estas adicionaram o fungo na forma paramorfogênica ou “pelletizada”. Realizaram análises espectrofotométricas das soluções experimentais e, para avaliar isotermas de adsorção, utilizaram o modelo de Langmuir. Os três corantes foram rapidamente adsorvidos pelos “pellets” do micélio fúngico, sendo que a adsorção do Reactive Blue 19 foi até 60% em 10 minutos e 91% em 80 minutos. A adsorção máxima foi obtida em pH 2. O aumento da temperatura favoreceu a adsorção do corante RB 19 e RR 241, porém, a temperatura ideal para o RY 141 foi 20ºC. Os autores concluíram que o micélio do *Penicillium oxalicum* é promissor para o uso em tratamento de águas residuais com corantes e que o alto desempenho dos “pellets” não só torna mais fácil separar os corantes da água, como também torna viável a separação dos dois processos de produção de biomassa e biossorção do corante.

Ambrosio e Campos-Takaki (2004) com o objetivo de fazer a descoloração de corantes azóicos com diferentes estruturas moleculares por *Cunninghamella elegans* UCP 542 sob condições co-metabólicas, adicionaram o micélio em soluções com os corantes Laranja, ou Preto Reativo ou Vermelho Reativo, ou uma mistura de todos esses corantes por 72h, na presença ou ausência de sacarose e/ou peptona. Foram feitas análises em espectrofotômetro ultravioleta das soluções antes e depois da descoloração e observaram a ocorrência tanto de biodegradação como de biossorção. O perfil de descoloração foi altamente dependente do tempo de incubação, da estrutura molecular do corante e da presença ou ausência de co-substratos.

Zeroual et al. (2006) com o objetivo de comparar características biossortivas de certos fungos com o corante azul de bromofenol em soluções aquosas, em diferentes intervalos de tempo fizeram análises espectrofotométricas e também avaliaram os diferentes aspectos da biossorção por isotermas de Langmuir e Freundlich. Concluíram que a taxa de biossorção é dependente do pH da solução, sendo que todas as cepas fúngicas estudadas obtiveram melhor desempenho de biossorção em pH 2.0, e que o modelo de Langmuir pareceu mais adequado para descrever a biossorção do corante que o modelo de Freundlich.

Comparando células vivas e autoclavadas de *Phanerochaete chrysosporium* para tratar o corante “Congo Red”, Tatarko e Bumpus (1998) observaram que a remoção deste corante foi de 90% no caso das células vivas e de 70% para as autoclavadas.

Polman e Breckenridge (1996) através de estudos com outras 28 espécies de microrganismos inferiram que a alta capacidade de adsorção das células autoclavadas pode estar relacionada com o aumento da superfície celular, o que ocorre depois da ruptura da membrana. Há casos em que o oposto acontece, o que pode estar relacionado com as características químicas do corante e suas afinidades com a membrana do microrganismo utilizado. Segundo Kapoor e Viraraghavan (1995), as vantagens da biomassa morta é que ela não precisa de um meio de cultura com características específicas, pode ser armazenada e utilizada posteriormente, podendo ser obtida de restos de tanques de fermentação.

2.4.2 Biodegradação

As enzimas são imprescindíveis no processo de biodegradação, que só ocorre devido à especificidade genômica de cada bactéria apta a reconhecer um determinado tipo de substrato orgânico. Portanto, segundo Koncan e Somen (1999) o conhecimento do mecanismo da síntese enzimática é extremamente importante, pois é o elemento chave na busca de respostas para uma degradação mais rápida objetivando a diminuição do impacto ambiental causado por efluentes tóxicos.

Glenn e Gold (1983) descreveram a descoloração de três corantes poliméricos por *Phanerochaete chrysosporium* e determinaram que o uso desses corantes ativavam o sistema de degradação da lignina (LDS).

Jesus (2005) descreveu a utilização do fungo *Neurospora crassa* 74A para avaliar a remoção por biossorção e biodegradação (através de análises de FTIR) de doze corantes, entre ácidos, diretos, reativos e xantenos. Os resultados demonstraram que o processo inicial de remoção deu-se por biossorção, na qual a parede celular do fungo funcionou como um filtro que atraiu as moléculas de corante do meio. A atração se fez com maior intensidade em valores de pH mais baixos.

Parikh e Madamwar (2005) com o objetivo de avaliar a descoloração de corantes têxteis por cianobactérias, prepararam soluções de corantes com os microrganismos, sendo que das 14 culturas estudadas, apenas 5 mostraram

eficiência na remoção da cor de 70-90% após 26 dias de incubação. Foi utilizado espectrofotômetro Ultravioleta - Visível para determinar a concentração do corante residual e a porcentagem de descoloração foi calculada a partir dos valores obtidos das absorbâncias. Assim, concluíram que as cianobactérias possuem capacidade para descolorir e degradar corantes com estruturas diferentes.

Nasreen, Bajwa e Kusar (2007) testaram a capacidade de 4 fungos de podridão branca de descolorir corantes de efluentes têxteis. Para isso os fungos foram inoculados em meio contendo corantes azóicos e glicose como fonte de carbono. A mudança de intensidade da cor foi monitorada em espectrofotômetro ultravioleta em intervalos de 3, 5 e 7 dias. Todas as 4 espécies diferentes de fungos de podridão branca apresentaram capacidade para remover o corante azóico Ácido Verde 20 das soluções aquosas nos 3 primeiros dias. A remoção máxima durante o período de 7 dias foi de 98% pelo fungo *Coriolus versicolor,* mostrando que esse fungo tem grande potencial para ser aplicado em estações de tratamento de efluente têxtil, porém antes seria necessário mais estudos para otimizar as condições de cultura, como concentração do inóculo, pH do meio de cultura e temperatura de incubação na presença dos corantes a serem descoloridos.

Para avaliar a descoloração de um corante de efluente industrial por *Aspergillus fumigatus* XC6, Jin et al. (2007) estudaram o efeito do pH em diferentes valores e o efeito da adição de diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Foram obtidas as absorbâncias de cada solução através de análises espectrofotométricas e pôde-se observar que há necessidade de maior tempo para que ocorra a completa descoloração do efluente suplementado com ambas as fontes de carbono e nitrogênio do que do efluente suplementado com apenas fonte de carbono ou nitrogênio. Os resultados revelaram ainda que a melhor taxa de descoloração ocorreu em pH 3,0. Os autores concluíram que essa linhagem de microrganismo é excelente para a descoloração de corantes têxteis reativos presentes em efluentes industriais e que pode ser utilizado como alternativa prática para o tratamento de águas residuais com cor.

Yesiladal et al. (2006) com o objetivo de avaliar o potencial de descoloração de corantes têxteis azóicos pelo fungo *Trichophyton rubrum* LSK-27, prepararam soluções com os corantes Remazol Tiefschwarz, Remazol Blue RR e Supranol Turquoise GGL e através dos valores das absorbâncias pôde-se observar que em 2 dias o fungo foi capaz de descolorir 83% do Remazol Tiefschwarz, 86% do Remazol

Blue RR e 80% do Supranol Turquoise GGL, pelos mecanismos de biossorção e biodegradação. Concluíram que *Trichophyton rubrum* LSK-27 pode ser um candidato em potencial para o tratamento de efluentes têxteis sob condições aeróbias que leva à degradação dos compostos de corantes.

Daneshvar et al. (2007) estudaram o potencial da *Cosmarium sp* pertencente a algas verdes, como um biomaterial para tratamento biológico do corante trifenilmetano, Malachite Green (MG). Neste estudo foram avaliados temperatura, pH, concentração do corante e concentração de algas na descoloração. Concluíram que a *Cosmarium sp* possui habilidade para descolorir o MG e que diferentes espécies de algas possuem alta eficiência e estabilidade na descoloração. A descoloração é dependente da concentração do corante, da concentração da alga, do pH e da temperatura. Durante o intervalo de 5-45ºC a taxa de descoloração aumentou com o aumento da temperatura e o valor de pH 9.0 foi o melhor para o processo de descoloração.

2.5 Imobilização Celular

A imobilização de microrganismos vivos tem sido descrita como um instrumento usual para o tratamento biológico de água poluída (CHIBATA; TOSA, 1981; HYDE et al., 1991).

A encapsulação de microrganismos é uma técnica que oferece algumas vantagens nas aplicações da biorremediação. A encapsulação, ou mais apropriado, imobilização em partículas, é um processo pelo qual células são retidas dentro de esferas poliméricas semi-permeáveis, sendo as células uniformemente distribuídas dentro delas. O processo consiste da mistura das células com uma solução prepolimérica, aplicando uma força que separa a mistura célula/polímero em partículas geralmente esféricas, e seguido de solidificação do material. Os polímeros que são comumente usados incluem o alginato, goma gelana, carragenana, agarose, poliuretano, poliacrilamida e metacrilato. Dependendo do polímero e da técnica de formação usada, as partículas podem variar de tamanho, de muito pequenas (aproximadamente 2 a 10 µm de diâmetro) a muito grandes (aproximadamente 3 mm). O tipo de polímero e o tamanho da partícula influenciam na atividade celular, retenção, difusão de nutrientes e estabilidade da partícula (KNAEBEL et al., 1997).

O uso de células encapsuladas para aplicação no meio ambiente tem muitas vantagens em relação as formulações feitas com células livres, incluindo a proteção do estresse biótico como a predação por protozoários e bacteriófagos, proteção do estresse abiótico como o efeito inibitório dos compostos tóxicos. Além disso, garante a sobrevivência e promove a atividade fisiológica, aumenta a densidade celular e o crescimento celular preferencial em várias zonas aeróbias e anaeróbias do gel encapsulado (PASSOS, 2006).

O alginato é um dos suportes mais utilizados para a imobilização de células microbianas inteiras por ser uma metodologia razoavelmente simples, além de ser uma técnica reprodutível que utiliza condições suaves durante o processo de imobilização. Os alginatos são heteropolímeros (Figura 1) lineares de ácidos carboxílicos compostos de subunidades monoméricas de β -D-ácido manurônico (M) e α-L-ácido gulurônico (G) interligados por ligações 1,4-glicosídicas (KAWAGUTI; SATO, 2008).

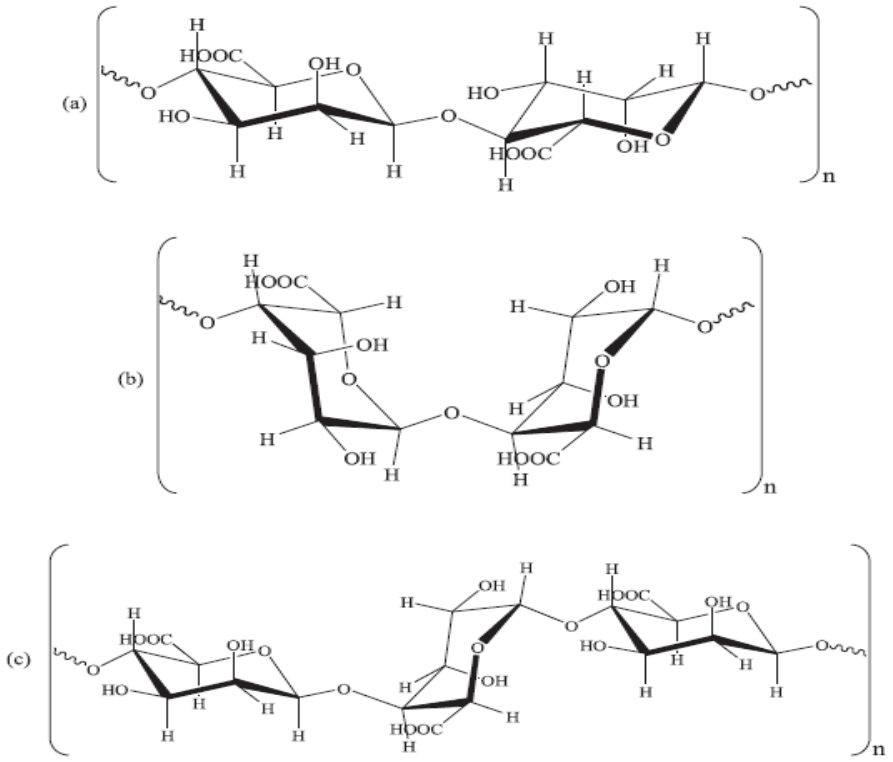

Figura 1: Composição de alginatos: (a) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos; (b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos; (c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados.
Fonte adaptada: Kawaguti e Sato (2008, p. 138).

Preetha e Viruthagiri (2005) estudaram a biossorção de íons zinco (II) por *Rhizopus arrhizus* em soluções aquosas. Com esta finalidade, imobilizaram a biomassa de fungos em alginato de cálcio e avaliaram os diferentes aspectos da biossorção por isotermas de Langmuir, Freundlich, Redlich-Peterson e BET. Concluíram que a biossorção aumenta a medida que aumenta-se a biomassa.

Com o objetivo de investigar dois principais mecanismos para a descoloração de corantes pelo cultivo de fungos, em fase sólida ou em uma fase líquida, e confirmar a possibilidade de aplicação prática de repetidos grupos de cultivo, Park et al. (2007) estudaram a descoloração de seis corantes comerciais com dez cepas fúngicas. Fizeram controle da atividade enzimática, das tendências e dos mecanismos de descoloração. Observaram que os mecanismos de descoloração por *Funalia trogii* ATCC 200800 envolvem uma complexa associação de atividade enzimática e biossorção. Os resultados confirmaram a possível descoloração de uma elevada concentração de corantes comerciais, concluindo que tais métodos podem ter um potencial favorável de aplicação na descoloração de corantes e no tratamento de efluentes têxteis.

Com o interesse de alcançar uma descoloração efetiva com *Funalia troggi*, Park et al. (2006) estudaram a imobilização fúngica em repetidos grupos experimentais. Durante a descoloração do Acid Black 52, sob condições de micélio fúngico imobilizado e suspenso, relataram as atividades de três enzimas, lacase, lignina peroxidase (LIP) e manganês peroxidase (MnP). Obtiveram como resultado, que a taxa de descoloração por imobilização fúngica foi maior que aquela por cultivo suspenso e que a descoloração pode ser mantida estável com repetidos grupos experimentais durante um longo período (pelo menos por 300h). Concluíram que a enzima do *Funalia troggi* é eficiente na descoloração do Acid Black 52 e foi observado que a taxa de descoloração aumentou quando a carga fúngica foi imobilizada em alginato de cálcio.

Chen e Lin (2007) imobilizaram *Pseudomonas luteola* em esferas de alginato-silicato sol-gel, com o objetivo de descolorir o corante azóico Reactive Red 22, e estudaram as influências da carga da biomassa, as condições de funcionamento, a taxa de descoloração específica e a eficiência na remoção do corante. Como resultados, obtiveram após os ensaios, a taxa de descoloração com as células livres, que foi aproximadamente 54% e a taxa de descoloração com as células

imobilizadas, que foi apenas 18%, comprovando a maior eficiência das células livres em relação a descoloração.

Com o objetivo de comparar a eficiência da degradação de fenol utilizando *Aspergillus sp.* LEBM2 de forma livre e encapsulada em alginato de cálcio, Passos (2006) verificou o aumento na velocidade de degradação de fenol ao utilizar o fungo na forma encapsulada, em relação às células livres. Após ter observado aumento na velocidade de degradação entre 11,6% e 49,2%, concluiu que o efeito protetor da matriz do gel é mais favorável para a biodegradação, devido a redução do estresse abiótico e que a técnica de encapsulação utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus sp*. LEBM2 é uma técnica promissora para a aplicação em processos de bioaumentação.

Souza et al. (2006) com a finalidade de degradar corantes de efluentes têxteis, realizaram os processos Fenton e foto-Fenton, utilizando Ferro imobilizado em alginato. Chegaram a conclusão de que o processo Fenton não é eficiente para a degradação do substrato padrão, sendo observada redução de apenas 20% da área espectral. Por outro lado, o processo Foto-Fenton, utilizando Ferro imobilizado, apresentou redução praticamente completa. E que esse processo é uma alternativa promissora para tratamento de efluentes industriais, principalmente com relação a possibilidade de reutilização da matriz.

Com o objetivo de descolorir um meio contendo corante azóico tóxico, Methyl Red (MR), Moutaouakkil et al. (2004) imobilizaram células de *Enterobacter agglomerans* em alginato de cálcio, poliacrilamida e vermiculita. Como resultado, obtiveram a mais alta taxa específica de descoloração quando *Enterobacter. agglomerans* foi imobilizada em esferas de alginato de cálcio. As células imobilizadas em alginato de cálcio fizeram a descoloração contínua do Methyl Red mesmo após sete experimentos repetidos, sem perda significativa da atividade, enquanto as células imobilizadas em poliacrilamida e vermiculita mantiveram apenas 62 e 13% da sua atividade original, respectivamente. Concluíram que a alta taxa de descoloração específica obtida e a simplicidade do método de imobilização, significa que o alginato pode ser uma matriz de imobilização adequada para ser usada em cargas bacterianas, na intenção de remover corantes azóicos de águas residuárias em escala industrial.

Guo et al. (2007) com objetivo de fazer a descoloração de corantes azóicos, avaliaram o efeito do uso da antraquinona como mediador redox (acelera a

transferência de elétrons podendo ser o principal mecanismo de redução dos corantes azóicos) nos processos de biodescoloração e com esta finalidade, usaram nas soluções experimentais bactérias tolerantes ao sal, antraquinona imobilizada (em alginato de cálcio, álcool polivinil, H_3BO_3 e Ágar) e altas concentrações de sal. A reutilização das esferas com antraquinona imobilizada foi avaliada em repetidos experimentos de descoloração e após 4 repetições experimentais, a taxa de descoloração com a antraquinona imobilizada em alginato de cálcio, reteve mais de 90% do seu valor original. Os autores concluíram que a imobilização da antraquinona pode acelerar os processos de biodescoloração dos corantes azóicos estudados, e esta técnica seria uma grande melhoria no conceito de aplicação de mediadores redox e biotratamento e as esferas da antraquinona imobilizada podem ser reutilizadas.

Jamai et al. (2001) com o objetivo de comparar a produção de etanol por células livres e imobilizadas de *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*, avaliaram para as duas espécies a taxa de respiração aeróbia, taxa de crescimento, imobilização e tolerância ao etanol durante a fermentação da glicose. Concluíram que a concentração de etanol no fim do ciclo da fermentação é similar para células livres e imobilizadas de *Candida tropicalis,* mas o tempo requerido para alcançar esses valores é maior para células imobilizadas, enquanto que *Saccharomyces cerevisiae* livres e imobilizadas alcançaram a fermentação completa no mesmo valor de tempo. As *Candida tropicalis* imobilizadas requeriram 2-3 h a mais que as células livres de *Candida tropicalis* para o processo completo da fermentação.

Milagre et al. (2005) com o objetivo de fazer a redução de forma assimétrica do etil benzoilformato (EBF) para etil (R) – mandelate ((R)-EM) utilizaram um reator de processo contínuo com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em fibras de alginato de cálcio com duplas camadas de gel. A otimização da concentração do EBF e fluxo alimentar foram 1.1 mmol/L e 102 mL/h, respectivamente, obtiveram altos rendimentos químicos (82%) e graus de redução (92-97%). A produtividade volumétrica foi 0.12 mmol/(L h) e o excesso enantiomérico do (R)-EM manteve-se elevado (92%) durante 8 dias. Concluíram que a redução do EBF mediada por *S. cerevisiae* imobilizada em fibras de alginato com duplas camadas de gel tem excelente estabilidade, alto rendimento químico e excesso enantiomérico. A bioredução contínua foi uma técnica viável e reprodutível.

Gillet et al. (2000) com o objetivo de produzir *Scopolin*, imobilizaram *Nicotiana tabacum* em esferas de alginato de cálcio, visto que a suspensão de células livres acumulava *Scopolin* no interior citoplasmático e para a recuperação era necessário seu rompimento celular. As células de *Nicotiana tabacum* imobilizadas produziram mais *Scopolin* que a suspensão de células livres, sendo que uma grande fração do produto pôde ser recuperado sem o rompimento celular, obtendo 3,8 mg/g de biomassa no meio de cultura para 0,2 mg/g de biomassa intracelular. Chegaram a conclusão de que a imobilização de *Nicotiana tabacum* oferece perspectivas para a produção do *Scopolin* ou a melhora da produção de outros metabólitos secundários da planta, em nível industrial.

2.6 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo amplamente utilizado industrialmente na produção de biomassa, etanol, alimentos, proteínas recombinantes, fármacos, vacinas entre outros produtos de interesse comercial (PORRO et al., 1995).

O uso de *Saccharomyces cerevisiae* para mediar reações orgânicas tem sido explorado há aproximadamente um século e suas células íntegras têm sido o biocatalisador mais popularmente utilizado na redução de compostos carbonílicos (FABER, 1997; STEWART, 2000). A ação redutora desta levedura foi observada pela primeira vez, pela adição de enxofre a uma suspensão de fermento biológico em solução de açúcar, onde foi verificada o desprendimento de sulfeto de hidrogênio (RODRIGUES; MORAM, 2001). O seu habitat é rico em nutrientes, e durante o seu crescimento este microrganismo modifica as condições desse habitat, consumindo nutrientes e excretando produtos. A célula de levedura encontra-se bem adaptada para manter alta velocidade de crescimento mesmo após estas mudanças, o que está diretamente relacionado à capacidade de regular a expressão de genes apropriados ao regime nutricional em que a célula se encontra. A expressão de genes e a conseqüente síntese de proteínas são diretamente influenciadas pelas condições nutricionais (KRUCKEBERG et al., 1998). Este microrganismo é capaz de utilizar diferentes fontes de carbono, dependendo da presença de genes específicos que codificam as enzimas necessárias para a captação, bem como para o metabolismo destas fontes de carbono (STAMBUK, 1999).

3. MATERIAL E METÓDOS

3.1 Materiais e Aparelhos Utilizados

Aparelhos: Estufa de Secagem Fanem modelo CB2, Estufa de cultivo da marca Nova Ética, Espectrofotômetro Shimadzu Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) modelo 8300, Espectrofotômetro Shimadzu Ultravioleta - Visível (UV-Vis) modelo 2401 PC, Refrigerador Cônsul 280 Litros, Balança Analítica modelo ADA 210/L, Centrífuga Centribio modelo 80-2B, Agitador de tubos Phoenix modelo AP56, Agitador magnético modelo Fisatom 752, pHmetro Digimed modelo DMPH-2.

Materiais: Tubos de ensaio, béqueres, espátulas, cadinhos, dessecador, pipetas, balões volumétricos, provetas, buretas, bastão de vidro, conta-gotas, pissetas e outros materiais de uso comum em laboratório.

Reagentes: alginato de sódio da marca “Sigma”, fermento biológico fresco da marca “*Fleischman*”, KBr, $CaCl_2$, corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151 da “Aldrich Chemical Company”.

3.2 Preparo da Suspensão da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida de fermento biológico fresco da marca “*Fleischman*”, lotes de números 02081 e 02091.

Foram pesados em balança analítica 10 gramas de fermento e dissolvidos em água destilada, logo em seguida foram feitas centrifugações por 10 minutos à 6.000 rpm até a obtenção de sobrenadante límpido. O precipitado foi ressuspenso em

água destilada e o volume final ajustado para 100 mL, obtendo assim uma suspensão de levedura 10%.

3.3 Teste de Viabilidade Celular

Para se verificar a viabilidade das células leveduriformes dos dois lotes utilizados nos experimentos, foi realizado o teste da Eritrosina segundo o método descrito por Sharf (1978). Após a diluição 10^{-1} da suspensão de levedura 10%, esta foi colocada em contato com a solução de Eritrosina na proporção de 1:1. Após agitação transferiu-se uma gota da mistura de Eritrosina com a suspensão diluída da levedura para a câmara de Newbauer e com o auxílio de um microscópio óptico, foi realizada a contagem das células.

3.4 Preparo das Soluções Estoque dos Corantes

Após a pesagem de 0,100 g dos corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151 em pó, as soluções estoque foram preparadas dissolvendo-se os corantes em água destilada, completando o volume final para 100 mL. A concentração final de cada solução estoque foi de 1 mg/mL.

3.4.1 Acid Blue 40

Corante fabricado pela Aldrich Chemical Company, Inc.
C.I.: 62125
Solubilidade: Solúvel em água
Grau de pureza: 50%
Peso molecular: 473.44
Absorbância máxima: 610 nm
Estrutura química (Figura 2):

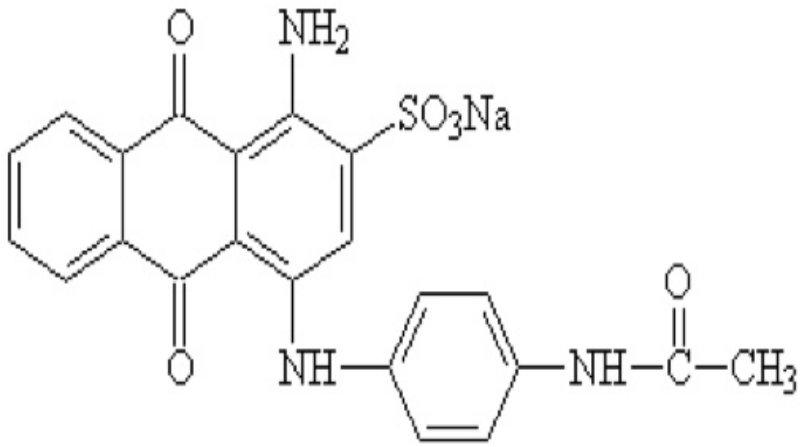

Figura 2: Estrutura molecular do corante Acid Blue 40.

3.4.2 Acid Red 151

Corante fabricado pela Aldrich Chemical Company, Inc.

C.I.: 26900

Solubilidade: Solúvel em água

Grau de pureza: 40%

Peso molecular: 454.44

Absorbância máxima: 503 nm

Estrutura química (Figura 3):

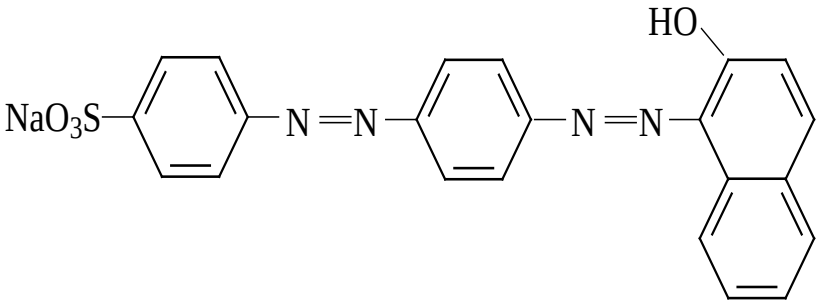

Figura 3: Estrutura molecular do corante Acid Red 151.

3.5 Análise Qualitativa e Quantitativa dos Corantes

Análise Qualitativa: As soluções dos corantes foram preparadas utilizando-se 1 mL da solução estoque e 9 mL de água destilada com pH ajustado para 2,50 com o uso de H_2SO_4 0,01 N, atingindo-se a concentração de 100 μg de corante/mL de solução. As varreduras espectrais das soluções foram realizadas entre os comprimentos de onda 190 a 800 nm, em cubeta de quartzo, caminho óptico de 1,0 cm, onde pôde-se verificar o comprimento de onda máximo do corante.

Análise Quantitativa: Para a obtenção dos espectros de absorção, foram preparadas em duplicata, soluções dos corantes em diferentes concentrações (20, 40, 60, 80, 100 μg/mL) e com o pH da água destilada ajustado para 2,50 com o uso de H_2SO_4 0,01 N . Foram então estabelecidas as correlações entre as absorbâncias e as variações da concentração de cada solução.

3.6 Imobilização da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Foram preparados o gel de alginato de sódio 1,5% e a solução de $CaCl_2$ 0,1 M. A solução de cloreto de cálcio 0,1 M foi mantida sob refrigeração até a sua utilização. Foram misturados cerca de 20 mL da suspensão de levedura 10% e 20 mL do gel de alginato de sódio 1,5% e com o auxílio de uma bureta, essa mistura foi gotejada em cerca de 400 mL de solução de $CaCl_2$ 0,1 M refrigerada, obtendo assim, esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada.

3.7 Obtenção do Peso Seco das Esferas de Alginato de Cálcio com e sem Levedura Imobilizada e do Peso Seco das Células Livres

As medidas de peso seco foram realizadas para se verificar o quanto de levedura (10%) ficava imobilizada em cada esfera de alginato de cálcio e assim correlacionar os pesos das células livres (2%) com o número de esferas contendo a quantidade de levedura imobilizada equivalente, podendo então realizar os testes comparativos de remoção dos corantes por células livres e por células imobilizadas.

3.7.1 Peso Seco das Esferas de Alginato de Cálcio com e sem Levedura Imobilizada

Foram colocados 4 cadinhos (previamente identificados) em estufa 105ºC por 12 horas, após esse tempo os cadinhos foram pesados em balança analítica até a obtenção do peso constante. Nos cadinhos A e B, foram colocadas 10 e 20 esferas de alginato de cálcio com levedura (suspensão 10%) imobilizada, respectivamente. Nos cadinhos C e D, foram colocadas 10 e 20 esferas de alginato de cálcio, respectivamente. Feito isso, todos os cadinhos foram mantidos em estufa 105ºC por 24 horas. Após esse tempo de secagem, foi obtido o peso seco em balança analítica.

3.7.2 Peso Seco das Células Livres a partir da Suspensão 2% da Levedura

O peso seco das células livres foi realizado em triplicata e conforme o método descrito anteriormente para a obtenção do peso seco das esferas. Foram colocadas nos cadinhos (previamente identificados) e já com os pesos conhecidos, 10 e 20 gotas da suspensão 2% da *Saccharomyces cerevisiae.* Estes cadinhos foram mantidos em estufa 105ºC e após 24 horas, foram pesados em balança analítica até obtenção do peso seco constante.

3.8 Análises Espectrofotométricas UV-Vis

3.8.1 Testes de Biossorção

Para a avaliação da biossorção dos corantes, foram feitos em triplicata, testes comparativos entre as soluções dos corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151 em contato por 2 horas, com o microrganismo imobilizado (10%) e em célula livre (2%), com quantidades de biomassas (expressas em peso seco) aproximadas. Como o corante Acid Red 151 apresentou maior possibilidade de remoção quando em contato com o mesmo número de esferas e de gotas que foram utilizados nos testes com o Acid Blue 40, foi então estabelecido um teste de biossorção do Acid Red 151 com números de esferas e gotas, ou, com quantidade de biomassa diferente da utilizada no teste com o outro corante.

3.8.2 Testes de Biodegradação

Foram adicionadas 10 e 20 esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada, em diferentes tubos de ensaio contendo 9 mL de água destilada com pH ajustado para 2,50 e 1 mL da solução estoque de cada corante em estudo, com concentração de 1 mg/mL, obtendo uma concentração final de 100 μg de corante/mL de solução. Os tubos foram mantidos em estufa 28°C e alíquotas dos sobrenadantes foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (2 a 360 horas para o corante Acid Blue 40, e 2 a 240 horas para o Acid Red 151), para a realização das leituras espectrofotométricas (190-800nm) e a avaliação das mudanças espectrais nas curvas de absorção máxima ocorridas nas amostras quando comparadas com as curvas de absorção máxima nos espectros das soluções controle, que não entraram em contato com a levedura. Para fazer um teste comparativo de biodegradação por células imobilizadas e livres, foram preparadas soluções dos dois corantes com concentração de 100 μg de corante/mL conforme o método descrito anteriormente para o teste com células imobilizadas e às soluções do Acid Blue 40, foram adicionadas 10 e 20 gotas e às soluções do Acid Red 151, foram adicionadas 1 a 5 gotas da suspensão 2% da levedura. As leituras espectrofotométricas (190-800nm) foram realizadas após 48 e 72 horas de tratamento.

Após as análises UV-Vis foi possível avaliar a ocorrência de biossorção e biodegradação dos corantes Acid Blue 40 e Acid Red 15, determinando a porcentagem de descoloração segundo Vitor e Corso (2008) e Dhanve, Shedbalkar e Jadhav (2008); e calculando os valores das Absorbâncias Relativas ($Abs_{\lambda máximo}$[1]/$Abs_{2º\lambda máximo}$[2]) que, segundo Glenn e Gold (1983) é predominante a biossorção se os valores permanecerem constantes e a biodegradação, se os valores se alterarem, comprovando modificações nos espectros de absorção.

---

[1] comprimento de onda máximo do grupo cromóforo

[2] comprimento de onda máximo do 2º grupo cromóforo

3.9 Análises de FTIR das Soluções que foram Tratadas com Células Imobilizadas e com Células Livres

Após fazer as análises espectrofotométricas UV-Vis descritas anteriormente, para realizar as análises de biodegradação por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), as soluções dos dois corantes que continham 10 e 20 esferas, bem como as soluções controle e as soluções tratadas com células livres (após centrifugação) foram colocadas em cadinhos previamente identificados e mantidas em estufa 105ºC por 24 horas.

Após a secagem do material foram preparadas pastilhas com 1 mg de amostra (em peso seco) e 149 mg de KBr através da compactação a 30 kN por 3-5 minutos. Estas pastilhas foram colocadas em suportes apropriados para discos de KBr e as leituras foram realizadas em intervalo de 1800 a 500 cm^{-1}, 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1}, sendo possível identificar mudanças na estrutura molecular de cada corante após o processo de interação com o microrganismo imobilizado e livre.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos gráficos obtidos após as análises das soluções experimentais em espectrofotômetro UV-Vis e FTIR, foi possível verificar os comprimentos de onda máximos, a concentração do corante remanescente após o tratamento, a biossorção e a biodegradação das moléculas dos corantes pelas células de *Saccharomyces cerevisiae* livres e imobilizadas em alginato de cálcio.

4.1 Microrganismo

Na Figura 4 está representada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada nos processos de biossorção e biodegradação dos corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151.

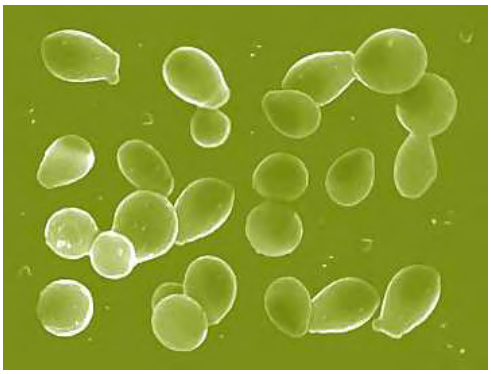

Figura 4: Levedura *Saccharomyces cerevisiae.*
Fonte: http://www.diwinetaste.com/html/dwt200701/images/SaccharomycesCerevisiae.jpg.

4.2 Teste de Viabilidade Celular

Através do teste de viabilidade celular pela Eritrosina, foi possível determinar a porcentagem de leveduras vivas e mortas presentes nas suspensões utilizadas nos experimentos. Sendo que as leveduras mortas adquiriram uma coloração avermelhada e as vivas permaneceram no estado normal.

Os resultados obtidos mostraram que nas suspensões dos dois lotes utilizados, em média, 96% das células leveduriformes estavam vivas e 4% estavam mortas.

4.3 Obtenção dos Espectros de Absorção dos Corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151

Foi possível verificar os comprimentos de onda máximos das soluções experimentais dos corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151 em diferentes concentrações, através dos espectros de absorção obtidos pela análise em espectrofotômetro UV-Vis.

O espectro do Acid Blue 40 está representado na Figura 5 e do Acid Red 151 na Figura 6, onde os comprimentos de onda máximos são 610 e 503 nm, respectivamente, e se referem ao grupo cromóforo da molécula.

O segundo grupo cromóforo do Acid Blue 40 é caracterizado na região de 280nm e do Acid Red 151 na região de 350 nm que, segundo Chang (2000), indicam a presença da carbonila e das ligações azóicas, respectivamente.

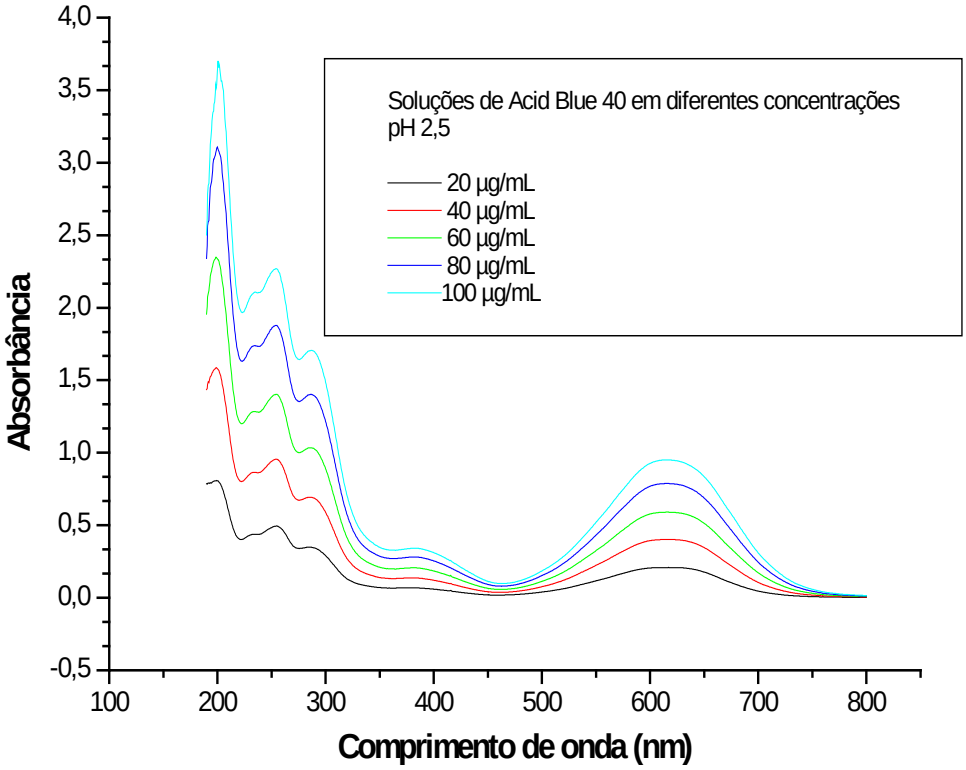

Figura 5: Espectro de absorção do corante Acid Blue 40
Concentrações do corante: 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL
Valor de pH: 2,50
Caminho óptico: 1,0 cm
Cubeta de Quartzo
$\lambda_{máx}$= 610nm
Absorbância^{610nm}= 0,04320041 + (0,01525899 x concentração do corante)
R= 0,9998

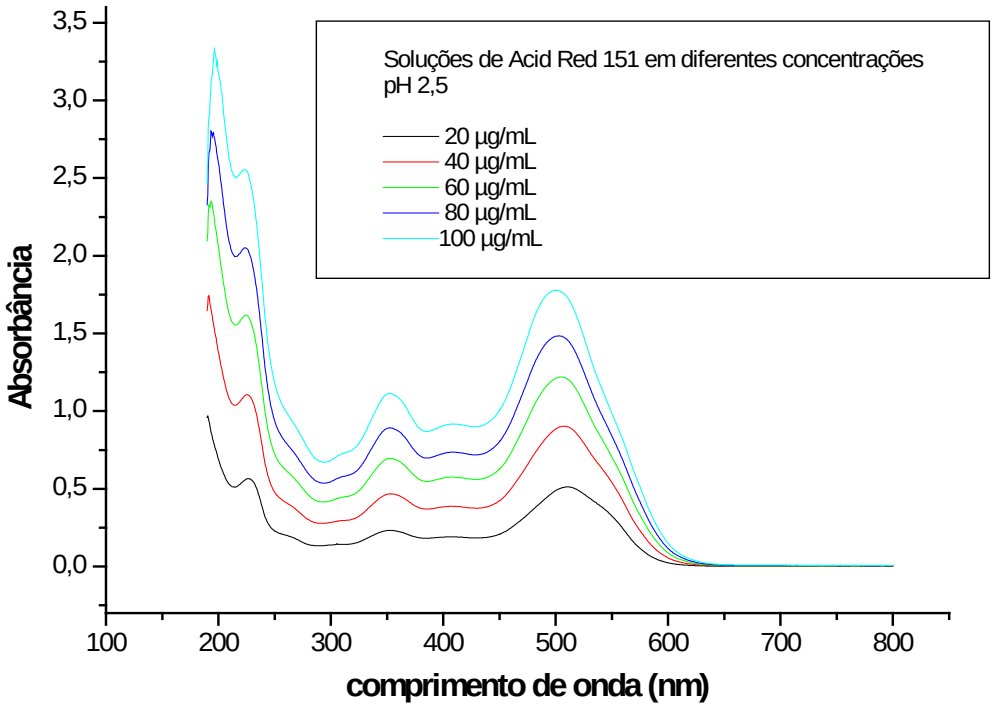

Figura 6: Espectro de absorção do corante Acid Red 151
Concentrações do corante: 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL
Valor de pH: 2,50
Caminho óptico: 1,0 cm
Cubeta de Quartzo
$\lambda_{máx}$= 503nm
$Absorbância^{503nm}$= 0,2358094 + (0,01564751 x concentração do corante)
R= 0,9968

4.4 Esferas de Alginato de Cálcio com e sem Levedura Imobilizada

Na Figura 7 estão representadas as esferas de alginato de cálcio e esferas de alginato de cálcio com a *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada, onde é possível notar uma coloração amarelada adquirida pelas esferas devido a presença do microrganismo imobilizado (B).

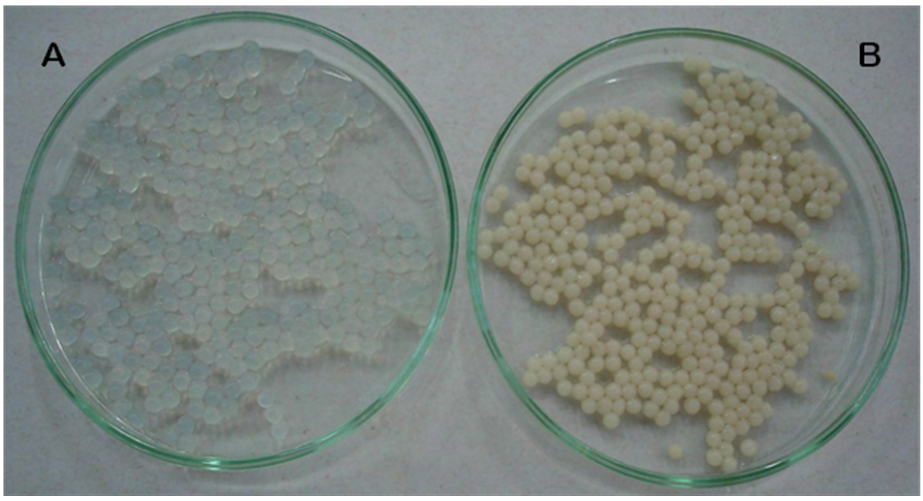

Figura 7: Esferas de alginato de cálcio (A) e esferas de alginato de cálcio com a levedura imobilizada (B).

4.5 Obtenção do Peso Seco das Esferas de Alginato de Cálcio com e sem Levedura Imobilizada e do Peso Seco das Células Livres

Através dos valores dos pesos seco foi possível determinar a quantidade de levedura que ficou imobilizada em cada esfera, sendo assim, foi possível presumir o quanto de levedura estava presente em cada solução experimental contendo diferentes números de esferas e gotas de células livres. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Peso seco das esferas com e sem levedura imobilizada e peso seco da gota de células livres.

Esfera com levedura 10% (mg)	***Esfera sem levedura (mg)***	***Gota de célula livre 2% (mg)***
2,03	1,09	0,32

Como mostrado na Tabela 1, cada esfera de alginato de cálcio contém cerca de 0,94 mg de levedura (10%) imobilizada e cada gota é equivalente a 0,32 mg de levedura (2%). Portanto, 1 esfera com levedura 10% imobilizada corresponde a 3 gotas de suspensão de levedura 2%.

4.6 Análises Espectrofotométricas UV-Vis

Os gráficos obtidos através de análises espectrofotométricas UV-Vis, demonstraram a ocorrência de biossorção e biodegradação das moléculas dos corantes estudados.

4.6.1 Testes de Biossorção

Nas Tabelas 2 e 3 estão representados os números de esferas com levedura (10%) imobilizada e de gotas de células livres (2%) adicionadas às soluções dos corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151, respectivamente, para o estudo comparativo da interação biossortiva da molécula do corante com o microrganismo livre e imobilizado, por 2 horas; ainda nas tabelas está representada a quantidade de biomassa em miligramas, obtido através do peso seco, presente em cada solução experimental. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 8 e 9 (Acid Blue 40) e, 10 e 11 (Acid Red 151), que mostram a correlação entre a quantidade de biomassa livre e imobilizada, presente nas soluções, e o valor do corante remanescente após o tempo de tratamento.

Tabela 2 - Números de esferas com *Saccharomyces cerevisiae* (10%) imobilizada e números de gotas de células livres da levedura (2%) que foram adicionadas às soluções para os testes de biossorção do Acid Blue 40 e a quantidade aproximada de biomassa em miligramas, presente em cada solução.

CÉLULAS IMOBILIZADAS		***CÉLULAS LIVRES***	
Nº de esferas	***Biomassa (mg)***	***Nº de gotas***	***Biomassa (mg)***
1	0,94	3	0,96
2	1,88	6	1,92
4	3,76	12	3,84
8	7,52	24	7,68
16	15,04	48	15,36

Conforme a Tabela 2, pode - se observar que para se fazer o estudo comparativo da interação biossortiva da molécula do Acid Blue 40 com as células livres e imobilizadas da *Saccharomyces cerevisiae,* o experimento foi elaborado fazendo com que todas as soluções apresentassem quantidade aproximada de biomassa livre e imobilizada.

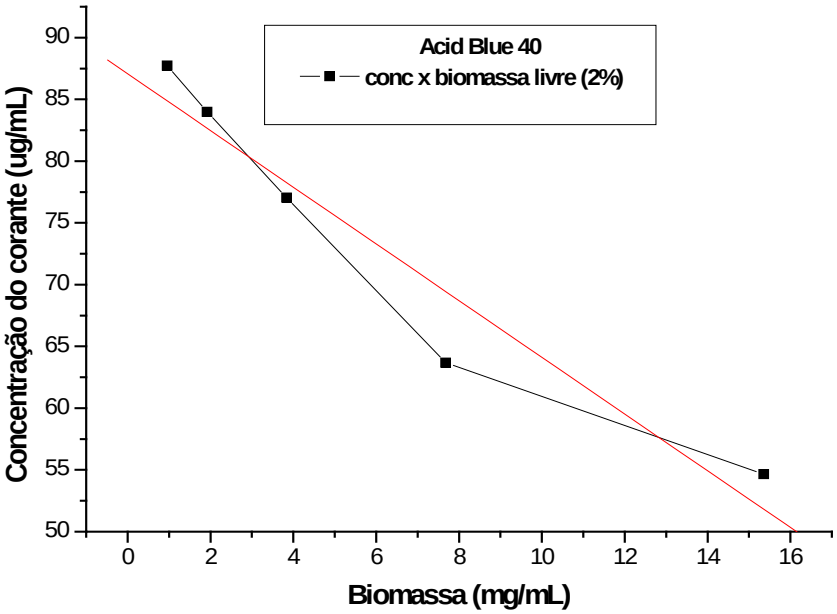

Figura 8: Correlação da biomassa com a concentração do corante Acid Blue 40 remanescente, após o processo de interação biossortiva com as células livres (2%), por 2 horas, no pH 2,5, com concentração inicial de 100 μg de corante/mL.
Concentração de corante remanescente= 87,07832+(-2,29609 x concentração de biomassa)
R= 0,9655

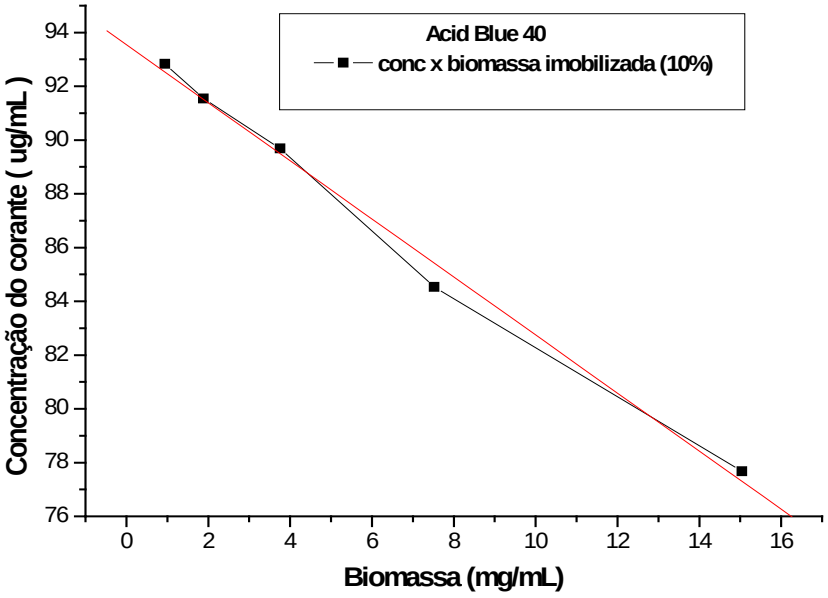

Figura 9: Correlação da biomassa com a concentração do corante Acid Blue 40 remanescente, após o processo de interação biossortiva com as células imobilizadas (10%), por 2 horas, no pH 2,5, com concentração inicial de 100 μg de corante/mL.
Concentração de corante remanescente=93,54916+(-1,080157x concentração de biomassa)
R= 0,9965

Tabela 3 - Números de esferas com *Saccharomyces cerevisiae* (10%) imobilizada e números de gotas de células livres da levedura (2%) que foram adicionadas às soluções para os testes de biossorção do Acid Red 151 e a quantidade aproximada de biomassa em miligramas, presente em cada solução.

CÉLULAS IMOBILIZADAS		***CÉLULAS LIVRES***	
Nº de esferas	***Biomassa (mg)***	***Nº de gotas***	***Biomassa (mg)***
1	0,94	1	0,32
2	1,88	2	0,64
4	3,76	3	0,96
6	5,64	4	1,28
8	7,52	5	1,60
10	9,40	6	1,92

O teste de biossorção do Acid Red 151, como mostrado na Tabela 3, foi realizado diferentemente do teste realizado com o Acid Blue 40, pois foi verificada maior possibilidade de remoção do corante azóico frente às variações de biomassa presente nas soluções experimentais. Ali et al. (2009) estudando a descoloração dos corantes Acid Red 151 e Orange II pelo fungo *Aspergillus niger* SA1 em efluente têxtil simulado, por um período de 24 horas, também verificaram maior capacidade de remoção do Acid Red 151 quando comparada com a remoção do Orange II. Observaram ainda que, primeiramente, o mecanismo de remoção destes corantes foi o da biossorção fúngica e através de análises de HPLC, verificaram que os corantes foram degradados em seus produtos constituintes.

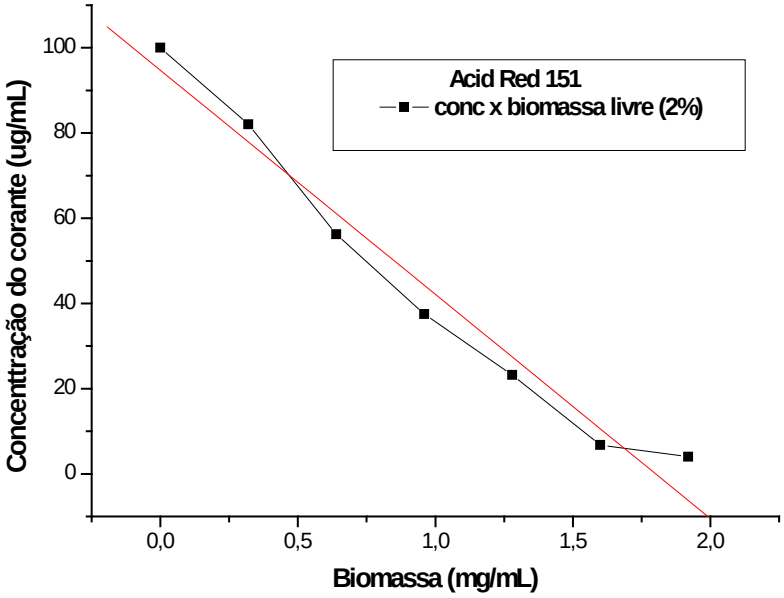

Figura 10: Correlação da biomassa com a concentração do corante Acid Red 151 remanescente, após o processo de interação biossortiva com as células livres (2%), por 2 horas, no pH 2,5, com concentração inicial de 100 μg de corante/mL.
Concentração do corante remanescente=94,76857+(-52,61607x concentração de biomassa)
R= 0,9845

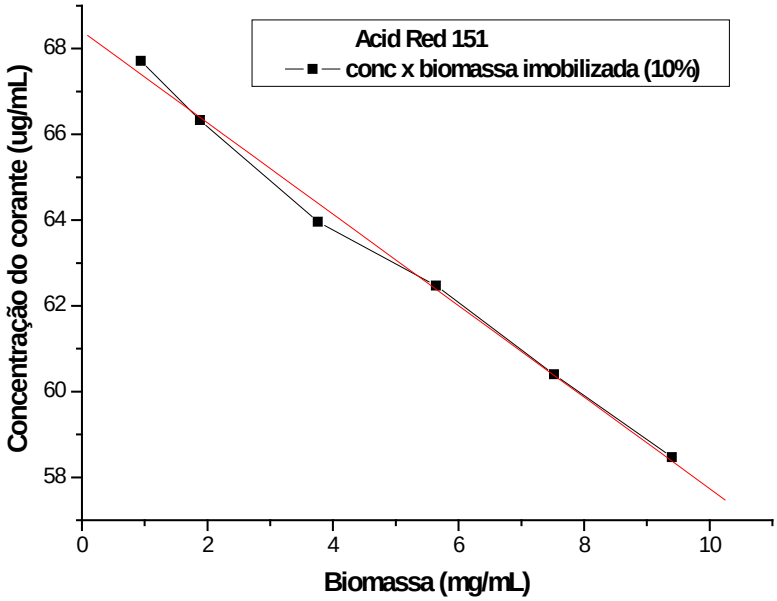

Figura 11: Correlação da biomassa com a concentração do corante Acid Red 151 remanescente, após o processo de interação biossortiva com as células imobilizadas (10%), por 2 horas, no pH 2,5, com concentração inicial de 100 μg de corante/mL.
Concentração de corante remanescente=68,40359+(-1,06663 x concentração de biomassa)
R= 0,9975

Após a obtenção das retas que correlacionam a quantidade de biomassa e a concentração do corante remanescente, foi feita estimativa do número aproximado de esferas e de gotas, bem como da quantidade aproximada de biomassa imobilizada e livre que é necessária para a possível remoção total dos corantes das soluções experimentais. Os valores estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Estimativa do número aproximado de esferas com levedura imobilizada (10%), número de gotas de células livres (2%) e estimativa da quantidade aproximada de biomassa, necessários para a possível remoção total dos corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151.

	Nº de esferas	**Biomassa Imobilizada - 10% (mg/mL)**	**Nº de gotas**	**Biomassa Livre - 2% (mg/mL)**
Acid Blue 40	92	87	118	38
Acid Red 151	68	64	6	2

Os valores representados na Tabela 4 indicam que a *Saccharomyces cerevisiae* apresenta pouca afinidade com o corante Acid Blue 40. No caso das células imobilizadas, isto pode ter ocorrido devido a menor superfície de contato para a ocorrência do processo biossortivo, obtida nos processo de imobilização, e com as células livres, apesar de maior superfície de contato ficar disponível para a biossorção da molécula, ainda assim, grande quantidade de biomassa livre é necessária para fazer a remoção total da cor, comparando com os valores obtidos para o Acid Red 151, que foi removido com menor quantidade de biomassa imobilizada e menor ainda, com biomassa livre. Isto ocorreu provavelmente porque a membrana leveduriforme apresenta em sua constituição, componentes que possuem maior afinidade pela molécula do Acid Red 151.

As Figuras 12 e 13 ilustram soluções dos corantes Acid Blue 40 e Acid Red 151, respectivamente, nas mesmas concentrações, sendo uma solução controle e duas soluções em contato com o microrganismo livre e imobilizado, onde é possível visualizar a turbidez causada pelas células livres que ficaram em suspensão, e o sobrenadante límpido, que foi obtido com as células imobilizadas, que ficaram sedimentadas.

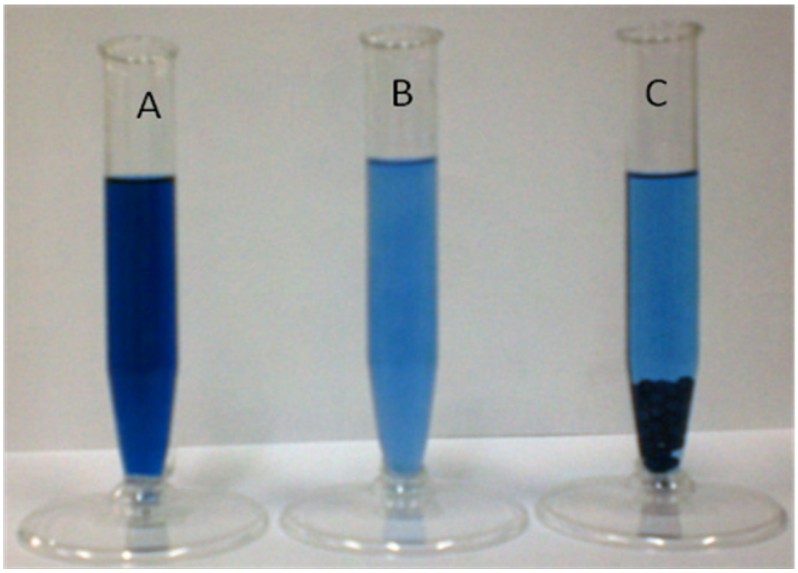

Figura 12: Soluções do corante Acid Blue 40. Controle (A) com concentração de 100 µg/mL, em contato com células livres (B) e em contato com células imobilizadas (C).

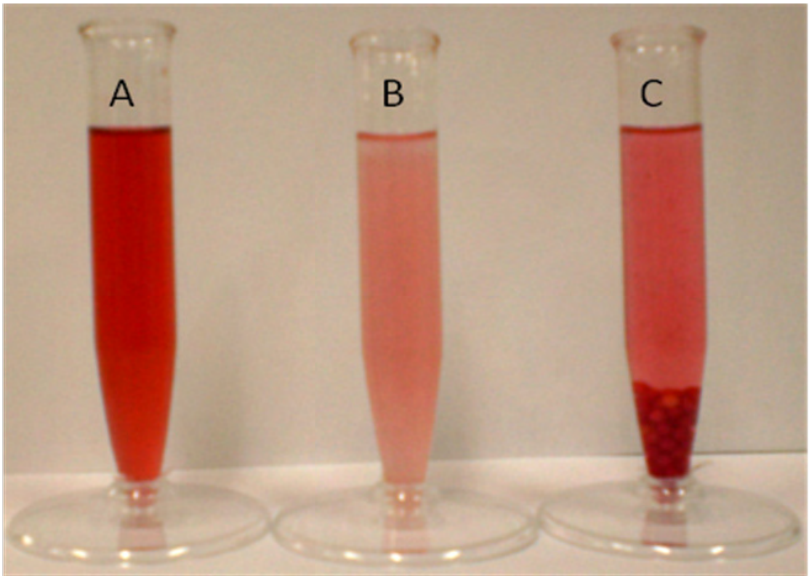

Figura 13: Soluções do corante Acid Red 151. Controle (A) com concentração de 100 µg/mL, em contato com células livres (B) e em contato com células imobilizadas (C).

4.6.2 Testes de Biodegradação

Os espectros UV-Vis das soluções que foram tratadas com o microrganismo, em diferentes intervalos de tempo, mostraram alterações nos picos de comprimento de onda máximo a 610 nm e 280 nm para o corante Acid Blue 40, e a 503 e 350 nm para o Acid Red 151, quando comparados com os espectros das soluções controle dos corantes.

A porcentagem de remoção dos corantes foi determinada segundo Vitor e Corso (2008); Dhanve, Shedbalkar, Jadhav (2008) e Kalme et al. (2007), através da relação:

$$\textbf{Descoloração} = \frac{(\textbf{Absorbância Inicial} - \textbf{Absorbância Final})}{\textbf{Absorbância Inicial}} \times 100$$

Os valores da porcentagem de descoloração para o corante Acid Blue 40 após 72, 216 e 360 horas de tratamento com 10 e 20 esferas com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 - Porcentagem de remoção do corante Acid Blue 40 em pH 2,50, após 72, 216 e 360 horas de tratamento com 10 e 20 esferas com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada.

Tempo de contato (horas)	***Solução com 10 esferas (%)***	***Solução com 20 esferas (%)***
72	10,4	14,9
216	27,9	55,8
360	36,4	61,7

Conforme a Tabela 5, a porcentagem de remoção do corante foi aumentando a medida que aumentou-se o tempo de tratamento e foi maior nas soluções que continham 20 esferas. Com 360 horas de tratamento, a interação biossortiva ocorreu com maior predominância, apresentando 36,4% de descoloração na solução com 10 esferas e 61,7% de descoloração na solução com 20 esferas.

Os valores de porcentagem de descoloração do corante Acid Red 151 após 72, 144 e 216 horas de tratamento com 10 e 20 esferas com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Porcentagem de remoção do corante Acid Red 151 em pH 2,50, após 72, 144 e 216 horas de tratamento com 10 e 20 esferas com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada.

Tempo de contato (horas)	***Solução com 10 esferas (%)***	***Solução com 20 esferas (%)***
72	34,9%	36,1%
144	62,6%	68,6%
216	63,8%	81,9%

Conforme a Tabela 6, a porcentagem de remoção do corante foi aumentando a medida que aumentou-se o tempo de tratamento e foi maior nas soluções que continham 20 esferas. Com 216 horas de tratamento, a interação biossortiva ocorreu com maior predominância, apresentando 63,8% de descoloração na solução com 10 esferas e 81,9% de descoloração na solução com 20 esferas.

Para determinar se o processo predominante na remoção da cor foi o de biossorção ou de biodegradação foi feito o cálculo dos valores das Absorbâncias Relativas ($Abs_{\lambda máximo}/Abs_{2º\lambda máximo}$) que, segundo Glenn e Gold (1983) é predominante a biossorção se os valores permanecerem constantes e a biodegradação, se os valores se alterarem.

Na Figura 14 estão representadas as esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada, com os corantes Acid Blue 40 (A) e Acid Red 151 (B), biossorvidos.

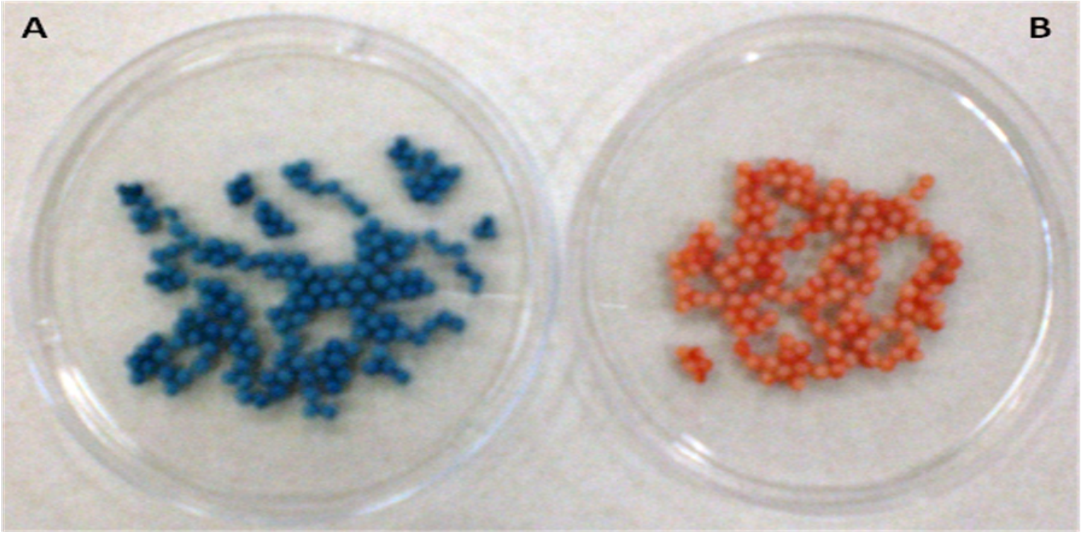

Figura 14: Esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada com o corante Acid Blue 40 (A) e Acid Red 151 (B) biossorvidos.

Nas Figuras 15 e 16 estão representados os espectros UV-Vis e os valores das Absorbâncias Relativas das soluções do Acid Blue 40 que foram tratadas por 48 e 72 horas com 10 e 20 gotas da suspensão 2% da levedura, respectivamente. Nas Figuras 17, 18 e 19, estão representados os espectros UV-Vis e as Absorbâncias Relativas das soluções do Acid Blue 40 que foram tratadas por 72, 216 e 360 horas, respectivamente, com 10 e 20 esferas com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada.

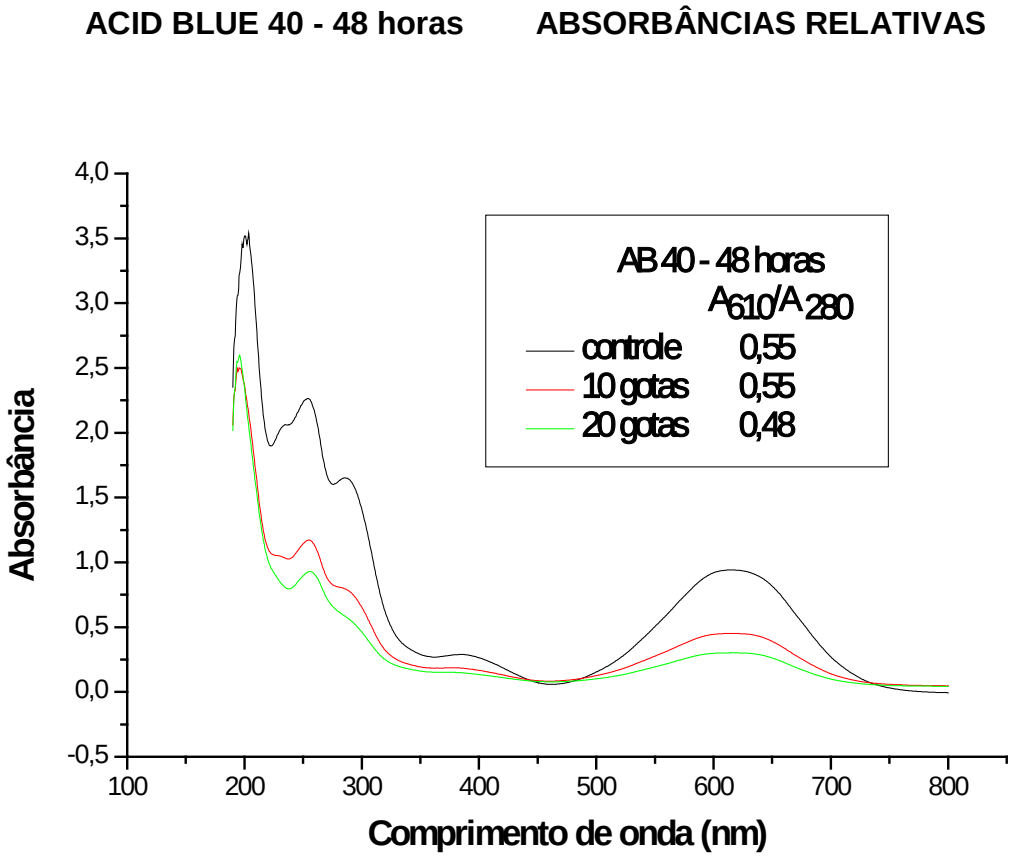

Figura 15: Espectro de absorção do corante Acid Blue 40 após interação com 10 e 20 gotas da suspensão 2% da *Saccharomyces cerevisiae* por 48 horas em pH 2,50.
Caminho óptico: 1,0 cm.
Cubeta de Quartzo.
(----controle, ----10 gotas, ----20 gotas).

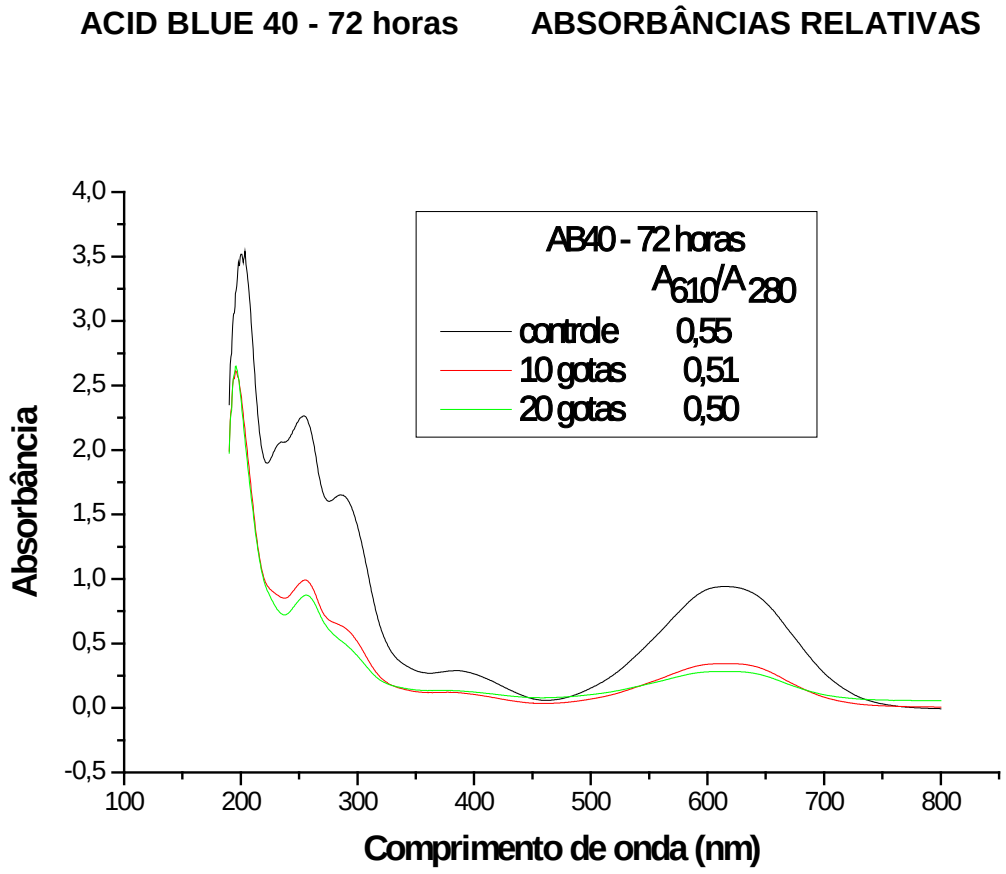

Figura 16: Espectro de absorção do corante Acid Blue 40 após interação com 10 e 20 gotas da suspensão 2% da *Saccharomyces cerevisiae* por 72 horas em pH 2,50.
Caminho óptico: 1,0 cm.
Cubeta de Quartzo.
(----controle, ----10 gotas, ----20 gotas).

ACID BLUE 40 - 72 horas ABSORBÂNCIAS RELATIVAS

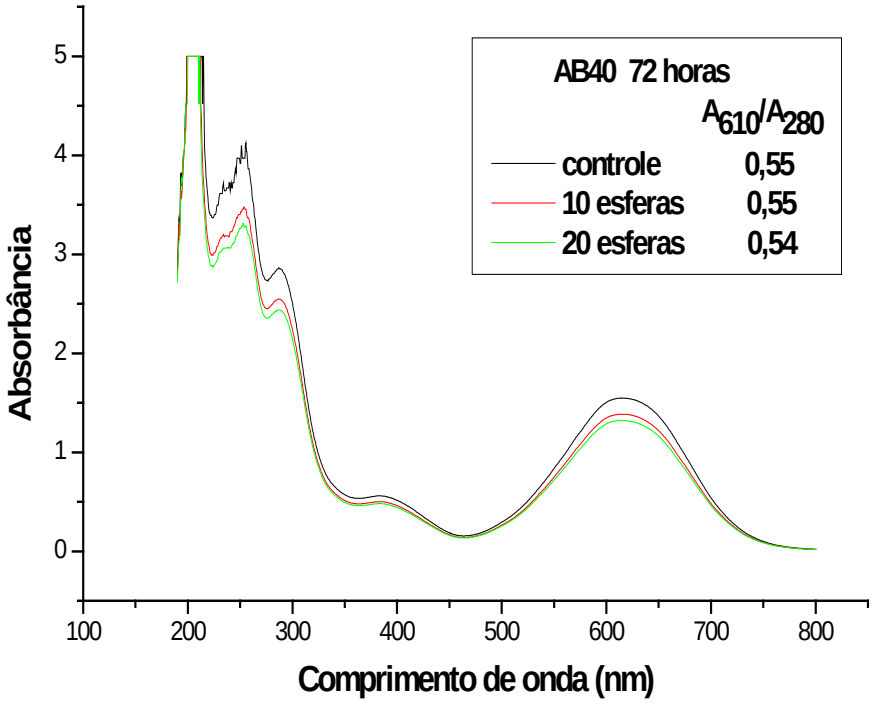

Figura 17: Espectro de absorção do corante Acid Blue 40 após interação com 10 e 20 esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada por 72 horas em pH 2,50.
Caminho óptico: 1,0 cm.
Cubeta de Quartzo.
(----controle, ----10 esferas, ----20 esferas).

ACID BLUE 40 - 216 horas ABSORBÂNCIAS RELATIVAS

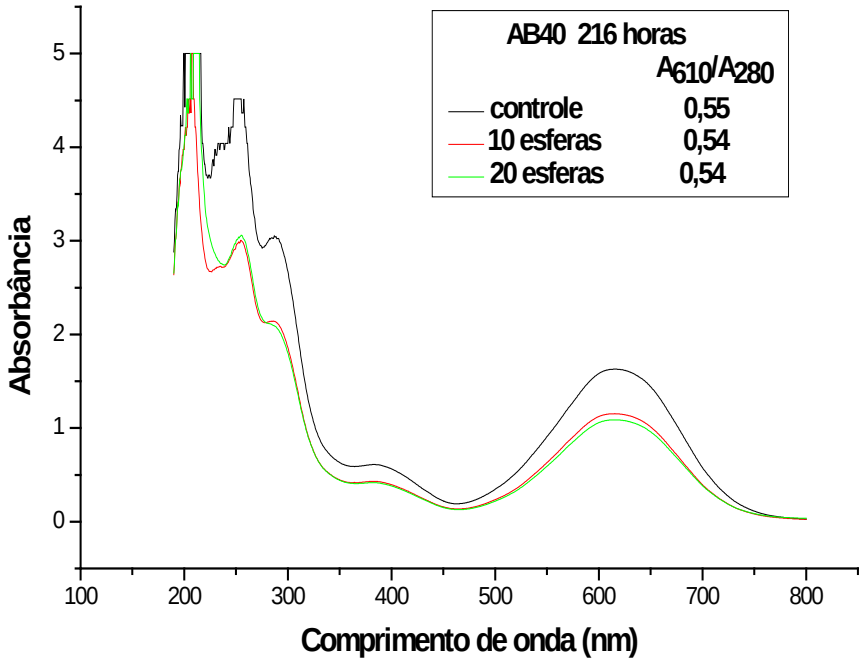

Figura 18: Espectro de absorção do corante Acid Blue 40 após interação com 10 e 20 esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada por 216 horas em pH 2,50.
Caminho óptico: 1,0 cm.
Cubeta de Quartzo.
(----controle, ----10 esferas, ----20 esferas)

ACID BLUE 40 - 360 horas **ABSORBÂNCIAS RELATIVAS**

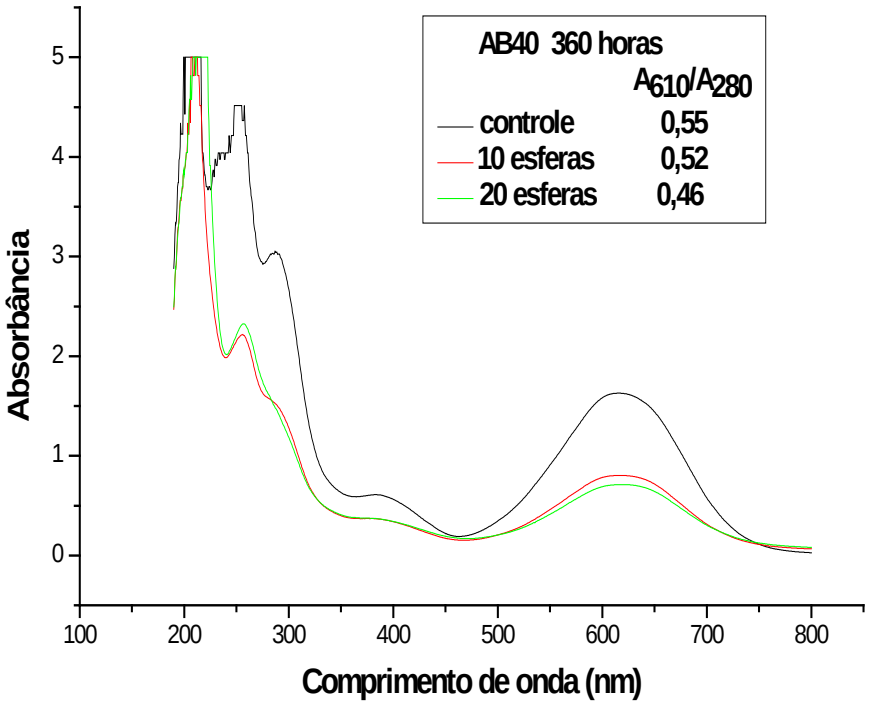

Figura 19: Espectro de Absorção do corante Acid Blue 40 após interação com 10 e 20 esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada por 360 horas em pH 2,50.
Caminho óptico: 1,0 cm.
Cubeta de Quartzo.
(----controle, ----10 esferas, ----20 esferas)

O processo biodegradativo ocorreu a partir de 48 horas de tratamento com 20 gotas da suspensão 2% da levedura, pois o valor da Absorbância Relativa sofreu variação de 0,55 para 0,48. Este processo também foi evidenciado pela diminuição do pico em 280 nm, que indica a remoção da carbonila da molécula do corante.

De acordo com os valores das Absorbâncias Relativas apresentados nas Figuras 17 e 18, o processo predominante na remoção do corante Acid Blue 40 após 72 e 216 horas de tratamento com células imobilizadas foi o da biossorção, pois, nas soluções que continham tanto 10 como 20 esferas, estes valores permaneceram constantes quando comparados com o valor da Absorbância Relativa da solução controle; já com 360 horas de tratamento, como mostra a Figura 19, os valores das Absorbâncias Relativas começaram a sofrer alterações dando indícios do começo do processo biodegradativo.

Nas Figuras 20 e 21 estão representados os espectros UV-Vis e os valores das Absorbâncias Relativas das soluções do Acid Red 151 que foram tratadas por 48 e 72 horas com 2 e 5 gotas da suspensão 2% da levedura. Nas Figuras 22, 23 e 24, estão representados os espectros UV-Vis e as Absorbâncias Relativas das soluções do Acid Red 151 que foram tratadas por 72, 144 e 216 horas, respectivamente, com 10 e 20 esferas com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada.

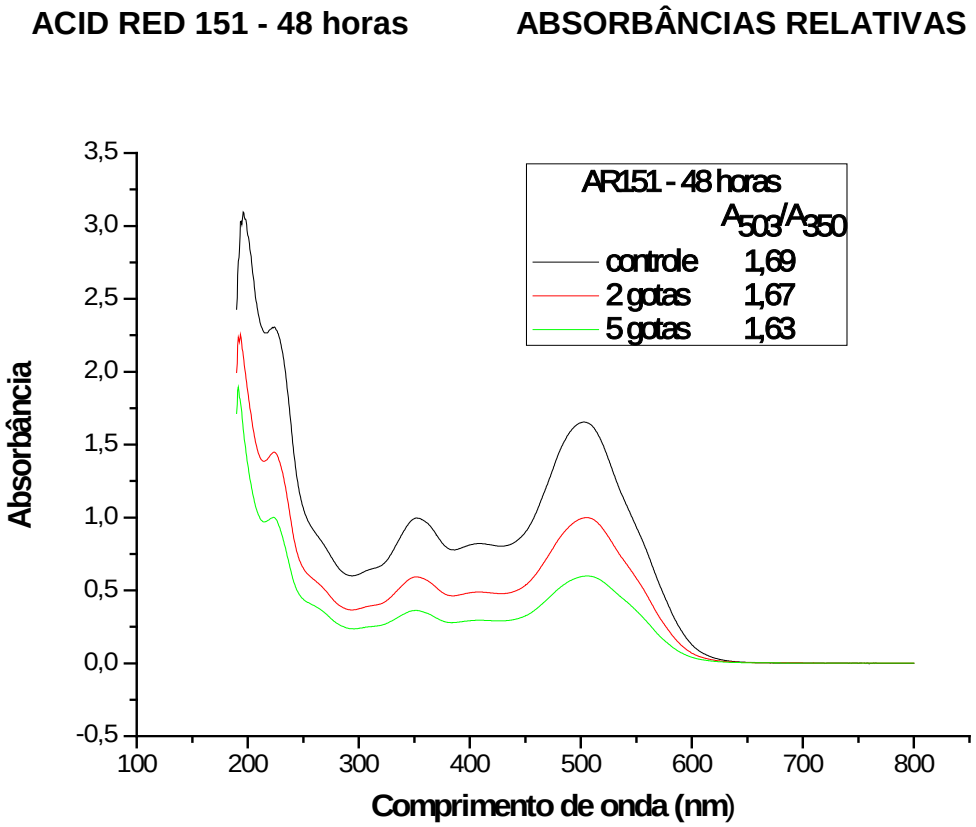

Figura 20: Espectro de absorção do corante Acid Red 151 após interação com 2 e 5 gotas da suspensão 2% da *Saccharomyces cerevisiae* por 48 horas em pH 2,50.
Caminho óptico: 1,0 cm.
Cubeta de Quartzo.
(----controle, ----2 gotas, ----5 gotas).

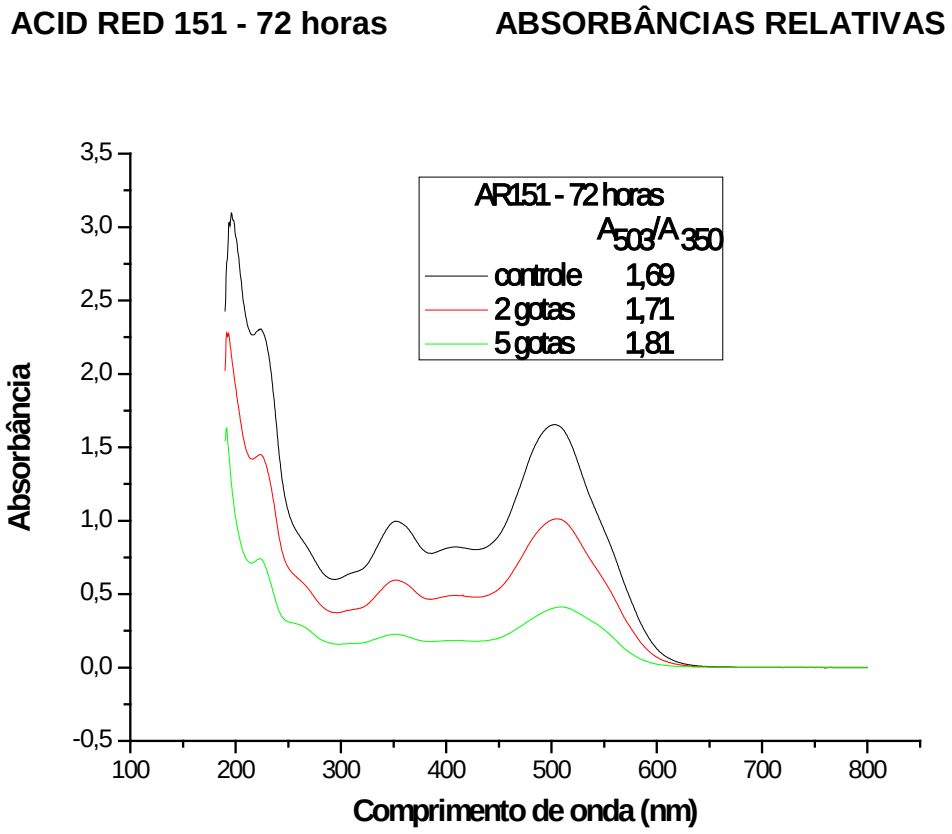

Figura 21: Espectro de absorção do corante Acid Red 151 após interação com 2 e 5 gotas da suspensão 2% da *Saccharomyces cerevisiae* por 72 horas em pH 2,50.
Caminho óptico: 1,0 cm.
Cubeta de Quartzo.
(----controle, ----2 gotas, ----5 gotas).

ACID RED 151 - 72 horas **ABSORBÂNCIAS RELATIVAS**

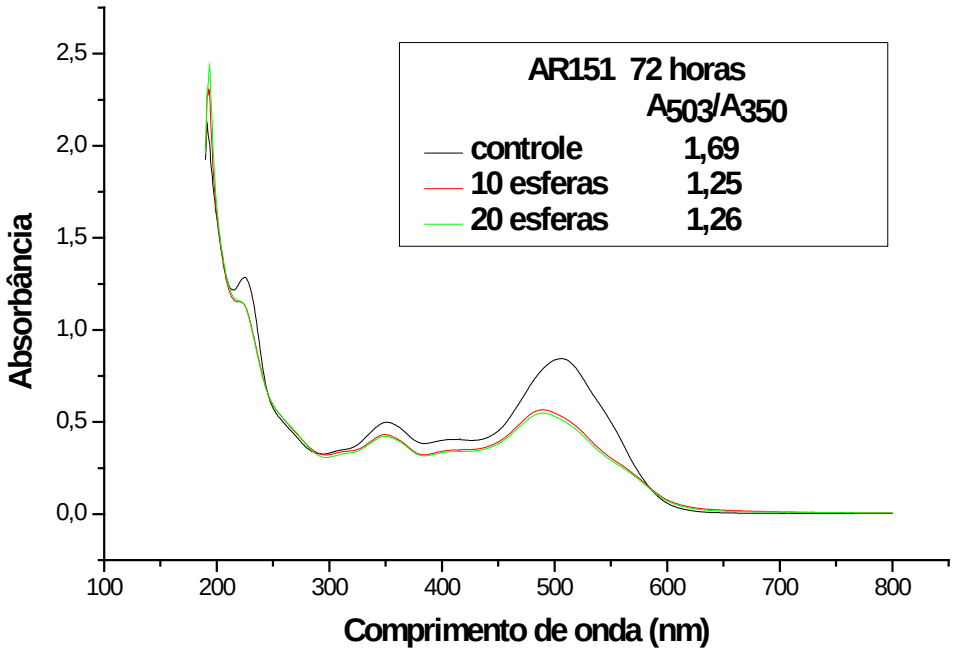

Figura 22: Espectro de Absorção do corante Acid Red 151 após interação com 10 e 20 esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada por 72 horas em pH 2,50.
Caminho óptico: 1,0 cm.
Cubeta de Quartzo.
(----controle, ----10 esferas, ----20 esferas)

ACID RED 151 - 144 horas ABSORBÂNCIAS RELATIVAS

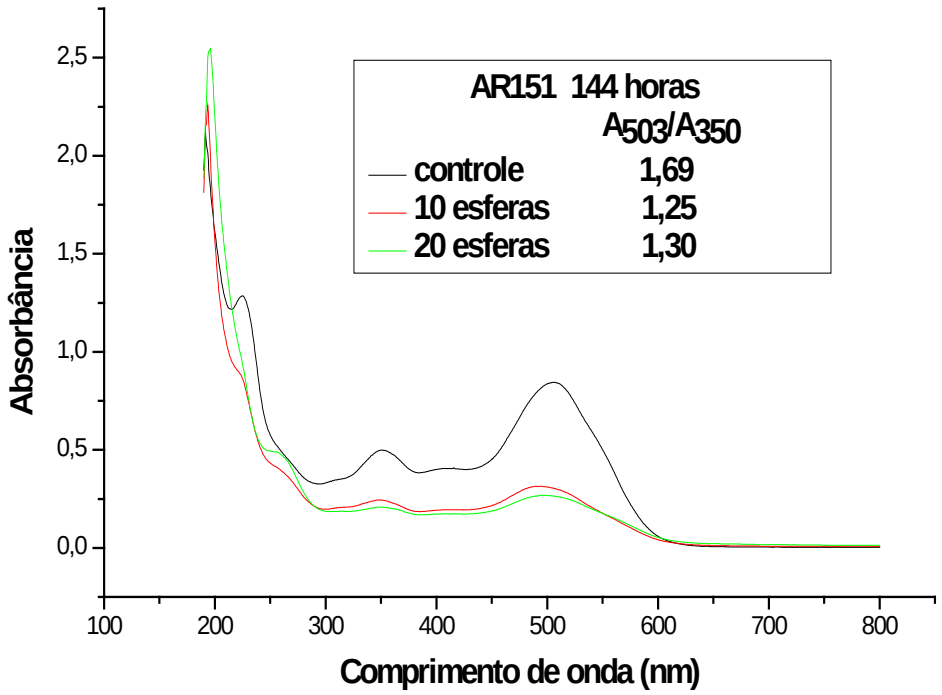

Figura 23: Espectro de Absorção do corante Acid Red 151 após interação com 10 e 20 esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada por 144 horas em pH 2,50.
Caminho óptico: 1,0 cm.
Cubeta de Quartzo.
(----controle, ----10 esferas, ----20 esferas)

ACID RED 151 - 216 horas **ABSORBÂNCIAS RELATIVAS**

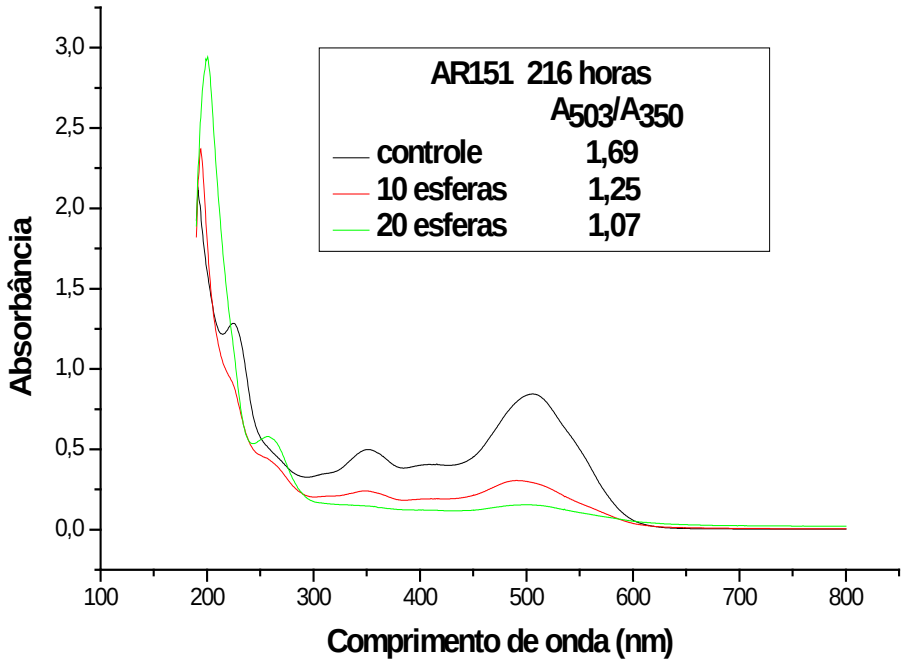

Figura 24: Espectro de Absorção do corante Acid Red 151 após interação com 10 e 20 esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada por 216 horas em pH 2,50.
Caminho óptico: 1,0 cm.
Cubeta de Quartzo.
(----controle, ----10 esferas, ----20 esferas)

Com o Acid Red 151 o processo biodegradativo com células livres também ocorreu a partir de 48 horas de tratamento com 2 e 5 gotas da suspensão 2% da levedura. Isto pôde ser observado pela variação dos valores das Absorbâncias Relativas e também pela diminuição do pico em torno de 350 nm, que pode ter ocorrido devido à quebra das ligações azo, que são caracterizadas nessa região do espectro.

De acordo com os valores das Absorbâncias Relativas apresentados nas Figuras 22, 23 e 24, o processo predominante na remoção do corante Acid Red 151 foi o da biodegradação, pois as soluções que continham tanto 10 como 20 esferas com levedura imobilizada obtiveram valores variáveis (1,69 a 1,07) quando comparados com o valor da Absorbância Relativa da solução controle, onde não houve contato com o microrganismo.

A biodegradação foi melhor identificada nas soluções que continham 20 esferas e que ficaram em tratamento por um período de tempo mais longo; visto que a carga microbiana presente nessas soluções foi maior que nas soluções que continham 10 esferas. Segundo Daneshvar, Salari e Khataee (2003), a remoção da cor é atribuída à cisão da ligação dupla entre os átomos de nitrogênio (–N=N-) do azo corante, que funciona como sítio ativo para o ataque enzimático, e de acordo com Ramalho (2005), em *Saccharomyces cerevisiae* o sistema de redutases férricas participa na redução extracelular dos corantes azóicos.

4.7 Análises de FTIR das Soluções que foram Tratadas com Células Imobilizadas

Os espectros de FTIR foram normalizados pela intensidade de absorbância de uma banda de cada corante que não sofreu alteração significativa após os tratamentos, sendo considerada banda de padrão interno. Para o Acid Blue 40 a banda de padrão interno foi a 850 cm^{-1} (referente ao anel aromático) e para o Acid Red 151 foi a 657 cm^{-1} (referente à hidroxila do grupo fenólico). Foi feita ainda a desconvolução pela função Lorentziana segundo Forato, Filho e Colnago (1998) da região de 1300-1000 cm^{-1} dos espectros obtidos após 72 horas de tratamento com 10 esferas com a *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada, para obter melhor resolução e facilitar a identificação das bandas. Considerou-se para a análise de biodegradação, mudanças espectrais como o deslocamento, surgimento ou desaparecimento e aumento ou dimuição de intensidade das bandas.

4.7.1 Análises de FTIR do Corante Acid Blue 40

Nas análises de FTIR do corante Acid Blue 40 foi possível verificar a ocorrência de biodegradação em diferentes intervalos de tempo.

Na Figura 25 está representado o espectro de FTIR (1800 - 500 cm^{-1}) da solução controle do corante Acid Blue 40 e nas Figuras 26 e 27 estão representados os espectros de FTIR (1800 - 500 cm^{-1}) do mesmo corante, da solução controle com os espectros das soluções após o tratamento com 10 esferas e espectro da solução controle com os espectros das soluções após o tratamento com 20 esferas de alginato de cálcio com levedura imobilizada, respectivamente; por 72, 216 e 360 horas, onde foi possível avaliar as possíveis modificações ocorridas na estrutura da molécula do corante.

Na Figura 28 está representado o espectro de FTIR (1300 - 1000 cm^{-1}) da solução do Acid Blue 40 após o tratamento por 72 horas com 10 esferas com a levedura imobilizada, normalizado e desconvoluído, para melhor interpretação das bandas nessa região.

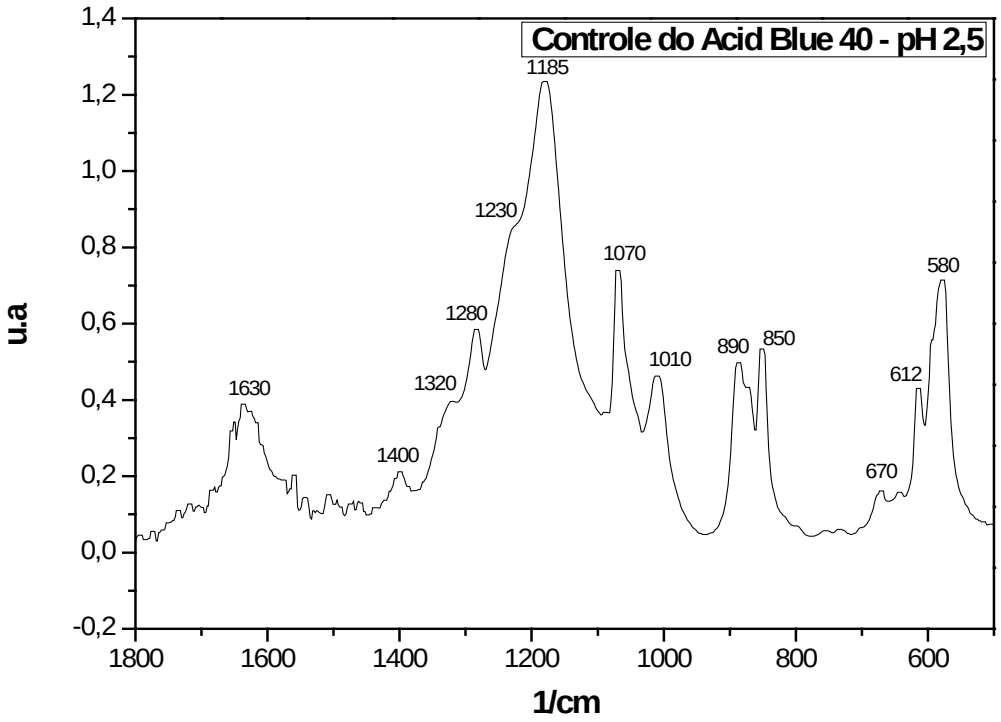

Figura 25: Espectro de FTIR na região de 1800 a 500 cm^{-1} da solução controle do Acid Blue 40. Obs.: absorbância em 850 cm^{-1} como padrão interno.

Bandas originais do Acid Blue 40 no pH 2,5:

1630 cm^{-1}: carbonila e grupo amida (FANCHIANG; TSENG, 2009).

1400 cm^{-1}: grupo quinona (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).

1320 e 1280 cm^{-1}: amino benzeno (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).

1230 cm^{-1}: estiramento do grupo $–SO_3$ (KHALED et al., 2009).

1185, 1070 e 612 cm^{-1}: grupo sulfônico (DHANVE et al., 2009; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979; JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2008).

1010 cm^{-1}: vibração C-C-C do anel aromático e vibrações C-N aromáticas (ARJUNAN; SUBRAMANIAN; MOHAN, 2004; DYER, 1969)

890 - 850 cm^{-1}: anel aromático (POLUNIN et al., 2008).

670 cm^{-1}: vibração C-N (TELKE et al., 2009).

580 cm^{-1}: vibração C=C do anel aromático (POLUNIN et al., 2008).

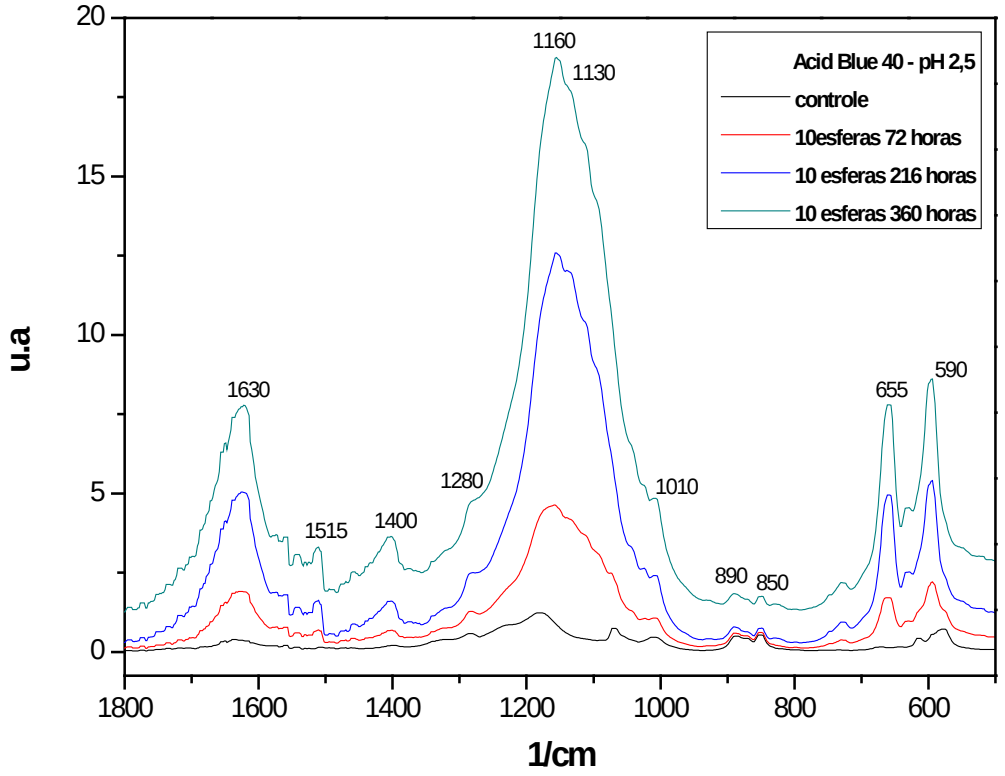

Figura 26: Espectro de FTIR na região de 1800 a 500 cm^{-1} do corante Acid Blue 40 controle e após a interação com 10 esferas com levedura imobilizada por 72, 216 e 360 horas. Obs.: absorbância em 850 cm^{-1} como padrão interno.

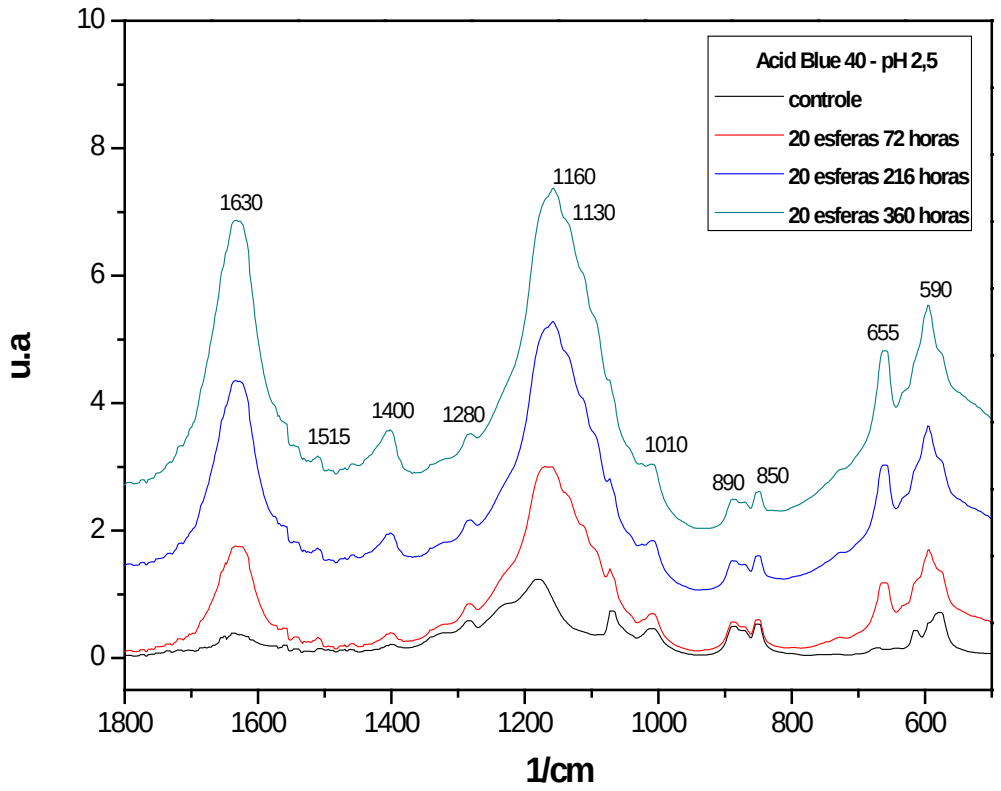

Figura 27: Espectro de FTIR na região de 1800 a 500 cm^{-1} do corante Acid Blue 40 controle e após a interação com 20 esferas com levedura imobilizada por 72, 216 e 360 horas. Obs.: absorbância em 850 cm^{-1} como padrão interno.

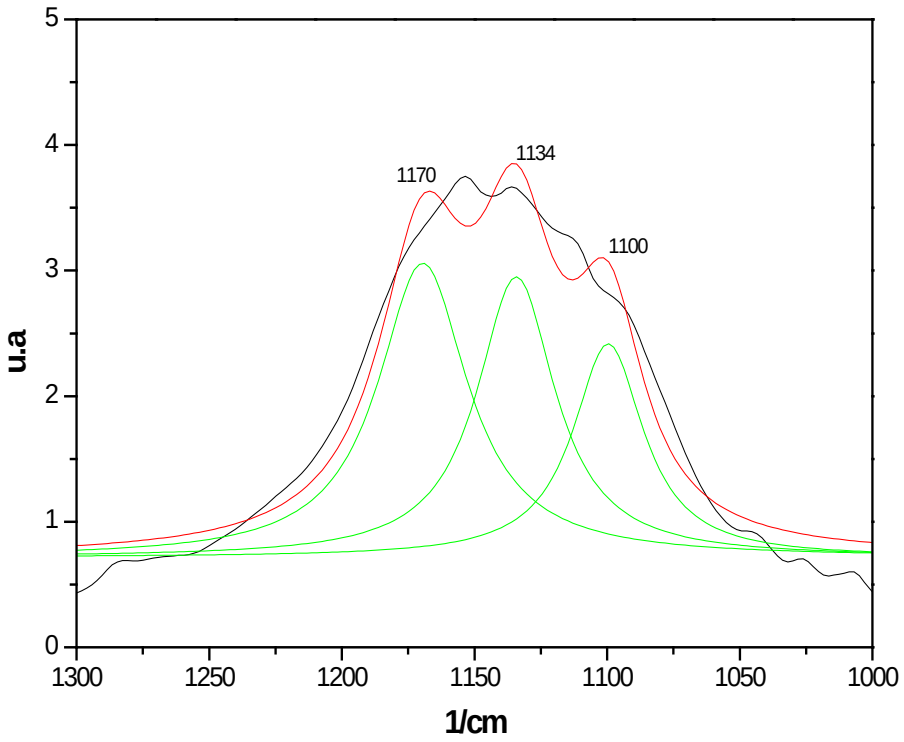

Figura 28: Espectro de FTIR com ajuste Lorentziano da solução do Acid Blue 40 após o tratamento por 72 horas com 10 esferas com levedura imobilizada, na faixa de 1300 – 1000 cm^{-1}. Obs.: absorbância em 850 cm^{-1} como padrão interno. (----- espectro original, -----, ----- bandas desconvoluídas do espectro original).

Apesar dos valores das Absorbâncias Relativas terem indicado que o processo biodegradativo deu início a partir de 360 horas de contato com a levedura imobilizada, nos espectros de FTIR foi possível observar algumas modificações que ocorreram na estrutura molecular do corante com o aparecimento de banda na região de 655 cm^{-1} e com o aumento de intensidade da banda na região de 1400 cm^{-1}, indicando a presença de grupos fenólicos provenientes da transformação das carbonilas do grupo das quinonas (ABBAS et al., 2008; DHANVE et al., 2009; POLJANŠEK; KRAJNC, 2005; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979) nas soluções já a partir de 72 horas após o início dos testes, tanto nas soluções que entraram em contato com 10 quanto nas que entraram em contato com 20 esferas com a *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada.

Observou-se também o aumento da intensidade da banda na região de 1630 cm^{-1} que indica a carbonila do grupo amida (AKAR et al., 2009; BILBA; SUTEU; MALUTAN, 2008; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979), esta banda se

acentuou com o decorrer do tempo de tratamento. O grupo amida também está representado pelas novas bandas nas regiões de 1160 cm^{-1} (estiramento C-N) (AKAR et al., 2009) e 1515 cm^{-1}, (vibrações de deformação N-H) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).

Outras bandas que surgiram após o tratamento por 72 horas com 10 esferas com a levedura imobilizada foram as bandas na região de 1130 cm^{-1} e região de 1100 cm^{-1} (observadas no espectro após a desconvolução) que indicam a presença de grupos aminos e grupos sulfônicos (FANCHIANG; TSENG, 2009; IYIM; ACAR; OZGUMUS, 2008; JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2008).

A estrutura molecular do corante Acid Blue 40 e seus possíveis subprodutos após a quebra da molécula pela levedura estão representados na Figura 29. O esquema foi elaborado baseado na literatura que inclui: Fanchiang e Tseng (2009), Dhanve et al., (2009), Dhanve; Shedbalkar; Jadhav (2008) e Tang e An (1995).

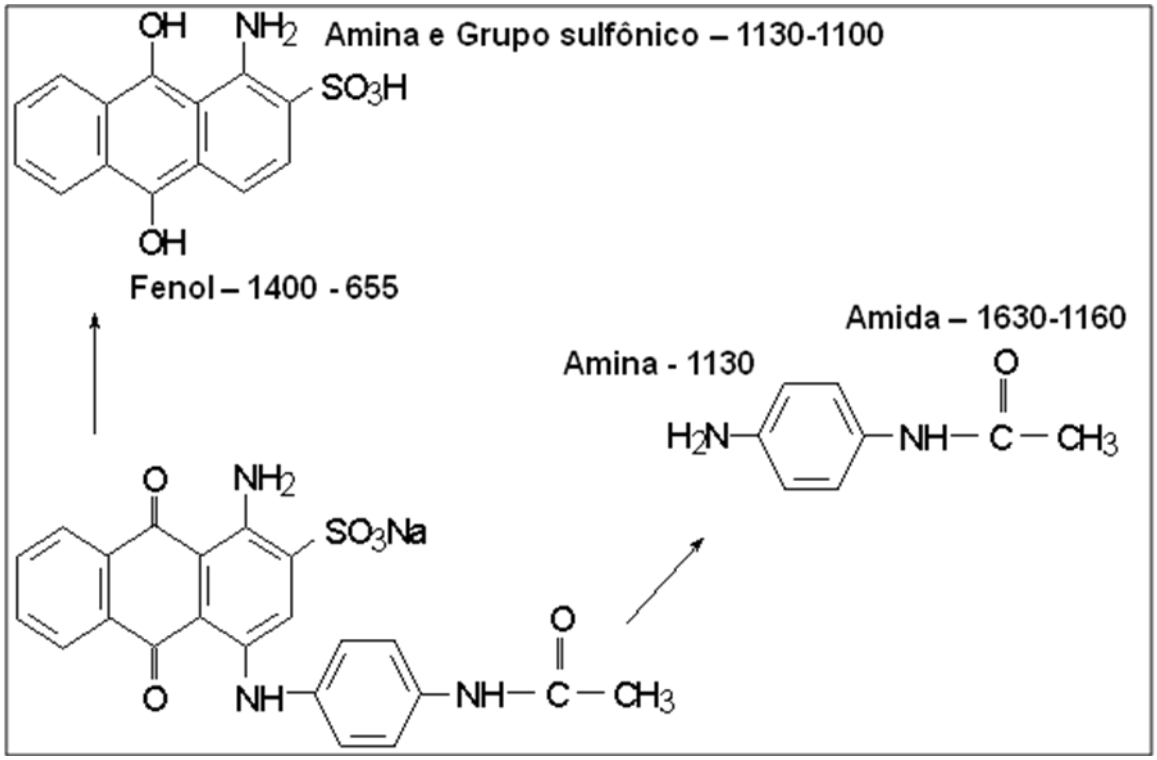

Figura 29: Caminho proposto para a degradação da molécula do corante Acid Blue 40 após tratamento com as esferas de alginato de cálcio com a *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada.

As bandas do FTIR das soluções experimentais que indicaram a quebra da estrutura molecular do corante e o aparecimento de metabólitos foram descritas juntamente com os grupos orgânicos a que se referem de acordo com a literatura, como se segue:

Bandas que surgiram ou que ficaram mais evidentes após os tratamentos do Acid Blue 40 com 10 e 20 esferas com levedura imobilizada :

1630 cm^{-1}: carbonila do grupo amida (AKAR et al., 2009; BILBA; SUTEU; MALUTAN, 2008; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).
1515 e 1160 cm^{-1}: vibrações de deformação N-H e estiramento C-N de amida (AKAR et al., 2009; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).
1412 - 1380 cm^{-1}: deformação O-H de possíveis grupos fenólicos (ABBAS et al., 2008; DHANVE et al., 2009; POLJANŠEK; KRAJNC, 2005; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).
1130 – 1100 cm^{-1}: Grupo amino C-NH_2 e grupos sulfônicos (FANCHIANG; TSENG, 2009; JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2008; IYIM; ACAR; OZGUMUS, 2008).
655 cm^{-1}: O-H de grupos fenólicos (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).
590 cm^{-1}: vibração C=C do anel aromático (POLUNIN et al., 2008).

4.7.2 Análises de FTIR do Corante Acid Red 151

Na Figura 30 está representado o espectro de FTIR (1800 - 500 cm^{-1}) da solução controle do corante Acid Red 151 e nas Figuras 31 e 32 estão representados os espectros de FTIR (1800 - 500 cm^{-1}) do mesmo corante, da solução controle com os espectros das soluções após o tratamento com 10 esferas e espectro da solução controle com os espectros das soluções após o tratamento com 20 esferas de alginato de cálcio com levedura imobilizada, respectivamente; por 72, 144 e 216 horas, onde foi possível avaliar as possíveis modificações ocorridas na estrutura da molécula do corante.

Na Figura 33 está representado o espectro de FTIR (1300 - 1000 cm^{-1}) da solução do Acid Red 151 após o tratamento por 72 horas com 10 esferas com a levedura imobilizada, normalizado e desconvoluído, para melhor interpretação das bandas nessa região.

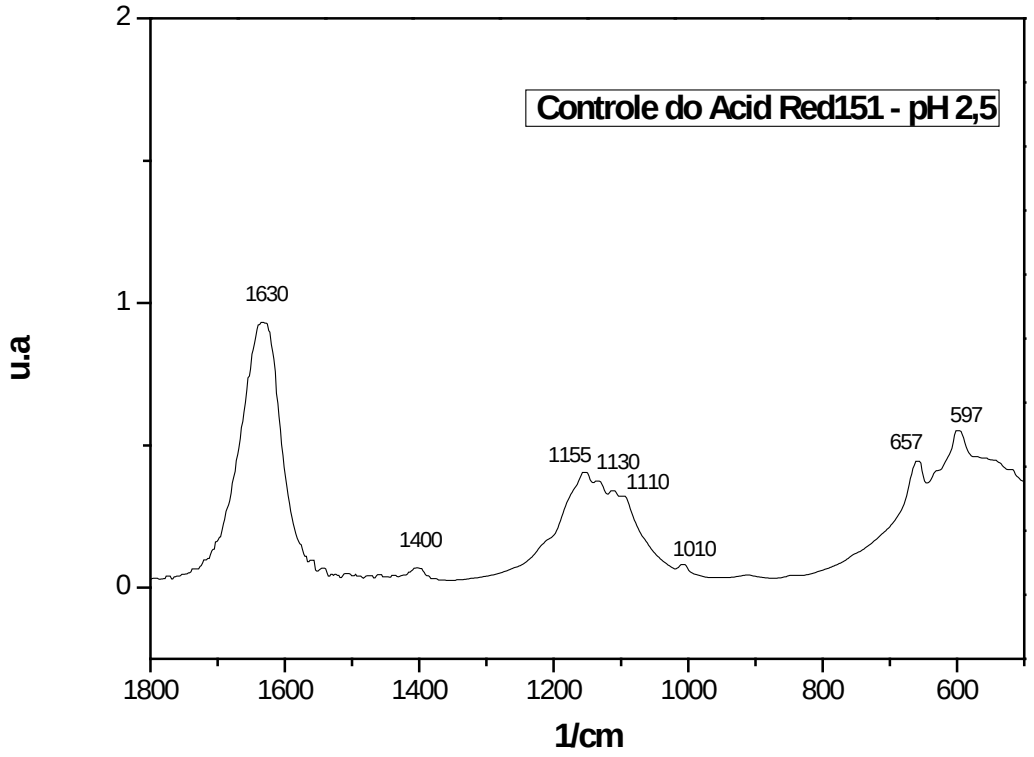

Figura 30: Espectro de FTIR na região de 1800 a 500 cm^{-1} da solução controle do Acid Red 151. Obs.: absorbância em 657 cm^{-1} como padrão interno.

Bandas originais do Acid Red 151 no pH 2,5:

1630 e 1400 cm^{-1}: estiramento das ligações azóicas (-N=N-) (DYER, 1969; GUP; GIZIROGLU; KIRKAN, 2007; KALME et al., 2007).

1155, 1130 e 1110 cm^{-1}: estiramento da ligação -C-N- e grupo sulfônico (FANCHIANG; TSENG, 2009; JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2008; IYIM; ACAR; OZGUMUS, 2008; KHALED et al., 2009).

1010 e 597 cm^{-1}: vibrações dos anéis aromáticos (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979; ARJUNAN; SUBRAMANIAN; MOHAN, 2004; POLUNIN et al., 2008).

657 cm^{-1}: O-H de grupo fenólico (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).

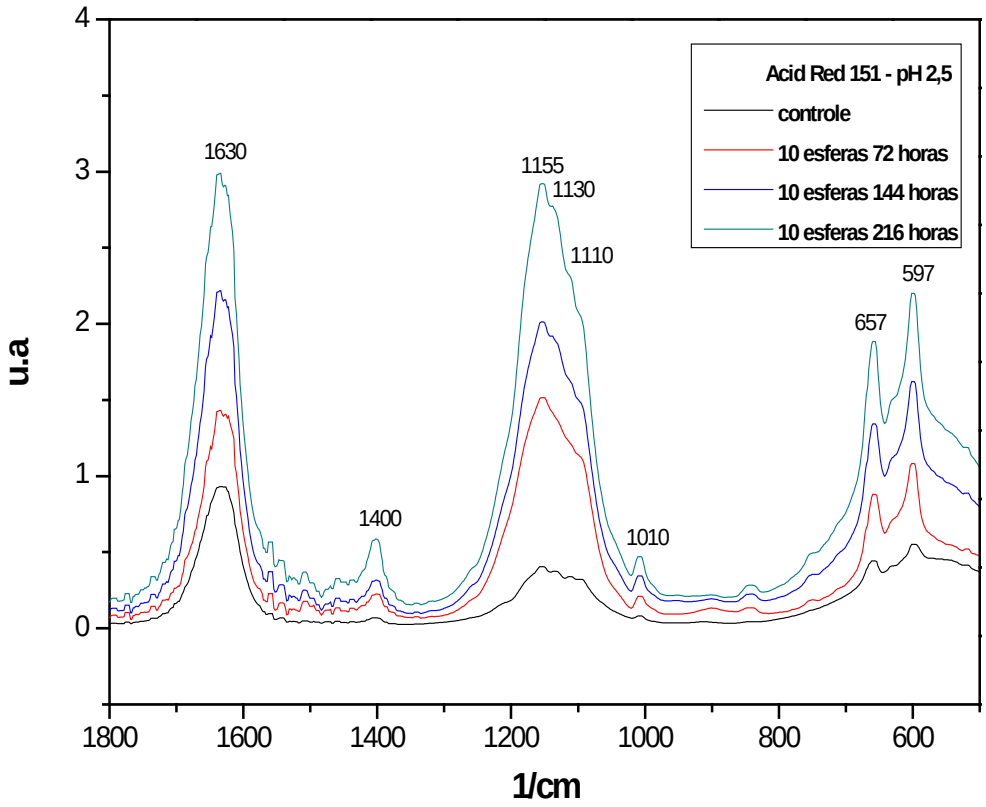

Figura 31: Espectro de FTIR na região de 1800 a 500 cm^{-1} do corante Acid Red 151 controle e após a interação com 10 esferas com levedura imobilizada por 72, 144 e 216 horas. Obs.: absorbância em 657 cm^{-1} como padrão interno.

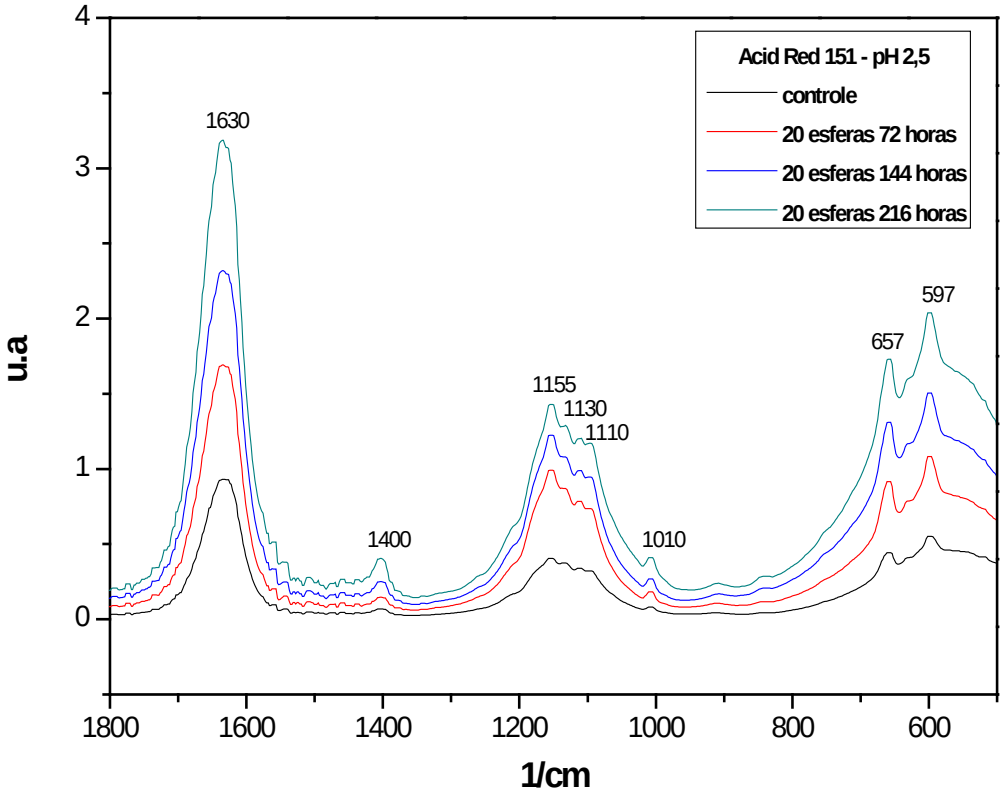

Figura 32: Espectro de FTIR na região de 1800 a 500 cm^{-1} do corante Acid Red 151 controle e após a interação com 20 esferas com levedura imobilizada por 72, 144 e 216 horas. Obs.: absorbância em 657 cm^{-1} como padrão interno.

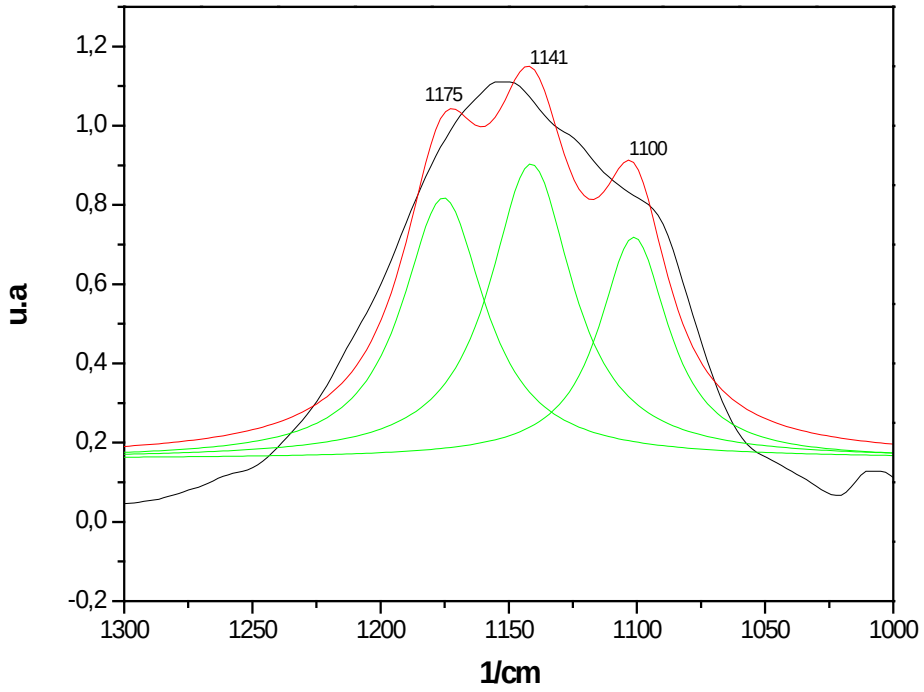

Figura 33: Espectro de FTIR com ajuste Lorentziano da solução do Acid Red 151 após o tratamento por 72 horas com 10 esferas com levedura imobilizada, na faixa de 1300 – 1000 cm^{-1}. Obs.: absorbância em 657 cm^{-1} como padrão interno. (----- espectro original, -----, ----- bandas desconvoluídas do espectro original)

Assim como foi observado através dos valores das Absorbâncias Relativas que o processo biodegradativo do corante Acid Red 151 deu início a partir de 72 horas de contato tanto com 10 como com 20 esferas de alginato de cálcio com a levedura imobilizada, a análise de FTIR também revelou a ocorrência deste processo já no início do tratamento com o microrganismo, mostrando através dos espectros obtidos, modificações que ocorreram na estrutura molecular do corante com bandas que ficaram mais evidentes como as bandas em 1630 e 1400 cm^{-1} que podem representar além das ligações azóicas, as aminas primárias (DYER, 1969; SHARMA; LAHIRI, 2008; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979; JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2008). Segundo Jadhav et al. (2007) o aumento de intensidade da banda em 1630 cm^{-1} pode ocorrer devido a quebra das ligações azóicas promovida pela ação das azoredutases, liberando como metabólitos substâncias tóxicas e cancerígenas como as aminas.

Outras bandas que se destacaram com a biodegradação foram as bandas nas regiões de 1150, 1130 e 1110 cm^{-1} que se referem às ligações -C-N- e aos grupos

sulfônicos (FANCHIANG; TSENG, 2009; JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2008; IYIM; ACAR; OZGUMUS, 2008; KHALED et al., 2009).

As bandas nas regiões de 1010 e 590 cm^{-1} se referem aos anéis aromáticos (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979; ARJUNAN; SUBRAMANIAN; MOHAN, 2004; POLUNIN et al., 2008) e a banda na região 657 cm^{-1} se refere a hidroxila do grupo fenólico (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).

A estrutura molecular do Acid Red 151 e seus possíveis subprodutos após a quebra da molécula pela levedura estão representados na Figura 34. O esquema foi elaborado baseado na literatura que inclui: Ali et al. (2008), Kalme; Ghodake; Govindwar (2007), Dhanve et al. (2009) e Dhanve; Shedbalkar; Jadhav (2008).

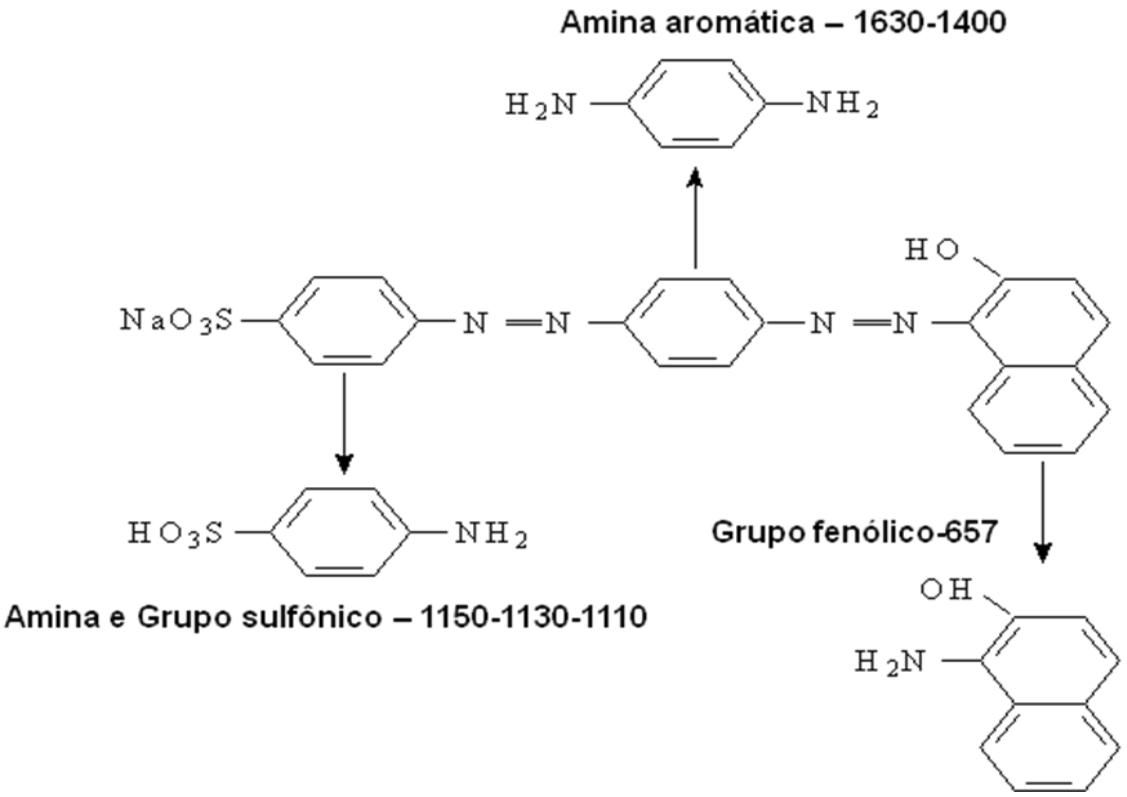

Figura 34: Caminho proposto para a degradação da molécula do corante Acid Red 151 após a interação com as esferas de alginato de cálcio com a *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada.

Não foi observada nenhuma mudança quanto ao surgimento de novas bandas nos espectros de FTIR das soluções experimentais do Acid Red 151 após os tratamentos, mas foi possível observar que as principais bandas, as que se referem às ligações azóicas e ao grupo das aminas, sofreram aumento de intensidade com o decorrer do tempo de tratamento, indicando que com a quebra da molécula e a quebra das ligações azóicas, as aminas se desprenderam da estrutura e ficaram mais evidentes nos espectros. Através do espectro desconvoluído foi possível verificar o deslocamento de bandas, como as na região de 1155, 1130 e 1110 cm^{-1} que, após o tratamento por 72 horas com 10 esferas com levedura imobilizada, apareceram na região de 1175, 1141 e 1100 cm^{-1}, respectivamente.

4.8 Análises de FTIR das Soluções que foram Tratadas com Células Livres

Os espectros de FTIR das soluções tratadas com células livres do Acid Blue 40 estão representados nas Figuras 35 e 36 e do Acid Red 151 nas Figuras 37 e 38.

4.8.1 Análises de FTIR do Corante Acid Blue 40

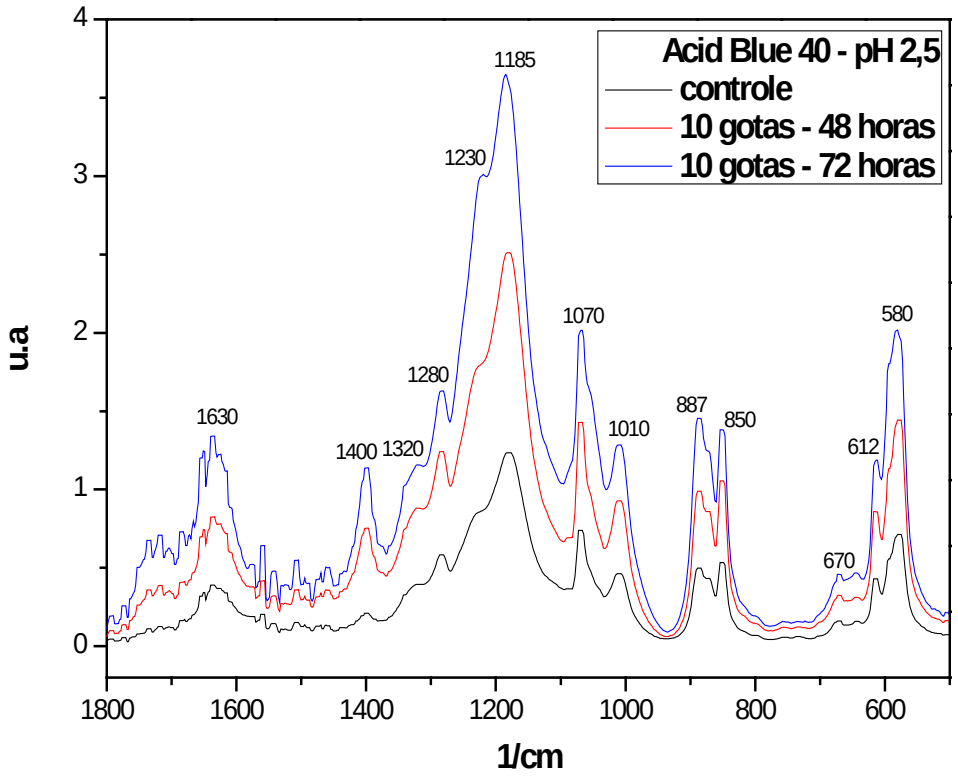

Figura 35: Espectro de FTIR na região de 1800 a 500 cm^{-1} do corante Acid Blue 40 controle e após o tratamento por 48 e 72 horas com 10 gotas da suspensão 2% da levedura. Obs.: absorbância em 850 cm^{-1} como padrão interno.

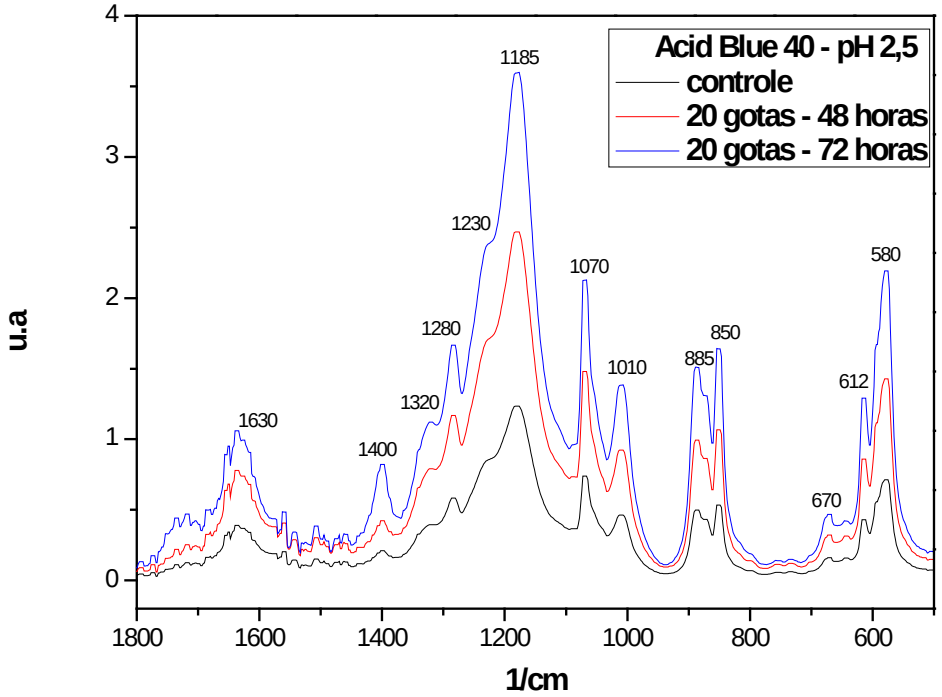

Figura 36: Espectro de FTIR na região de 1800 a 500 cm^{-1} do corante Acid Blue 40 controle e após o tratamento por 48 e 72 horas com 20 gotas da suspensão 2% da levedura. Obs.: absorbância em 850 cm^{-1} como padrão interno.

As análises de FTIR foram realizadas a partir de 48 horas de tratamento com células livres porque os valores das Absorbâncias Relativas sofreram alterações nesse tempo de tratamento, indicando o início do processo biodegradativo. Não foi observada nenhuma diferença quanto a formação de bandas nos espectros das soluções tratadas com células livres quando comparadas com os espectros das soluções tratadas com células imobilizadas, mas foi observada aumento na intensidade destas bandas nas soluções que foram tratadas com 10 e 20 gotas por 72 horas quando comparadas com os espectros das soluções tratadas com essa mesma quantidade de células livres por 48 horas, mostrando que o tempo de tratamento influencia no processo biodegradativo.

É importante observar que com 48 horas de tratamento com apenas 10 gotas da suspensão 2% de células livres, a banda na região de 1400 cm^{-1} já ficou mais evidente, mostrando a possível quebra do grupo quinona com a formação do grupo fenólico, que é caracterizada nesta região do espectro (ABBAS et al., 2008; DHANVE et al., 2009; POLJANŠEK; KRAJNC, 2005).

4.8.2 Análises de FTIR do Corante Acid Red 151

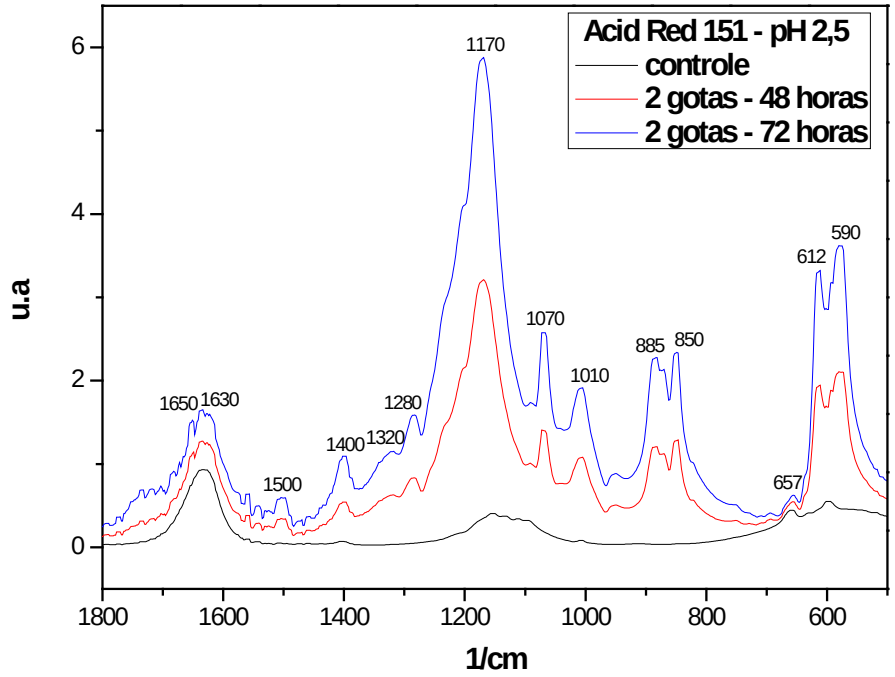

Figura 37: Espectro de FTIR na região de 1800 a 500 cm^{-1} do corante Acid Red 151 controle e após o tratamento por 48 e 72 horas com 2 gotas da suspensão 2% da levedura. Obs.: absorbância em 657 cm^{-1} como padrão interno.

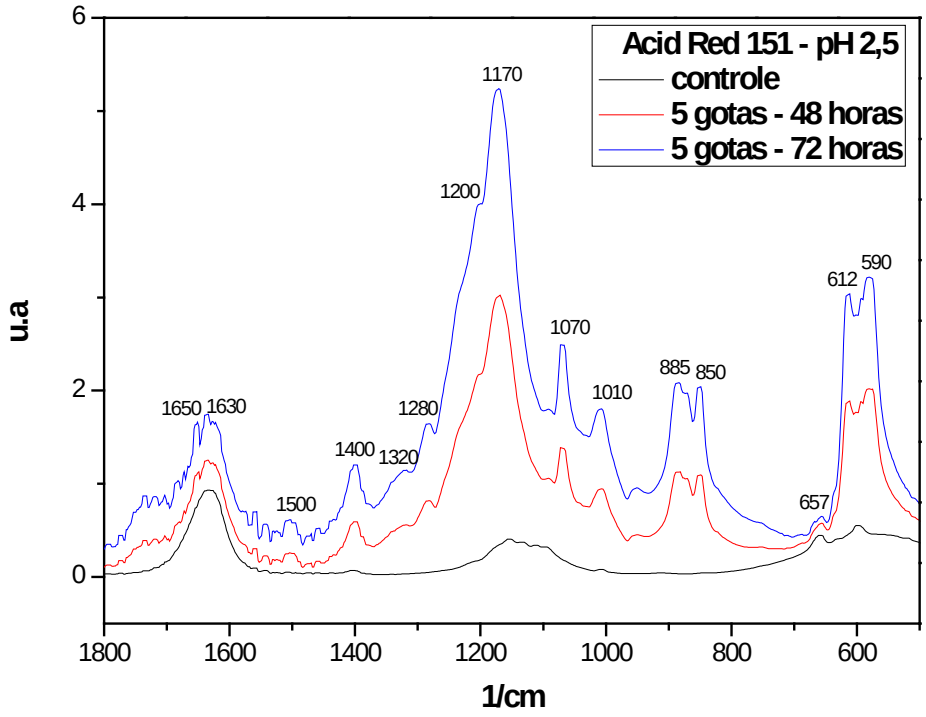

Figura 38: Espectro de FTIR na região de 1800 a 500 cm^{-1} do corante Acid Red 151 controle e após o tratamento por 48 e 72 horas com 5 gotas da suspensão 2% da levedura. Obs.: absorbância em 657 cm^{-1} como padrão interno.

As análises de FTIR do corante Acid Red 151 também foram realizadas a partir de 48 horas de tratamento com células livres porque os valores das Absorbâncias Relativas sofreram alterações nesse tempo de tratamento, dando indícios do começo do processo biodegradativo. Foi observada a formação de novas bandas nos espectros das soluções tratadas com células livres quando comparadas com os espectros das soluções tratadas com células imobilizadas, sendo elas as bandas nas regiões de 1500, 1320 e 1280 cm^{-1} – aminas primárias (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979), 1070 cm^{-1} - grupos sulfônicos (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979), 885 e 850 cm^{-1}- anel aromático (POLUNIN et al., 2008). Todas as bandas ficaram mais evidentes com 72 horas de tratamento.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- A técnica de imobilização da *Saccharomyces cerevisiae* se mostrou eficaz para a biossorção e biodegradação dos corantes Acid blue 40 e Acid Red 151, sendo uma técnica promissora para uso em tratamento de efluentes de indústrias têxteis, pois, além de eficiente, é uma técnica simples e de baixo custo.
- A remoção da cor ocorreu melhor nas soluções que entraram em contato com a levedura imobilizada por um tempo mais longo e nas que entraram em contato com o maior número de esferas com a levedura imobilizada, chegando a atingir 61,7% de descoloração após 360 horas com 20 esferas para o Acid Blue 40 e 81,9% de descoloração com 216 horas de tratamento para o Acid Red 151.
- Através dos valores das Absorbâncias Relativas, que não sofreram alterações significativas para o Acid Blue 40, foi possível sugerir que o processo biodegradativo deste corante, deu início a partir de 360 horas de tratamento com células imobilizadas. Porém, através das análises de FTIR, foi observada a formação de bandas no espectro indicando a formação de compostos tóxicos pela biodegradação da molécula do corante já a partir de 72 horas, tanto nas soluções que foram tratadas com 10 como nas soluções que foram tratadas com 20 esferas de alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada.

- Com o corante Acid Red 151, os valores das Absorbâncias Relativas indicaram a ocorrência do processo biodegradativo a partir de 72 horas de tratamento, o que foi confirmado pelos espectros de FTIR, que mostraram alterações na estrutura molecular do corante e a formação de compostos tóxicos.
- Para que as indústrias têxteis possam aplicar esta técnica de imobilização celular no tratamento de seus efluentes, é necessário um controle do tempo de tratamento, visando a ocorrência apenas da biossorção, e não da biodegradação, evitando assim a formação de compostos como os grupos fenólicos obtidos pela biodegradação do Acid Blue 40 e grupos aminos, obtidos pela biodegradação do Acid Red 151, que são compostos prejudiciais aos mananciais e à saúde pública, pois são compostos tóxicos e cancerígenos.
- Apesar do tratamento com células livres oferecer a vantagem de fazer a remoção dos corantes com maior rapidez, o tratamento com células imobilizadas apresenta maior vantagem em relação ao aspecto econômico, pois como as esferas com a levedura imobilizada ficam sedimentadas, não seria necessária centrifugação, ou um gasto de energia para separá-las do efluente, o que acontece no caso do tratamento com células livres que ficam em suspensão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, O.; REBUFA, C.; DUPUY, N.; KISTER, J. FTIR—Multivariate curve resolution monitoring of photo-Fenton degradation of phenolic aqueous solutions - Comparison with HPLC as a reference method. **Talanta: an international journal of analytical chemistry**, London, v. 77, n. 1, p. 200-209, out. 2008.

AKAR, S.T.; GORGULU, A.; KAYNAK, Z.; ANILAN, B.; AKAR, T. Biosorption of Reactive Blue 49 dye under batch and continuous mode using a mixed biosorbent of macro-fungus *Agaricus bisporus* and *Thuja orientalis* cones. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 148, n. 1, p. 26-34, maio 2009.

AKSU, Z. Biosorption of reactive dyes by dried activated sludge: equilibrium and kinetic modeling. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 79–84, jan. 2001.

ALI, N.; HAMEED, A.; SIDDIQUI, M.F.; GHUMRO, P.B.; AHMED, S. Application of *Aspergillus niger* SA1 for the enhanced bioremoval of azo dyes in Simulated Textile Effluent. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 16, p. 3839-3845, ago. 2009.

ALI, N.; IKRAMULLAH; LUTFULLAH, G.; HAMEED, A.; AHMED, S. Decolorization of Acid Red 151 by *Aspergillus niger* SA1 under different physicochemical conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, n. 7, p. 1099-1105, jul. 2008.

AMBROSIO, S.T.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 91, n. 1, p. 69–75, jan. 2004.

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

BALAN, D.S.L. Biodegradação e Toxicidade de Efluentes Têxteis. **Revista Química Têxtil**, Barueri, v. 22, p. 26-31, 1999.

BALAN, D.S.L.; MONTEIRO, R.T.R.; MUNHOZ, J.S. Potencial de aplicação de fungos brasileiros em biotecnologia - descoloração de corantes e efluentes têxteis. In: ANAIS DO SEMINÁRIO INTERNACIONAL - APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA TÊXTIL, n. 1, 2001, Blumenau. **Anais...** Blumenau, 2001. p.128-135.

BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile dye containing effluents: A Review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 58, n. 3, p. 217-227, 1996.

BILBA, D.; SUTEU, D.; MALUTAN, T. Removal of reactive dye brilliant red HE-3B from aqueous solutions by hydrolyzed polyacrylonitrile fibres: equilibrium and kinetics modeling. **Central European Journal of Chemistry**, Warsaw, v. 6, n. 2, p. 258-266, jun. 2008.

BRAHIMI-HORN, M.C.; LIM, K.K.; LIANG, S.L.; MOU, D.G. Binding of textile azo dyes by *Myrothecium verrucaria* Orange II, 10B (blue) and RS (red) azo dye uptake for textile wastewater decolorization. **Journal of Industrial Microbiology,** Amsterdam, v. 10, p. 245 - 261, 1992.

CAMMAROTA, M.C; COELHO, M.A.Z. Tratamento Enzimático Para Remoção de Cor de Efluentes da Indústria Têxtil. **Revista Química Têxtil**, Barueri, n. 65, p. 40-47, 2001.

CHANG, R. **Physical Chemistry for the Chemical and Biological Sciences**. 3 ed. Sausalito: University Science Books, 2000. 1007p.

CHEN, J.P.; LIN, Y.S. Decolorization of azo dye by immobilized *Pseudomonas luteola* entrapped in alginate – silicate sol – gel beads. **Process Biochemistry,** London, v. 42, n. 6, p. 934 – 942, jun. 2007.

CHIBATA, I.; TOSA, T. Use of immobilized cells. **Annual Review of Biophysics & Bioengineering,** Palo Alto, v. 10, p. 197 - 216, jun. 1981.

CORSO, C.R.; DOMINGOS, R.N.; EPIPHANIO, R.; TREVISOLI, C. Estudo da interação adsortiva entre carvão de osso e o corante “Direct Violet 51” em solução aquosa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS, n. 15. 1997, São Carlos, **Anais...**São Carlos: Gráfica da Ufscar, 1997. p. II-32.

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

CORSO, C.R.; ALMEIDA, A.C.M. Bioremediation of dyes in textile effluents by *Aspergillus oryzae.* **Microbial Ecology***,* New York, v. 57, n. 2, p. 384-390, fev. 2009.

DANESHVAR, N.; AYAZLOO, M.; KHATAEE, A. R.; POURHASSAN, M. Biological decolorization of dye solution containing Malachite green by microalgae *Cosmarium* sp. **Bioresourse Technology***,* Essex, v. 98, n. 6, p. 1176-1182, abr. 2007.

DANESHVAR, N.; SALARI, D.; KHATAEE, A. R. Photocatalytic degradation of azo dye acid red 14 in water: investigation of the effect of operational parameters. **Journal of Photochemistry and Photobiology A:** Chemistry, Lausanne, v. 157, p. 111-116, 2003.

DHANVE, R.S.; KALYANI, D.C.; PHUGARE, S.S.; JADHAV, J.P. Coordinate action of exiguobacterial oxidoreductive enzymes in biodegradation of reactive yellow 84A dye. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 20, n. 2, p. 245-255, abr. 2009.

DHANVE, R.S.; SHEDBALKAR, U.U.; JADHAV, J.P. Biodegradation of Diazo Reactive Dye Navy blue HE2R (Reactive blue 172) by an Isolated Exiguobacterium sp. RD3. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Heidelberg, v. 13, n. 1, p. 53-60, fev. 2008.

DYER, J.R. **Aplicações da Espectroscopia de Absorção aos Compostos Orgânicos**. São Paulo: Edgard Blucher, 1969. 155p.

EL-GEUNDI, M.S. Colour removal from textile effluents by adsorption techniques. **Water Research**, New York, v. 25, n. 3, p. 271-274, mar. 1991.

FABER, K. **Biotranformations in Organic Chemistry**. 3 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 402p.

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

FORATO, L.A.; FILHO, R.B.; COLNAGO, L.A. Estudos de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 146-150, 1998.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technology***,* Essex, v. 79, n. 3, p. 251-262, set. 2001.

GILLET, F.; ROISIN, C.; FLINIAUX, M. A.; JACQUIN-DUBREUIL, A.; BARBOTIN, J. N.; NAVA-SAUCEDO, J.E. Immobilization of *Nicotiana tabacum* plant cell suspensions within calcium alginate gel beads for the production of enhanced amounts of scopolin. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 2-4, p. 229-234, fev. 2000.

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

GUARANTINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes Têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n.1, p. 71-78, 2000.

GUO, J.; ZHOU, J.; WANG, D.; TIAN, C.; WANG, P.; UDDIN, M.S.; YU, H. Biocalalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobic reduction of azo dyes by the salt-tolerant bacteria. **Water Research**, New York, v. 41, n. 2, p. 426 - 432, jan. 2007.

GUP, R.; GIZIROGLU, E.; KIRKAN, B. Synthesis and spectroscopic properties of new azo-dyes and azo-metal complexes derived from barbituric acid and aminoquinoline. **Dyes and Pigments**, London, v. 73, n. 1, p. 40-46, 2007.

HYDE, F. W., HUNT, G. R., ERREDE, L.A. Immobilization of bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in poly (tetrafluoroethylene) membranes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 1, p. 219-222, jan. 1991.

IYIM, T.B.; ACAR, I.; ÖZGÜMÜS, S. Removal of Basic Dyes from Aqueous Solutions with Sulfonated Phenol–Formaldehyde Resin. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 109, n. 5, p. 2774-2780, may. 2008.

JADHAV, J.P.; PARSHETTI, G.K.; KALME, S.D.; GOVINDWAR, S.P. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 394-400, jun. 2007.

JAMAI, L.; SENDIDE, K.; ETTAYEBI, K.; ERRACHIDI, F.; HAMDOUNI-ALAMI, O.; TAHRI-JOUTI, M. A.; MCDERMOTT, T.; ETTAYEBI, M. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae.* **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 204, n. 2, p. 375-379, 2001.

JESUS, G.J. **Utilização de *Neurospora crassa* 74A para avaliação da biosorção e biodegradação dos corantes Ácidos, Xanteno, Direto e Reativo**. 2005. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas na área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

JIN, X.C.; LIU, G.Q.; XU, Z.H.; TAO, W.Y. Decolorization of a dye industry effluent by Aspergillus fumigatus XC6. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 1, p. 239-243, fev. 2007.

JUÁREZ-HERNÁNDEZ, J.; ZAVALA-SOTO, M.E.; BIBBINS-MARTÍNEZ, M.; DELGADO-MACUIL, R.; DÍAZ-GODINEZ, G.; ROJAS-LOPES, M. FTIR Spectroscopy Applied in Remazol Blue Dye Oxidation by Laccases. **AIP Conference Proceedings**, New York, v. 992, p. 1253-1257, 2008.

KALME, S. D.; PARSHETTI, G.K.; JADHAV, S.U.; GOVINDWAR, S.P. Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue-6 by Pseudomonas desmolyticum NCIM 2112. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 1405-1410, 2007.

KALME, S.; GHODAKE, G.; GOVINDWAR, S. Red HE7B degradation using desulfonation by Pseudomonas desmolyticum NCIM 2112. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 60, p. 327–333, 2007.

KAPOOR, J.S., VIRARAGHAVAN, T. Fungal Biosorption – an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 53, n. 3, p. 195-206, 1995.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 134-143, 2008.

KHALED, A.; NEMR, A.E.; EL-SIKAILY, A.; ABDELWAHAB, O. Treatment of artificial textile dye effluent containing Direct Yellow 12 by orange peel carbon. **Desalination**, Amsterdam, v. 238, n. 1-3, p. 210-232, mar. 2009.

KNAEBEL, D.B., STORMO, K.E., CRAWFORD, R.L. Immobilization of bacteria in macro and microparticles. **Methods in Biotechnology**, Totowa, v. 2, p. 67-78, 1997.

KRUCKEBERG, A.L.; WALSH, M.C.; DAM, K.V. How do yeast cells sense glucose? **BioEssays**, Cambridge, v. 20, n. 12, p. 972-976, 1998.

KONCAN, J.Z.; SOMEN, J. A simple test for monitoring biodegradable industrial pollution in a receiving stream. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 39, n. 10-11, p. 221–224, 1999.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova,** São Paulo, v. 25, n. 1, p. 78-82, jan./fev. 2002.

MICHAELS, G.B.; LEWIS, D.L. Sorption and toxicity of azo and triphenyl methane dyes to aquatic microbial populations. **Environmental Toxicology Chemical**, [S.l.], v. 4, p. 45-50, 1985.

MILAGRE, H.M.S.; MILAGRE, C.D.F.; MORAN, P.J.S.; SANTANA, M.H.A.; RODRIGUES, J.A.R. Reduction of ethyl benzoylformate mediated by *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in alginate fibers with double gel layers in a continuously operated reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 1, p. 121-125, jun. 2005.

MOU, D.G.; LIM, K.K.; SHEN, H.P. Microbial agents for decolorization of dye wastewater. **Biotechnology Advanced**, New York, v. 9, p. 613-622, 1991.

MOUTAOUAKKIL, A., ZEROUAL, Y., DZAYRI, F.Z., TALBI, M., LEE, K., BLAGHEN, M. Decolorization of Azo Dyes with Enterobacter agglomerans Immobilized in Different Supports by Using Fluidized Bed Bioreactor. **Current Microbiology**, New York, v. 48, n. 2, p. 124 – 129, fev. 2004.

NASREEN, Z.; BAJWA R.; KUSAR, T. Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. **Mycopath**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 49-52, 2007.

NAWAR, S.S.; DOMA, H.S. Removal of dyes from effluents using low cost agricutural by-products. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 271 - 279, 1989.

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

PAGGA, U.; BROWN, D. The degradation of dyestuff: part II- Behavior of dyestuffs aerobic biodegradation tests. **Chemosphere***,* Oxford, v. 15, n. 4, p. 479-491, 1986.

PARIKH, A., MADAMWAR, D. Textile dye decolorization using cyanobacteria. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, n. 5, p. 323 – 326, mar. 2005.

PARK, C.; LEE, B.; HAN, E.J.; LEE, J.; KIM, S. Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 3, p. 371 – 374, jul. 2006.

PARK, C.; LEE, M.; LEE, B.; KIM, S.W.; CHASE, H.A.; LEE, J.; KIM, S. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia troggi*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 36, p. 59 – 65, 2007.

PASSOS, C.T. **Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp.** 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2006.

PERALTA-ZAMORA, P.; TIBURTIUS, E.R.L; MORAES, S.G; DURÁN, N. Degradação Enzimática de Corantes Têxteis. **Química Têxtil**, São Paulo, v. 68, p. 32 - 38, 2002.

POLJANŠEK, I.; KRAJNC, M. Characterization of Phenol-Formaldehyde Prepolymer Resins by In Line FT-IR Spectroscopy. **Acta Chimica Slovenica**, Ljubljana, v. 52, p. 238 - 244, 2005.

POLMAN, J.K.; BRECKENRIDGE, C.R. Biomass-mediated binding and recovery of textile dyes from waste effluents. **Textile Chemist and Colorist**, Research Triangle Park, v. 28, n.4, p. 31-35, 1996.

POLUNIN, K.E.; SOKOLOVA, N.P; GORBUNOV, A.M.; BULGAKOVA, R.A.; POLUNINA, I.A. FTIR Spectroscopic Studies of Interactions of Stilbenes with Silicon Dioxide. **Protection of Metals**, New York, v. 44, n.4, p. 352 –357, jul. 2008.

PORRO, D.; BRAMBILLA, L.; RANZI, B. M.; MARTEGANI, E.; ALBERGHINA, L. Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisisae* cells for production of lactic acid. **Biotechnology Progress**, New York, v. 11, p. 294-298, 1995.

PREETHA, B.; VIRUTHAGIRI, T. Biosorption of zinc (II) by *Rhizopus arrhizus*: equilibrium and kinetic modeling. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 4, n. 6, p. 506 - 508, 2005.

RAMALHO, P.A.C.F. **Degradation of dyes with microorganisms – Studies with ascomycete yeasts**. 2005. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade do Minho, Braga, 2005.

RAMAKRISHNA, K.R.; VIRARAGHAVAN, T. Dye removal using low-cost adsorbents. **Water Science Technology**, London, v. 36, n. 2-3, p. 189-196, 1997.

RODRIGUES, J.A.R.; MORAN, P.J.S. Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 6, 2001.

SCHNEIDER, K.; HAFNER, C.; JAGER, I. Mutagenicity of textile dye products. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 24, p. 83-91, 2004.

SHARF, J.M. **Métodos Recomendados para o Exame de Alimentos.** São Paulo: Editora Polígono, p. 257, 1978.

SHARMA, S.P.; LAHIRI, S.C. Absorption spectroscopic and FTIR studies on EDA complexes between TNT (2,4,6-trinitrotoluene) with amines in DMSO and determination of the vertical electron affinity of TNT. **Spectrochimica Acta Part A,** v. 70, p. 144-153, 2008.

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

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

SOUZA, K.V.; COSTA, D.G. M.; ZAWADZKI, S.F.; ZAMORA, P.P. Degradação de corantes reativos por processos Fenton e Foto - Fenton utilizando Fe^{2+} suportado em Alginato. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, n. 29, 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2006.

STAMBUK, B.U. A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α-glucosidase. **Biochemical Education**, New York, v. 27, n. 3, p. 177-180, jul. 1999.

STEWART, J. D. Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 11, n. 4, p. 363-368, ago. 2000.

TANG, W.Z.; AN, H. Photocatalytic Degradation Kinetics and Mechanism of Acid Blue 40 by TiO,/UV in Aqueous Solution. **Chemosphere**, Oxford, v. 31, n. 9, p. 4171 - 4183, 1995.

TATARKO, M.; BUMPUS, J.A. Biodegradation of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Resource**, New York, v. 32, n.5, p. 1713-1717, 1998.

TELKE, A.A.; KALYANI, D.C.; DAWKAR, V.V.; GOVINDWAR, S.P. Influence of organic and inorganic compounds on oxidoreductive decolorization of sulfonated azo dye C.I. Reactive Orange 16. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 172, p. 298–309, 2009.

TRINDADE, R.C. **Adsorção dos azo-corantes Crisoidona CI 11.270 e Amaranto CI 16185 por células de leveduras do gênero *Rhodotorula*: Influência de alguns componentes celulares e temperatura**. 1986. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas na área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1986.

VECCHIO, A.; FINOLI, C.; SIMINE, D.D.; ANDREONI, V. Heavy metal biosorption by bacterial cells. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry,** Berlin, v. 361, n. 4, p. 338 - 342, jun. 1998.

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

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

WANG, L.; PAN, X.; WANG, F.; YANG, L.; LIU, L. Structure - properties relationships investigation on the azo dyes derived from benzene sulfonamide intermediates. **Dyes and Pigments**, London, v. 76, p. 636-645, 2008.

WANG, S.; ZHU, Z.H.; COOMES, A.; HAGHSERESHT, F.; LU, G.Q. The physical and surface chemical characteristics of activated carbons and the adsorption of methylene blue from wastewater. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 284, p. 440 – 446, 2005.

WELHAM, A. The theory of dyeing (and the secret life). **Journal Society Dyers Colour***,* [S.l.], v. 116, p. 140-143, 2000.

YESILADAL, S. K.; PEKIN, G. I.; BERMEK, H.; ARSLAN-ALATON, I.; ORHON, D.; TAMERLER, C. Bioremediation of textile azo dyes by Trichophyton rubrum LSK-27. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 1027 - 1031, 2006.

ZEROUAL, Y.; KIM, B.S.; KIM, C.S.; BLAGHEN, M.; LEE, K.M. A Comparative Study on Biosorption Characteristics of Certain Fungi for Bromophenol Blue Dye. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 134, p. 51-60, 2006.

ZHANG, S.J.; YANG, M.; YANG, Q.X.; ZHANG, Y.; XIN, B.P.; PAN, F. Biosorption of reactive dyes by the mycelium pellets of a new isolate of *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, p. 1479-1482, 2003.