

**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: MESTRADO EM TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**APLICAÇÃO DE *Aspergillus* sp. NA BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE
LÍQUIDO DE INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DO TABACO**

Joyce Cristina Gonçalves

Santa Cruz do Sul, 18 março de 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de Santa Cruz do Sul

Joyce Cristina Gonçalves

**APLICAÇÃO DE *Aspergillus* sp. NA BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE
LÍQUIDO DE INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DO TABACO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação - Mestrado em Tecnologia Ambiental, Área de concentração: Tecnologia Ambiental, Linha de Pesquisa: Tecnologias de Prevenção e Remediação da Poluição, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Dr. Valeriano Antonio Coberllini

Santa Cruz do Sul, 18 março de 2010

**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: MESTRADO EM TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**APLICAÇÃO DE *Aspergillus* sp. NA BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE
LÍQUIDO DE INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DO TABACO**

Joyce Cristina Gonçalves

COMISSAO DA BANCA:

**Dr. Valeriano Antonio Corbellini
Universidade de Santa Cruz do Sul- UNISC**

**Dra. Rosana de Cássia de Souza Scheneider
Universidade de Santa Cruz do Sul- UNISC**

**Dra. Patricia Valente da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS**

Santa Cruz do Sul, 18 de março de 2010

A meu noivo que sempre me incentivou e contribuiu das mais diversas formas neste trabalho e que graças a ele, encerro hoje, mais uma etapa em minha vida, e minha família por serem o que são, tornando mais fácil a minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Dr. Valeriano Antonio Corbellini pelo estímulo, paciência, dedicação e apoio;

À professora Dr. Rosana Schenieder que sempre se mostrou disposta e por sua paciência em todas as horas;

Aos demais professores que sempre foram incentivadores no desenvolvimento do conhecimento;

Aos amigos do laboratório de ensino, que sempre me ajudaram das mais diversas formas na execução deste trabalho;

À secretária Raquel Dioneia P. Schultz sempre atenciosa e prestativa;

Aos meus colegas de mestrado que andaram junto comigo nesta jornada, dividindo dúvidas e também resultados de pesquisa;

À Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

A capacidade de 22 amostras de *Aspergillus* sp. na bioissorção de pigmentos de efluente líquido de empresa processadora de tabaco local foi avaliada fazendo uso de estudos de crescimento micelial radial e de produção de biomassa. Para isto, foi utilizado caldo preparado de pó de fumo altamente concentrado para simular uma condição extrema de coloração do efluente. Uma correlação quantitativa indicativa da remoção de cor pode ser visualizada após contato da biomassa com o extrato de pó de fumo durante o período de fermentação e foi confirmada pelas técnicas de análise multivariada PCA (Análise por componentes principais) e HCA (Análise por agrupamento hierárquico). *A. niger* CMMI 02 apresentou a maior velocidade de crescimento micelial radical (CMR) ao mesmo tempo em que produziu a maior quantidade de biomassa em condição agitada, sendo esta a amostra selecionada para o ensaio de bioissorção. Após a produção de biomassa sob a agitação a 30°C, os *pellets* foram submetidos a esgotamento endógeno para serem inativados, secos e macerados. Para inativação foi utilizado calor úmido (autoclave e fervura) e uma solução de hipoclorito de sódio 10%. Diferentes concentrações de biomassa permaneceram em contato com efluente por 8 horas, apresentando a melhor taxa de bioissorção a inativação com hipoclorito de sódio em 16 mg mL⁻¹ de efluente. Um halo de coloração escura e outro de coloração mais clara foram visualizados externamente ao micélio durante o crescimento em placa e associados a reações de biodegradação de pigmentos do pó-de-fumo. O surgimento do halo de pigmentação se deu proporcionalmente ao crescimento do micélio. Diferenças químicas entre halo e meio de crescimento foram identificadas utilizando técnicas multivariadas como PCA e HCA. O estudo demonstrou o potencial de utilização de amostras de *Aspergillus* sp. para a biorremediação de efluentes de indústria processadora de tabaco.

Palavras-chave: Bioissorção, biorremediação, *Aspergillus* sp., tabaco, efluente líquido.

ABSTRACT

The capacity of 22 sample of *Aspergillus* sp. in bioremediation of pigments of liquid waste from local company processor of tobacco was assessed through studies of growth micelial radial and production of biomass. For this, it was used a broth prepared from tobacco dust highly concentrated to simulate an extreme condition of waste coloration. A quantitative relationship indicative of color removal could be observed after biomass contact with tobacco dust broth during fermentation and it was confirmed for multivariate analysis techniques PCA (*Principal Component Analysis*) and HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*). *A. niger* CMMI 02 presented the biggest velocity of radial mycelial growth (RMG) at the same time that produced a biggest biomass amount in the shaken condition. After biomass production in the shaken condition at 30°C, the pellets were submitted to endogen exhausting to be inactivated, dried and crunched. The biomass was inactive by humid heat (autoclave and boiling) and sodium hypochlorite 10%. Different biomass concentrations remained in contact with waste for 8 hours, showing the best biosorption the chemistry inactivation using 16 mg mL⁻¹. A halo of dark pigmentation and other halo clearer than medium was visualized during fungal growth on plate and these was associated to biodegradation reactions of tobacco dust pigments. The appearing of halo of pigmentation was proportional to micelial growth. Chemistry differences between halo and medium of growth were identified using multivariate techniques like PCA and HCA. This study showed the potencial use of *Aspergillus* sp. in the bioremediation of pigments of liquid waste from company processor of tobacco.

Key-words: Biosorption, bioremediation, *Aspergillus* sp., tobacco, liquid waste.

LISTA DE ABREVIATURAS

CG	Cromatografia a gás
CG-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>
CIB	Conselho de Informações sobre Biotecnologia
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i> – Análise por Agrupamento Hierárquico
MLR	<i>Multiple Linear Regression</i> – Regressão Linear Múltipla
SEPLAG	Secretaria de Planejamento e Gestão
SINDITABACO	Sindicato Nacional do fumo da Região Sul do Brasil
SIMCA	<i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i> – Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classes
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PC	Componentes Principais
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> – Análise por Componentes Principais
PCR	<i>Principal Component Regression</i> – Regressão por Componentes Principais
WCAS	<i>West Coast Analytical Service</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Fluxograma das etapas da metodologia desenvolvida na pesquisa.....	32
Figura 02 - Espectro de infravermelho para o caldo de pó-de-fumo (vermelho) e efluente (roxo).....	40
Figura 03 – Estrutura química do fitol	41
Figura 04 - Taxa de crescimento micelial radial de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. cultivadas em ágar Sabouraud com extrato de pó-de-fumo.....	41
Figura 05 – Curvas de crescimento micelial radial de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. cultivadas em ágar Sabouraud com extrato de pó-de-fumo.....	42
Figura 06 - Halo de pigmentação castanha (seta) observada em torno do micélio de algumas cepas de <i>Aspergillus</i> sp. quando cultivadas em ágar à base de extrato de pó-de-fumo.....	43
Figura 07 - Cromatogramas obtidos por eluição por cromatografia em camada delgada de caldos de cultura de amostras de <i>Aspergillus</i> sp. cultivadas em extrato de pó-de-fumo e reveladas por luz uv 365 nm. 1 – <i>A. terreus</i> USP 01, 2- <i>A.fumigatus</i> USP 174, 3- <i>Aspergillus</i> sp. 160, 4- <i>A. terreus</i> CMMI 233-3, 5- <i>A. fumigatus</i> USP 174, 6- <i>A. carneus</i> CMMI 01, 7 – <i>A. ochraceus</i> USP 169, 8- <i>A. ochraceus</i> USP 186. *: amostras com halo de pigmentação.....	45
Figura 08 - Desenvolvimento do halo de pigmentação em cepas de <i>Aspergillus</i> sp. cultivadas em ágar à base de extrato de pó-de-fumo.....	46
Figura 09 - Formação de halos de pigmentação e de descoloração e setores em cepas de <i>Aspergillus</i> sp. cultivadas em ágar à base de extrato de pó-de-fumo. À esquerda: <i>A. carneus</i> CMMI 01; à direita: <i>A. flavus</i> USP 279.....	47
Figura 10 - Indicação de halo consumido em <i>A. carneus</i> CMMI 01 contaminado com cepa fúngica filamentosa.....	48
Figura 11 - Gráfico de <i>scores</i> de PCA de espectros FTIR (4000 a 600 cm ⁻¹) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp.. Amostras em verde: halo de pigmentação; amostras em vermelho: halo de descoloração; amostras em laranja: halo consumido; amostras em roxo: meio intacto.....	48
Figura 12– Gráfico de <i>scores</i> de PCA de espectros FTIR (1700 a 1400 cm ⁻¹) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp.. Amostras em	

verde: halo de pigmentação; amostras em vermelho: halo de descoloração; amostras em laranja: halo consumido; amostras em roxo: meio intacto.....	49
Figura 13 - Dendrograma do halo de pigmentação, de descoloração (vermelho) e consumido (verde) e do meio de crescimento intacto (vermelho) obtido pela HCA para região 1700-1400 cm ⁻¹	51
Figura 14 - Variação do peso seco de biomassa de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. cultivadas em caldo de pó-de-fumo sob cultivo estático (superior) e sob agitação (inferior).....	53
Figura 15 - Cor residual do caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de algumas cepas de <i>Aspergillus</i> sp. (1) <i>A. niger</i> CMMI 03, (2) <i>A. niger</i> USP 9, (3) <i>A. niger</i> CMMI 02, (4) <i>A. niger</i> USP 898, (5) <i>A. niger</i> CMMI 01 e (6) caldo de pó-de-fumo sem inoculação.....	55
Figura 16 - Gráfico de scores de PCA de espectros FTIR (4000 a 600 cm ⁻¹) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp.. Amostras em verde: cepas cujos caldos apresentaram maior remoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.....	56
Figura 17 - Gráfico de amostras anômalas de espectros FTIR (4000 a 600 cm ⁻¹) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp.. Amostras em verde: cepas com maior remoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.....	57
Figura 18 - Espectros FTIR para as amostras de caldo de pó-de-fumo analisadas após 192 horas de cultivo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. e caldo sem inoculação (em vermelho).....	58
Figura 19 - Gráfico de scores de PCA de espectros FTIR (1700 a 1400 cm ⁻¹) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp.. Amostras em verde: cepas com maior remoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.....	59
Figura 20 - Gráfico de amostras anômalas de espectros FTIR (1700 a 1400 cm ⁻¹) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp.. Amostras em verde: cepas com maior remoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.....	60
Figura 21 - Gráfico de scores de PCA espectros FTIR (4000 a 600 cm ⁻¹) de biomassa de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. após 192 horas de cultivo de cepas de	

<i>Aspergillus</i> sp.. Amostras em verde: cepas com maior emoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.....	61
Figura 22 - Espectros de FTIR para as amostras de biomassa de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. após 192 horas de cultivo com o caldo de pó-de-fumo.....	62
Figura 23 - Gráfico de scores de PCA de espectros FTIR (1800 a 1500 cm ⁻¹) de biomassa de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. após 192 horas de cultivo em caldo à base de extrato de pó-de-fumo. Amostras em verde: cepas com maior remoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.....	63
Figura 24 - Gráfico de amostras anômalas de espectros FTIR (1800 a 1500 cm ⁻¹) de biomassa de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. após 192 horas de cultivo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp.. Amostras em verde: cepas com maior emoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.....	64
Figura 25 - Dendrograma de espectros FTIR (1700 a 1400 cm ⁻¹) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp.. Amostras em verde: cepas com maior remoção qualitativa de cor. Amostras em vermelho: demais cepas.....	65
Figura 26 - Dendrograma de espectros FTIR (1800-1500 cm ⁻¹) de biomassa de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. utilizadas para biossorção de pigmentos de caldo de pó-de-fumo. Amostras em verde: cepas com maior remoção qualitativa de cor. Amostras em vermelho: demais cepas.....	66
Figura 27 - Absorbância residual de pigmentos de extrato de pó-de-fumo após 8 h de contato com biomassa de <i>Aspergillus niger</i> CMMI 02 inativada por autoclavagem, fervura e hipoclorito de sódio avaliada em 355 nm.....	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Produção de tabaco	17
3.2 Indústria do fumo	18
3.3 Biorremediação de poluentes	18
3.3.1 <i>Aspergillus sp.</i>	20
3.4 Estatística multivariada no tratamento de dados: análise multivariada	25
3.4.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	27
4. MÉTODOS	32
4.1 Delineamento experimental	32
4.2 Amostragem	33
4.3 Biossorção de efluente	33
4.3.1 Análise de efluente e caldo..	33
4.3.2 Seleção de cepa de <i>Aspergillus sp.</i>	34
4.3.3 Halo de pigmentação e halo de descoloração	35
4.3.4 Ensaio da produção de biomassa	35
4.3.5 Ensaio de biossorção	36
4.4. Descarte de resíduos	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Análise de efluente de caldo	39
5.2 Seleção de cepas <i>Aspergillus sp.</i>	41
5.3 Halo de pigmentação	44
5.4 Ensaio e otimização da produção de biomassa	52
5.5 Ensaio de adsorção de pigmentos do extrato de pó-de-fumo.....	67
6. CONCLUSÕES	70

7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS.....	79

1. INTRODUÇÃO

O comprometimento ambiental dos meios atmosféricos, aquáticos e terrestres são reflexos do grande e intenso desenvolvimento da humanidade nas mais diversas áreas. O avanço industrial e urbano associado ao aumento da produção de bens de consumo foi responsável pela geração de uma grande carga poluidora, descartada por muito tempo no ambiente, ocasionando danos irreversíveis ou de difícil recuperação (MEURER, 2004).

Em virtude das quantidades e de certas características das substâncias poluidoras, como persistência e toxicidade, a poluição ambiental representa um perigo para a saúde humana, de animais e de plantas, além de comprometer a habilidade ambiental para sustentação da vida. Os meios aquáticos recebem altas quantidades de resíduos domésticos e rejeitos industriais, que comprometem a qualidade ambiental de fauna e flora, estando ligados diretamente às necessidades e à saúde humana.

A aplicação maciça de substâncias prejudiciais ao ambiente ao longo dos anos, juntamente com o descaso com a destinação final de resíduos poluentes, ocasionou situações críticas de agressão ambiental, como as verificadas pelas indústrias Ajax e Shell Química do Brasil no estado de São Paulo (GREENPEACE, 2009).

A utilização de organismos vivos para remover ou reduzir poluentes no ambiente tem sido muito pesquisada e recomendada como meio ecologicamente mais adequado para o tratamento de áreas contaminadas, indicada para águas superficiais, subterrâneas, solos, resíduos e efluentes industriais e também aterros (GAYLARDE et al, 2005). Neste sentido, o emprego de microrganismos tem se destacado por ser uma tendência em expansão na biotecnologia ambiental (IWAMOTO; NASU, 2001).

A biorremediação pode ser aplicada *in situ* ou *ex situ*, incluindo-se as técnicas de *land farming*, compostagem, biorreatores, bioventilação, biofiltros, bioampliação, bioestimulação e bombeamento e tratamento. Esta tecnologia ambiental se oferece como um novo e inovador meio de remediação de resíduos que pode também ser acoplada a métodos físico-químicos de tratamento (BOOPATHY, 2000).

O processo de biorremediação oferece várias vantagens sobre a tecnologia de tratamento convencional físico-químico, principalmente por ser freqüentemente menos dispendioso, efetivo e ambientalmente seguro (BOOPATHY, 2000). Entretanto pode ser limitado devido à falta de conhecimentos dos processos biodegradativos envolvidos que limitam a avaliação dos impactos sobre os ecossistemas (IWAMOTO; NASU, 2001).

Segundo Evans e Furlong (2003), os microrganismos apresentam capacidade de degradar as substâncias mais perigosas e recalcitrantes presentes no ambiente graças a mecanismos naturais de degradação existentes. Esta aplicação estende-se aos resíduos sólidos e líquidos, além de sua aplicabilidade em técnicas de remediação de meios contaminados pelos mais diversos poluentes (HOGG, 2005).

Em virtude de sua elevada tolerância a concentrações poluentes em comparação as bactérias, os fungos vêm sendo investigados desde meados de 1980 em termos da sua capacidade de remediação (GADD et al, 2005) e muitos estudos são conduzidos na intenção de demonstrar o potencial dos fungos em aplicações de biorremediação, em particular do gênero *Aspergillus*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o potencial de aplicação de *Aspergillus* sp. Para a biorremediação de efluentes líquidos da indústria do processamento do tabaco .

2.2 Objetivos específicos

1. Selecionar cepas de *Aspergillus* sp. para crescimento e utilização de nutrientes de efluente de processamento do tabaco, em particular para a biossorção de componentes responsáveis pela coloração do efluente.
2. Otimizar a produção de biomassa de cepa selecionada para estudos de adsorção (produção de biossorvente) no que se refere a variáveis de processo (fermentação submersa ou em superfície) e técnicas de inativação da biomassa.
3. Avaliar as condições para otimizar a descoloração de efluente de processamento de tabaco com biomassa de *Aspergillus* sp. (proporção biomassa, efluente e tempo de contato) visando seu uso em rotina pela empresa processadora de tabaco (estação de tratamento de efluentes).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Produção de tabaco

A produção de tabaco é uma das atividades agroindustriais de maior importância econômica e social na região Sul do Brasil. A significativa participação do setor fumageiro no mercado internacional está relacionada à evolução tecnológica da indústria brasileira do fumo, que ocupa desde 1993 a posição de maior exportador mundial do produto, além de ser referência na industrialização do mesmo (SINDITABACO, 2009).

O Brasil ocupa a segunda posição mundial na produção de fumo em folha, representando em 2006 13,5% da produção mundial, ao mesmo tempo em que é o atual líder na exportação mundial (SEPLAG, 2009). São destinados ao mercado internacional 85% do total produzido, representando 1,4% do total de vendas externas do país (SINDITABACO, 2009).

O crescimento da fumicultura no Brasil se deu a partir dos anos 90, o que incentivou significativos investimentos das empresas do setor na ampliação e modernização de suas unidades de beneficiamento e industrialização do produto. A região Sul concentra mais de 96% da produção brasileira, estando presente em 682 municípios (147 no Paraná, 236 em Santa Catarina e 299 no Rio Grande do Sul) (BIOLCHI, 2005).

No Rio Grande do Sul, os municípios de Santa Cruz do Sul e Venâncio Aires concentram o maior número de unidades industriais, constituindo o maior complexo de processamento de fumo do mundo (SINDITABACO, 2009). Em termos de produção, o estado concentra cerca de 52% de toda a produção nacional, sendo a cultura típica de pequena propriedade. A maior produção está localizada no entorno das indústrias de transformação e beneficiamento, tais como a região do Vale do Rio Pardo, que é a maior produtora do estado com 39,2% da produção gaúcha (SEPLAG, 2009).

3.2 Processamento industrial do tabaco

Somado ao meio terrestre, ambientes aquáticos sofrem constantemente agressões relacionadas às atividades rurais sob a forma residual de agroquímicos e também pela emissão de efluentes e demais resíduos, resultado das atividades industriais, intensificadas pelo cenário moderno de bens e serviços. Os recursos hídricos são muito valorados principalmente pela agricultura e indústria, representando 70 a 80% e cerca de 10% da demanda, respectivamente (MORAES; JORDÃO, 2002).

Segundo Neto e Ferreira (2007), a qualidade da água é bastante dinâmica e dependente das condições ambientais as quais o corpo hídrico está exposto. Isto está relacionado aos diversos tipos de condicionantes potenciais, naturais ou antrópicos, e sua disponibilidade ao longo do tempo. A presença de contaminantes e/ou alteradores das condições naturais nos recursos hídricos se deve, principalmente, às atividades agrícolas e industriais, citando-se como exemplos os pesticidas e outros materiais de caráter poluidor.

Segundo Souza Cruz (2009), o processamento industrial do tabaco envolve a passagem do produto por cilindros onde são adicionados água e vapor. A etapa seguinte é a separação mecânica da lâmina e do talo realizada pelos separadores e debulhadores. A água adicionada é descartada, sendo enviada à estação de tratamento. A água saturada possui coloração marrom escura devido aos constituintes do talo que são extraídos durante o processo (SOUZA CRUZ, 2009).

3.3 Biorremediação de poluentes

As indústrias, de um modo geral, necessitam de grandes volumes de água em seus processos, da mesma forma de substâncias químicas, principalmente de

natureza orgânica. Estes materiais descartados na forma de efluentes apresentam diferenças em sua composição química, peso molecular e toxicidade e, portanto, necessitam de tratamento para amenizar os efeitos sobre o ambiente (AKSU, 2005). Os avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de métodos capazes de promover o tratamento e condicionamento dos resíduos líquidos a normas estabelecidas pela legislação ambiental.

Segundo Aksu (2005), estudos empregando microrganismos visando a biodegradação e bioacumulação são recentes. A atividade microbiana destaca-se como importante fator na eliminação de produtos químicos do ambiente. Devido a sua capacidade de degradar compostos como lignina, celulose, além de xenobióticos, os fungos têm sido amplamente empregados em processos biológicos na remoção de compostos de difícil degradação. Segundo Gadd (2001), espécies fúngicas são bastante empregadas na remoção de compostos resistentes à degradação devido a seus sistemas enzimáticos especializados, tais como ligninase, manganês peroxidase, lacases, peroxidases, entre outras.

Os fungos exigem para seu desenvolvimento, preferencialmente, carboidratos simples como a glicose. Entretanto, outras fontes podem ser utilizadas como sacarose, maltose e até mesmo, fontes mais complexas como amido e celulose. Além disso, são necessárias fontes nitrogenadas inorgânicas ou orgânicas, na forma de sais de amônio ou nitratos e peptonas e sais minerais como sulfatos e fosfatos, oligoelementos e fatores de crescimento, como vitaminas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A importância dos fungos no ambiente, considerando a decomposição e transformação de substratos orgânicos e inorgânicos e o ciclo resultante de elementos está relacionada a sua relevância no tratamento de resíduos e seu modo de crescimento filamentosos o que permite a colonização e a exploração de solos contaminados e outros substratos. Além disso, os fungos geralmente são mais tolerantes a altas concentrações poluentes do que as bactérias (GADD, 2001).

Em termos de condições ambientais, a faixa ótima para seu desenvolvimento é de 25 a 30°C com limites, inferior e superior, variando de 10 a 40°C. Contudo algumas espécies termofílicas e termotolerantes podem se desenvolver acima dos 40°C. Os fungos em geral, toleram larga variação na concentração de íons

hidrogênio com faixa de pH variando de 4 a 7 (ALEXOPOULOS et al, 1996), mas com valor de pH ótimo de 5,6, sendo que os fungos filamentosos podem tolerar uma faixa de pH mais ampla: 1,5 a 11 (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

3.3.1 *Aspergillus* sp.

Muitos microrganismos já se mostraram eficientes em processos de biorremediação tais como *Verticillium* sp. (FANG et al, 2007), *Streptomyces* sp. (BENIMELI et al, 2008), *Bjerkandera adusta* (QUINTERO et al, 2007), *Trametes versicolor* (BLANQUEZ et al, 2004), *Phanerochaete sordida* (YANG et al 2004), *Irpex lacteus* (TAVCAR et al., 2006) e outros fungos ligninolíticos, *Candida catenulata* (JOO et al, 2008), além de *Aspergillus* sp..

Geograficamente, o gênero *Aspergillus* pode ser encontrado em todo o mundo, sendo observado em uma grande variedade de *habitats* devido a sua capacidade de colonização em inúmeros substratos, como detritos, alimentos, tecidos, penas, couro e estrume. Devido a esta grande possibilidade de utilização de substratos, as espécies de *Aspergillus* têm sido associadas à biodegradação de diversas substâncias, tais como querosene, pesticidas, papel, plastificante e borracha (FLICKINGER; DREW, 1999) e em processos de remediação, tais como a bioissorção.

Aspergillus fumigatus foi empregado como material bioissorvente em indústrias nucleares em estudos conduzidos por Bhainsa e D`Souza (2009). Eles demonstraram que biomassa deste fungo foi capaz de acumular o elemento tório, sendo o estudo conduzido em diferentes condições de pH, concentração do elemento, dose de biomassa e tempo de contato. A máxima absorção foi verificada em 2 horas de contato e pH 4, devido à predominância de espécies hidrolisadas como $\text{Th}(\text{OH})_2^{2+}$ e $\text{Th}(\text{OH})_6^{3+}$, mais facilmente bioisorvidas que a forma Th^{4+} que apresenta baixa afinidade pela biomassa. Posteriormente, na recuperação do elemento tório, bicarbonato de sódio foi empregado permanecendo a superfície da biomassa intacta.

Mathialagan e Viraraghavan (2009) conduziram estudos de bioadsorção do pesticida pentaclorofenol (PCP) de solução aquosa através de biomassa fúngica de *A. niger* tratada com brometo de cetiltrimetilamônio e obtiveram resultados positivos no experimento. O PCP foi rapidamente removido, com taxas de bioadsorção associadas à temperatura e pH devido à remoção da barreira eletrostática existente entre a biomassa e PCP, o que facilitou a bioadsorção. Quase todo o PCP se ligou irreversivelmente à biomassa e a adição de sais inorgânicos permitiu uma maior eficiência no processo de adsorção.

A. niger se mostrou eficiente na extração de metais pesados (Cu, Cd, Pb e Zn). As taxas de extração foram de 97,5%, 88,2%, 26% e 14,5% após o processo em duas etapas e de 56%, 100%, 30% e 19% para o processo em uma etapa para o Cu, Cd, Pb e Zn, respectivamente. As baixas remoções de Pb e Zn foram associadas a sua permanência no solo, onde estavam mais estáveis e não biodisponíveis. Estes dados demonstraram melhores resultados e menores custos da extração biológica em comparação à extração química (REN et al, 2009).

O cobre foi objeto de estudo de bioadsorção realizado por Mukhopadhyay et al. (2008) que estudaram a capacidade de *A. niger* no processo de bioadsorção em coluna, sob variação da dosagem de biomassa e da velocidade de escoamento. A concentração inicial da solução contendo o cobre foi de 10 mg L⁻¹. A taxa absorvida foi de 13,4 ± 0,60 mg g⁻¹ de biomassa e a coluna foi eluída usando ácido clorídrico em 5 ciclos de sorção – desorção. Este estudo demonstrou que o reator em coluna teve uma maior capacidade de sorção em comparação com reator em batelada quando se utiliza a mesma concentração de íon metálico inicial. Este aumento da capacidade de sorção da coluna foi relacionado ao aumento na disponibilidade de sítios de ligação para adsorção.

Amini et al. (2008) também demonstraram a capacidade de *A. niger* na bioadsorção de metais, neste caso o chumbo. A máxima capacidade de bioadsorção da biomassa tratada com hidróxido de sódio foi atingida na faixa de pH 3,44, concentração inicial do metal em 19,28 mg L⁻¹ e dose de biomassa 3,74 g L⁻¹. Cerca de 97% do metal presente em solução foi removido quando as condições anteriores foram respeitadas. A biomassa tratada com hidróxido de sódio apresenta microcavidades em sua estrutura que melhoram a capacidade de bioadsorção,

influenciando neste processo de sorção a dosagem de biomassa e a concentração inicial do metal.

Akar e Tunali (2006) estudaram a biossorção do chumbo e do cobre por meio do emprego de biomassa de *A. flavus*. A biomassa foi inativada por meio de calor sendo a máxima taxa de biossorção atingida em $13,46 \pm 0,99$ mg/g de Pb (II) e $10,82 \pm 1,46$ mg/g de Cu (II) em pH 5 e tempo de contato de 2 horas. Baixos valores de pH influenciam negativamente na biossorção devido à competição dos íons H^+ e íons metálicos pelos sítios de ligação da biomassa. No entanto, quando o ajuste de pH foi maior que 5,5, houve precipitação dos íons metálicos. Assim, o pH inicial foi conduzido para valores menores que 5,5. Ao mesmo tempo o aumento da taxa de metal/biomassa causa decréscimo na eficiência de biossorção devido à competição pelos sítios de ligação disponíveis.

Kapoor et al. (1999) demonstraram que a biomassa de *A. niger* foi capaz de biossorver íons metálicos em efluentes, utilizando hidróxido de sódio para tratamento da biomassa e pH 4. Valores de pH inferiores inibiram a remoção de íons metálicos devido ao aumento de íons H^+ . Para a biossorção de chumbo e cádmio, 5 horas de contato foram necessárias, enquanto para o cobre e níquel, 6 e 8 horas, respectivamente. Em estudos anteriores, Kapoor e Viraraghavan (1997) também demonstraram a capacidade de *A. niger* na biossorção de chumbo, cádmio e cobre presente em soluções aquosas.

O efeito dos tratamentos da biomassa sobre o processo de biossorção foram estudados por Kapoor e Viraraghavan (1998). O tratamento da biomassa de *A. niger* com hidróxido de sódio, formaldeído, dimetilsulfóxido e detergente aumentou a biossorção de chumbo, cádmio e cobre, mas reduziu a biossorção de níquel quando comparada a células viáveis. Isto se deu devido à remoção de impurezas e exposição de sítios de ligação disponíveis para a biossorção pelos íons metálicos.

Biomassas de *Aspergillus* sp. se mostraram eficientes na remoção de corantes de indústrias têxteis. O corante Synazol (solução 0,22% vermelho HF6BN e 0,1% amarelo HF2GR) foi melhor biossorvido por meio de biomassa de *A. niger* tratada com calor do que com radiação gama, e apresentou taxas de 88% de remoção em pH 3, temperatura de $30^{\circ}C$ e $8 g L^{-1}$ de dose de biomassa em 18 horas de contato. Este resultado foi associado ao rompimento da estrutura e exposição de sítios de

ligação disponíveis na biomassa, causados pelo aumento da área de superfície (KHALAF, 2008).

Da mesma forma *A. niger* foi estudado para a remoção de corante aniônico Vermelho Congo. A biomassa foi submetida a diversos tipos de tratamento: ácido, básico e tratamento por sais. O melhor resultado foi obtido pelo tratamento com bicarbonato de sódio, associado ao íon bicarbonato fornecer ou aceitar prótons na água, já que os prótons podem neutralizar cargas negativas na superfície da biomassa. A máxima biossorção foi avaliada em 14, 72 mg g⁻¹, pH 6 com equilíbrio atingido em 42 horas de contato (Fu; Viraraghavan, 2002).

Rao e Viraraghavan (2002) testaram a capacidade de biossorção de *A. niger* em efluentes contendo fenol. Eles fizeram uso de cinco diferentes tratamentos para biomassa: autoclavagem, ácidos nítrico e sulfúrico, hidróxido de sódio e solução detergente. O tratamento com ácido sulfúrico se mostrou mais eficiente e relacionado à diferença de íons H⁺ que contribuem em mesma molaridade durante o tratamento, quando comparado ao ácido nítrico. A melhor condição foi atingida em pH 5,1 na biossorção em coluna de fenol presente em solução aquosa contendo 1000 µg L⁻¹.

Processos biodegradativos também puderam ser observados através de estudos conduzidos por meio de amostras *Aspergillus* sp. A detoxificação microbiana de metalaxil em sistemas aquáticos foi estudada por Massoud et al (2008), onde *A. niger* além de amostras bacterianas como *Pseudomonas* sp. foram isoladas e submetidas a avaliações da capacidade de crescimento em meio contendo metalaxil. Após 28 dias, confirmou-se a remoção completa de metalaxil e nenhuma presença de metalaxil ou de seus metabólitos. A faixa ideal de pH e temperatura no processo de degradação foi 7 e 30°C, respectivamente.

Silva et al. (2009) também estudaram possibilidades de biodegradação por fungos. Um solo fúngico foi estudado em termos de capacidade degradativa de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) pela avaliação da produção de enzimas lignolíticas em condições microaeróbias. *Aspergillus* sp. degradaram mais extensivamente PAH de baixo peso molecular enquanto que PAHs de alto peso molecular foram mais degradados por *Trichocladium canadense* seguido por

Aspergillus sp. O estudo demonstrou a capacidade de fungos na utilização de PAH como fonte de carbono, determinando o seu potencial em remediar solos contaminados.

Goswami et al. (2009) mostraram a capacidade de amostras de *Aspergillus sydoni* na biodegradação do pesticida endossulfan através do seu isolamento do solo e crescimento em meio Czapek-Dox. A máxima capacidade de degradação foi demonstrada pelas amostras de *A. sydoni* que foram capazes de biodegradar 95 % do α endossulfan e 97% do β endossulfan em 18 dias de incubação. Quando sacarose foi adicionada, houve uma repressão na biodegradação do pesticida indicando a preferência pela fonte de carbono fornecida pela sacarose.

Outro organofosforado utilizado em ensaios de biodegradação por Bhalerao e Puranik (2009) foi o monocrotofós. Para isto, amostras de solos de diferentes regiões foram usadas para o isolamento de fungos. Destes, 25 linhagens foram isoladas pelo enriquecimento com monocrotofós. A habilidade de mineralização associada ao *Aspergillus oryzae* foi medida pela liberação de CO₂ e investigada em diferentes condições de cultura, e foi demonstrado que ele pode ser empregado no tratamento de águas e na bioampliação de solos contaminados pelo monocrotofós.

Colla et al. (2008) isolaram e selecionaram amostras pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* de solo contaminados com atrazina e simazina capazes de atuar na biodegradação de herbicidas triazínicos. A capacidade de crescimento em meio com atrazina foi relacionado à velocidade de crescimento radial micelial. Dos 15 isolados, as maiores velocidades de crescimento foram de *Aspergillus* sp. a partir de solo contaminado com atrazina e *Penicillium* sp. a partir de solo contaminado por atrazina mais simazina.

Além de pesticidas e metais pesados, *Aspergillus* sp. se mostraram eficientes na biodegradação de corantes. Parshetti et al. (2007) estudaram biodegradação de corante reativo azul-25 por *Aspergillus ochraceus*. Resultados de espectroscopia e exame visual mostraram que a descoloração resultou de adsorção com posterior degradação. Esta absorção pode ser associada à presença de nitrogênio inorgânico, como íons amônio, enquanto que a biodegradação está associada a enzimas oxidativas como lignina peroxidase, lacase e tirosinase. A descoloração se mostrou

mais eficiente em condição agitada e a adição de glicose reduziu o tempo de descoloração. A amostra fúngica foi capaz de tolerar e degradar o corante na concentração $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de água destilada.

3.4 Estatística multivariada no tratamento de dados: análise multivariada

Muitas variáveis precisam ser avaliadas para a extração de informações após a realização de um experimento químico. A estatística multivariada é freqüentemente utilizada no tratamento de dados analíticos a fim de explorar os dados e verificar similaridades entre amostras, que correspondem a semelhanças de composição química (CORREIA; FERREIRA, 2007).

A estatística multivariada viabiliza a obtenção de mais informações se comparada com procedimentos univariados usualmente adotados (CORREIA; FERREIRA, 2007). De acordo com Parreira (2003), os métodos quimiométricos podem ser aplicados em dados multivariados para análise exploratória e reconhecimento de padrões, caracterizando-se por propósitos qualitativos ou então quantitativos, para calibração.

Com o passar dos anos, muitas foram as ferramentas desenvolvidas para a análise multivariada. Entre elas estão os métodos de análise exploratória de dados tais como Análise por Componentes Principal (PCA) e Agrupamento Hierárquico (HCA), métodos de previsão tais como a Regressão Linear Múltipla (MLR), a Regressão por Componente Principal (PCR) e Mínimos Quadrados Parciais (PLS), e métodos de reconhecimento de padrões tais como Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classes (SIMCA) (FERREIRA, 2002). Estas ferramentas têm possibilitado o processamento de uma grande quantidade de dados e despertado o interesse em aplicações diversas tais como no controle de qualidade de produtos e nos mais diversos processos industriais (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Segundo Correia e Ferreira (2007), alguns algoritmos foram criados para elaboração de gráficos que representem a maior quantidade de informações contidas em um determinado conjunto de dados analíticos. Entre eles se destacam a

HCA e PCA, que permitem uma melhor compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou a ausência de agrupamentos naturais entre as amostras.

A HCA é uma técnica aglomerativa não supervisionada que examina as distâncias inter-pontuais entre todas as amostras do conjunto de dados e representa essa informação na forma de um gráfico bidimensional chamado dendrograma (PARREIRA, 2003). Os dendrogramas são úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos no espaço com dimensão maior que três, onde a representação de gráficos convencionais não é possível. No eixo horizontal são colocadas as amostras e no vertical, o índice de similaridade numa escala que vai de um a zero (nenhuma similaridade) (NETO; MOITA, 1998).

A utilização da PCA está associada à redução da dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível. Essa redução permite o estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, chamadas de componentes principais (PC). As PC são combinações lineares das variáveis originais e os gráficos obtidos representam as amostras em um sistema cartesiano onde os eixos são as PC (CORREIA; FERREIRA, 2007).

De acordo com Parreira (2003), este novo conjunto de eixos de coordenadas é muito mais informativo e, pelo fato de serem ordenados pela sua importância, é possível visualizar estas mesmas amostras num gráfico de baixa dimensionalidade. Esta projeção em uma base ortogonal pode ser feita, entre outros métodos, por meio da decomposição por valores singulares (*Singular Value Decomposition*).

De acordo com Neto e Moita (1998), a PCA pode ainda ser usada para julgar as importâncias das próprias variáveis originais escolhidas, isto é, as variáveis originais de maior peso (*loadings*) na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico. Ainda, segundo Brereton (2003), a PCA é provavelmente a técnica quimiométrica mais distribuída e, devido à importância de medidas multivariadas em química, ela é considerada a técnica que mudou significativamente a visão química de análise de dados.

Assim, HCA e PCA se apresentam como ferramentas valiosas na interpretação multivariada de conjuntos de dados grandes e complexos permitindo, através de gráficos bi e tridimensionais, a expressão de inter-relações que podem existir entre variáveis. Pacotes computacionais de estatística podem fazer todas as operações

necessárias à obtenção de componentes principais e agrupamento hierárquico, inclusive o tratamento prévio de padronização e escalonamento de dados, tais como o Pirouette, SPSS e Systat (NETO; MOITA, 1998).

3.4.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Muitos sistemas automáticos de determinação microbiológica estão se tornando disponíveis e o uso da espectrometria no infravermelho (IR) para estes fins, já vem sendo reportado nos anos 50 e 60, mas somente com o desenvolvimento de modernos interferômetros em espectrometria no infravermelho, mini-computadores e novos algoritmos mais potentes para análise estatística multivariada e metodologias de reconhecimento de padrão, a técnica voltou a ser aplicada (MAQUELIN, 2002).

O espectro de infravermelho de células microbianas é altamente específico sendo utilizado para diferenciação, classificação e identificação de diversas espécies de microrganismos. O espectro microbiano é também útil para detectar compostos intracelulares *in situ* ou estruturas tal como endósporos, monitorar e quantificar metabolicamente a liberação de CO₂ em resposta a diferentes substratos e caracterizar o crescimento dependente e a interação célula-fármaco.

As informações úteis à caracterização microbiana geralmente se distribuem sobre toda região do IR de espectro eletromagnético: infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR) e distante (FIR) (NAUMANN, 2000), sendo o infravermelho próximo e médio os mais considerados em vários estudos de sistemas microbianos (MAZAREVICA et al, 2004).

A maior vantagem da espectroscopia IR, de acordo com Naumann (2000), é que quase qualquer tipo de material poder ser analisado por esta técnica e que este método não está limitado ao estado físico da amostra. A amostra pode estar na forma de solução, líquido viscoso, suspensão, sólido não homogêneo, ou pó. Além disso, não existem restrições para registrar o espectro IR de uma amostra trazida em condições físico-químicas diferentes em relação à temperatura, pressão, estado

de dispersão, pH e outros.

O espectrofotômetro de dispersão é um modelo antigo usado para obtenção de espectros no infravermelho e foi gradativamente substituído pelo espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A forma de funcionamento deste equipamento é totalmente diferente de um equipamento de dispersão, sendo denominado de método interferométrico (BARBOSA, 2007).

O método interferométrico apresenta vantagens em relação ao método dispersivo, em especial a sua maior sensibilidade ou maior razão sinal/ruído, além da obtenção de espectros em menores tempos, maiores resoluções e com amostras em quantidades menores e a maior precisão nas medidas de números de ondas (BARBOSA, 2007).

Segundo Alcantara Jr. (2002), a espectroscopia FTIR é uma técnica importante nos estudos de sistemas moleculares complexos e representa uma alternativa aos métodos tradicionais de análise de espectros moleculares na faixa do infravermelho. A técnica é não destrutiva e está baseada na espectroscopia vibracional. Com um mínimo de amostra em mãos, este sistema permite medidas consecutivas de uma série de amostras microbianas (MAQUELIN, 2002).

A espectroscopia FTIR é uma potente ferramenta para a identificação de tipos de ligações químicas em uma molécula, produzindo um espectro no infravermelho de absorção molecular como uma impressão digital (*fingerprint*). Esta técnica pode ser aplicada para quantificação de componentes de misturas desconhecidas, no estado sólido, líquido ou gasoso que devem ser colocadas em células, cuja janela apresente transferência na região de trabalho do infravermelho, tais como KBr, NaCl, CsI, KCl CaF₂ (BARBOSA, 2007).

Compostos orgânicos possuem espectros detalhados enquanto compostos inorgânicos são geralmente muito mais simples. Para a maioria dos materiais comuns, o espectro de compostos desconhecidos podem ser identificados por comparação com uma biblioteca de compostos conhecidos. Para a identificação de materiais menos comuns, a espectroscopia FTIR precisa ser combinada com a ressonância magnética nuclear, a espectrometria de massa, a espectroscopia de emissão, a difração de raios X, e/ou outras técnicas (WCAS, 2009).

Segundo Perez e Meyer (2009), a espectroscopia FTIR utiliza como

componente óptico básico um interferômetro de *Michelson*, onde todas as frequências ópticas da fonte são observadas simultaneamente em um período de tempo conhecido como tempo de varredura (*scan time*). O aparelho mede a intensidade de um feixe de radiação infravermelha, codificado especialmente depois de ter atravessado uma amostra. O sinal resultante, que é um sinal de domínio digital, é chamado um interferograma e contém informações de intensidade sobre todas as frequências presentes no feixe. Esta informação pode ser extraída por comutação do domínio de tempo de sinal digital para um domínio de frequência de sinal digital, que é realizado mediante a aplicação de uma transformada de Fourier sobre o interferograma, produzindo o que é chamado espectro de feixe simples (*Single Beam Spectrum*). Outra característica deste sinal é que ele é estatisticamente estacionário, assim quanto maior o número de digitalizações de que este sinal é composto, melhor será a estimativa que pode ser extraído a partir dos dados (PEREZ; MEYER, 2009).

Para obtenção de um espectro no infravermelho através do método interferométrico, primeiramente se faz o *background* e obtém-se um interferograma sem a amostra. Em seguida a amostra é colocada entre o interferômetro e o detector que absorverá preferencialmente alguns comprimentos de onda, reduzindo assim, as intensidades destes. Posteriormente, utiliza-se um procedimento matemático de transformada de Fourier para transformar os interferogramas em espectros de domínio de frequência. A subtração destes dois espectros fornece o espectro de absorção da amostra (BARBOSA, 2007).

Quase todas as moléculas absorvem a luz infravermelha, e cada tipo de molécula apenas absorve a luz infravermelha em determinadas frequências, gerando características únicas para cada molécula. Isto fornece um caminho para identificar tipos de moléculas, por análise qualitativa, e a quantidade presente na amostra, por análise quantitativa .

A aplicação da espectroscopia FTIR junto com técnicas quimiométricas de análise multivariada possibilitou a análise de misturas complexas, sem a necessidade de qualquer separação prévia de seus componentes, segundo estudos conduzidos por Sabin et al. 2003, mostrando-se uma potente técnica para o estudo de macromoléculas e sistemas biológicos complexos tais como tecidos e células.

Atualmente, a espectroscopia FTIR tem sido desenvolvida para análises em microbiologia. Para a caracterização e identificação de microrganismos baseadas em técnicas vibracionais, não é necessário identificar todas as bandas intensas, freqüências e bandas no espectro e assiná-las para especificar os compostos moleculares. O espectro pode ser grosseiramente avaliado como impressão digital da amostra estudada (MAQUELIN et al., 2002).

A quimiometria ou técnicas multivariadas podem ser empregadas para a análise do espectro complexo (MAQUELIN et al., 2002). O conjunto de dados multivariados gerados pela espectroscopia FTIR é difícil de interpretar visualmente e, por isso, Johnson et al. (2004) fizeram uso de métodos quimiométricos para compreensão dos dados relativos aos metabólitos da fermentação de silagem de legumes pela inoculação de diversas bactérias.

De acordo com Maquelin et al. (2002), para identificação microbiana, duas aproximações básicas podem ser distinguidas nas técnicas quimiométricas usadas no momento. A primeira é baseada sobre métodos não-supervisionados ou de classificação objetiva, analisando a ocorrência natural de grupos em conjuntos de dados e o não requerimento *a priori* de conhecimentos na identidade da amostra, tais como a PCA.

O segundo grupo são técnicas supervisionadas, ou seja, requerem inicialmente o conhecimento da identidade da amostra. Com um conjunto de amostras bem caracterizadas, um modelo pode ser instruído de modo que com predizer a identidade de amostras desconhecidas. Exemplo é análise linear discriminante (LDA).

Outros estudos também demonstraram o uso de espectroscopia FTIR na previsão de funções biológicas. Orsini et al. (2000) demonstrou o potencial de uso da espectroscopia FTIR para o estudo da atividade de absorção de glucose em células de *Candida albicans* intactas. Da mesma maneira, Ngo-Tchi et al. (2003) testaram a eficiência da técnica na classificação e diferenciação de microrganismos selecionados. Os autores qualificam a técnica como nova ferramenta para uma variedade de áreas da microbiologia, como clínica, ambiente e de alimentos e como meio rápido de diferenciação de espécies microbianas do ambiente.

Huang et al. 2006) estudaram o uso de espectroscopia FTIR para diferenciar

caminhos metabólicos no processo de biodegradação de *m-cresol* de uma linhagem microbiana. A validação da análise FTIR foi realizada com cromatografia a gás – espectroscopia de massa (CG-MS). O trabalho evidenciou a rapidez, a capacidade não destrutiva e a relação custo-benefício da técnica para acessar a produção de substâncias químicas originais em matrizes complexas.

Gigliotti et al. (1999) compararam resultados obtidos em amostras de solo alterado, solo não alterado, composto residual urbano e solo alterado em laboratório na mudança de composição de substâncias húmicas em ensaios laboratoriais e um estudo de campo, comparando os resultados obtidos pela FTIR e parâmetros empíricos de humidificação. O espectro FTIR confirmou os resultados obtidos pelos parâmetros empíricos utilizados na taxa e grau de humidificação, mostrando-se um meio de avaliação do estado da matéria orgânica de resíduos e solo.

Mazarevica et al. (2004) propuseram um sistema *on line* de monitoramento da fermentação baseada em FTIR com reflectância total atenuada (ATR). Este método se mostrou eficiente para bioprocessos desenvolvidos onde múltiplos analitos devem ser medidos com alta resolução e pequeno tempo perdido entre a amostragem e medição.

4. MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

A metodologia empregada no estudo se dividiu em três diferentes etapas que envolveram a amostragem do efluente e amostras de *Aspergillus* sp., o estudo de bioissorção e por fim o descarte dos resíduos gerados seguidos de sua destinação final. Estas etapas são descritas conforme fluxograma abaixo:

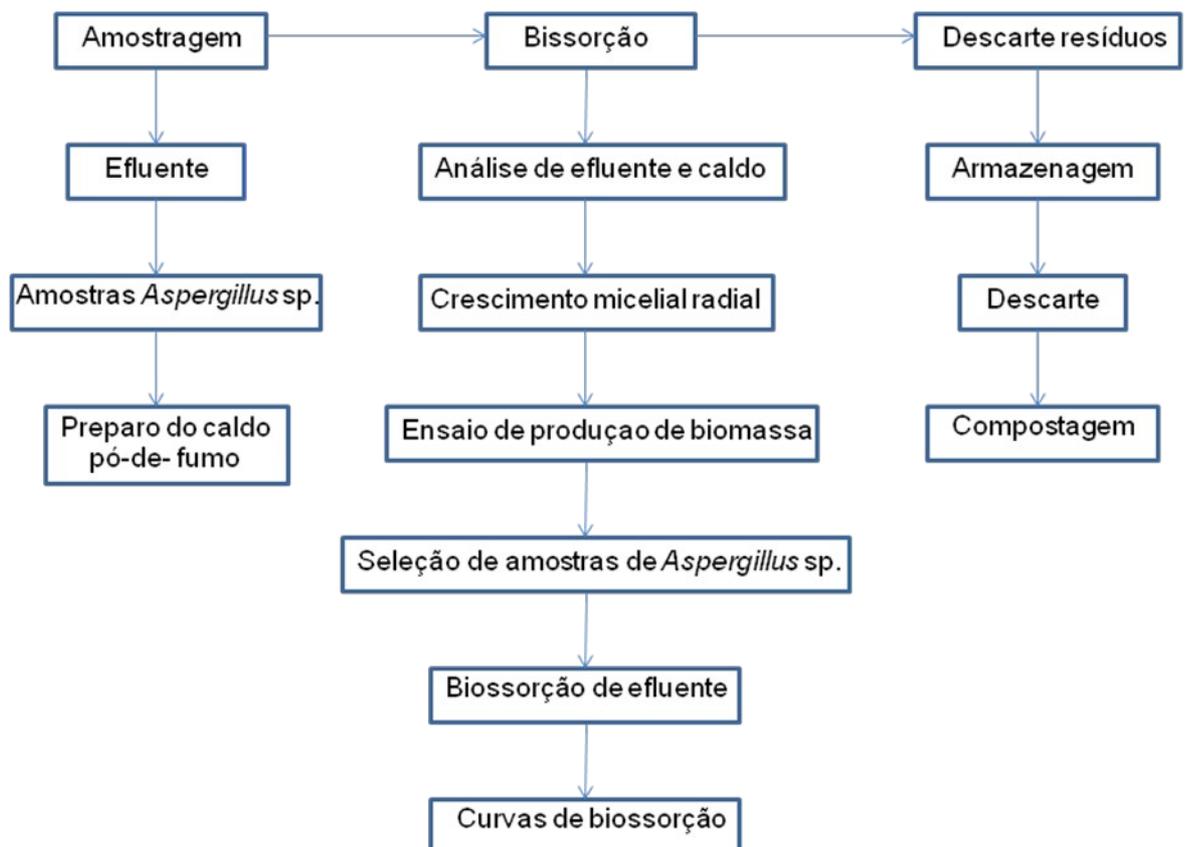


Figura 01 - Fluxograma das etapas da metodologia desenvolvida na pesquisa.

4.2 Amostragem

O efluente bruto foi fornecido por empresa de processamento de tabaco local. Este foi coletado do tanque de equalização da estação de tratamento da empresa na safra de fumo de 2009 e posteriormente armazenado sob refrigeração no laboratório de microbiologia industrial a 4 °C. O laudo químico deste efluente segue em anexo (Anexo A).

As cepas de *Aspergillus* sp. foram fornecidas pela coleção de microrganismos de microbiologia industrial da Universidade de Santa Cruz do Sul (CMMI) e também da coleção da Universidade de São Paulo (USP) e mantidas em tubo inclinado com ágar Sabouraud com repiques quinzenais. Foram disponibilizadas 22 cepas de *Aspergillus* sp. a citar: *A. niger* USP 898, *A. niger* USP 9, *A. niger* CMMI 111, *A. fumigatus* USP 2, *A. fumigatus* USP 174, *A. terreus* CMMI 233-3, *A. terreus* USP 1, *Aspergillus* sp. 160, *A. carneus* CMMI 1, *A. ochraceus* USP 168, *A. ochraceus* USP 186, *A. niger* CMMI 2, *Aspergillus* sp. CMMI 4, *A. flavus* USP 279, *A. niger* CMMI 5, *A. fumigatus* CMMI 14, *Aspergillus* sp. CMMI 17, *Aspergillus* sp. CMMI 18, *A. niger* CMMI 3, *A. flavus* CMMI 01, *Aspergillus* sp. 13, *A. terreus* USP 484.

Para a preparação do caldo, foram utilizados 100 gramas de pó de fumo para cada 1000 mL de água deionizada, sendo este fervido, filtrado e esterilizado em autoclave (120°C, 1 atm) por 20 minutos.

4.3 Biossorção de efluente

4.3.1 Análise do caldo e efluente

Para a caracterização e identificação de pigmentos presentes no efluente do caldo preparado de fumo, 10 µL de cada material foi adicionado a 100 mg de KBr e analisado em triplicata no infravermelho na faixa de 4000-400 cm⁻¹ com 32 varreduras por espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho com Transformada de Fourier.

4.3.2 Seleção de cepa de *Aspergillus* sp.

Amostras de *Aspergillus* sp. foram inoculadas em tubos de ensaio com 5 mL de ágar Sabouraud (Oxoid) inclinado e incubadas a 30 °C até formação de micélio reprodutor (7 dias). Os esporos foram suspensos em solução 0,02% de ágar bacteriológico (Himedia) e 0,5 mL desta solução foi aplicada em placa de Petri de 7 cm de diâmetro contendo 5 mL de ágar Sabouraud preparado com extrato pó-de-fumo (65 g/L de caldo). As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h até iniciar a cobertura da superfície do ágar.

Discos de cultura de cada amostra foram recortados com auxílio de *punch biopsy* nº 5 e transferidos com a cultura invertida para o centro de cinco placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20 mL de ágar bacteriológico mais caldo extrato de pó-de-fumo. As placas foram incubadas a 30 °C sendo o diâmetro das colônias avaliado a cada 12 h, com obtenção de 6 pontos amostrais.

Os diâmetros de cada placa foram plotados em gráfico em função do tempo (h) e as taxas de crescimento (declividades) das fases de crescimento linear foram calculadas. As médias de declividades da quintuplicata de cada amostra foram calculadas e correlacionadas com a capacidade de crescimento no meio.

Também foi avaliada a presença de halo de descoloração em torno das colônias, sendo selecionada para a produção de biomassa a cepa que apresentou maior velocidade de crescimento entre aquelas que apresentaram índice de

descoramento.

4.3.3 Halo de pigmentação e halo de descoloração

O surgimento de uma pigmentação escura em torno da colônia (halo de pigmentação), assim como de uma aparente descoloração (halo de descoloração) e de consumo de pigmentos pela colônia (halo consumido), fez com que fossem empregadas técnicas para a investigação desta observação. A primeira tentativa de análise do halo de pigmentação foi feito por meio de técnica de extração utilizando 100 mg do halo de pigmentação e do meio extrato de fumo (intacto) e em seguida submetidos a extração em 1 mL de etanol 95% com aplicação em cromatografia de camada delgada.

Posteriormente, as amostras foram divididas de acordo com a presença ou ausência de halo de pigmentação, halo de descoloração e halo consumido, com recorte de cerca de 1 mg de meio para 100 mg de KBr. Cada amostra foi estudada em triplicata, seguida de avaliação multivariada segundo análise por agrupamento hierárquico (HCA) e análise de componentes principais (PCA). Os resultados da PCA foram obtidos por meio de pré-processamento das amostras (*mean-center*). Esta tarefa foi executada por meio do software *Pirouette* da Infometrix.

As análises referentes a caracterização das amostras foram realizadas em espectrofotômetro de infravermelho FT-IR Magna 550 da Nicolet, no laboratório de química da Universidade de Santa Cruz do Sul. As amostras foram preparadas adicionando de brometo de potássio (KBr) macerado a uma pequena fração da amostra a ser avaliada.

4.3.4 Ensaio de produção de biomassa

A preparação do caldo extrato de pó-de-fumo se deu através de 1 litro de água deionizada para cada 100 g de pó de fumo. A produção de biomassa através das cepas se deu por fermentação em superfície líquida e fermentação submersa em 24 erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL de caldo extrato pó-de-fumo, e inoculados com 1mL de uma suspensão padronizada de esporos com 1×10^5 UFC/mL, com incubação a 30 °C por 8 dias em estufa de cultura bacteriológica Quimis modelo Q316M5 (para a fermentação em superfície líquida) e estufa com agitação e circulação de ar modelo Marconi MA- 420 a 170 rpm (para a fermentação submersa). Amostras de culturas foram coletadas em triplicata a cada 48 h, sendo o conteúdo de cada frasco filtrado a vácuo com auxílio de papel filtro previamente tarado após secagem em estufa a 40 °C por 24 h. Após a filtração, o papel filtro foi pesado, repetindo-se a operação de secagem. Finalmente o material seco ser pesado e a diferença entre o peso inicial e o peso final resultou no valor do peso seco da biomassa.

Para a avaliação das possíveis modificações estruturais da biomassa assim como a tendência a clarificação do caldo, as 22 amostras de *Aspergillus* sp. foram analisadas em triplicata na forma de *pellets* juntamente com o caldo de fumo utilizado para o crescimento da biomassa em 192 horas. Foram utilizados 5 mg de biomassa e 10 µL de caldo para 100 mg de KBr para a análise espectrométrica no infravermelho, seguida de avaliação multivariada segundo análise por agrupamento hierárquico (HCA) e análise de componentes principais (PCA).

A amostra de *Aspergillus* sp. selecionada foi cultivada em erlenmeyer de 250 mL contendo 75 mL do caldo de pó-de-fumo e 5 mL de suspensão de esporos de 1×10^5 UFC/mL com incubação sob agitação a 30 °C por 8 dias.

Os *pellets* obtidos pelo cultivo em incubadora orbital foram filtrados e imersos em erlenmeyer de 250 mL com 75 mL de água estéril e incubados sob agitação por 24 horas Os *pellets* foram novamente filtrados e submetidos a novo esgotamento sob as mesmas condições.

4.3.5 Ensaio de biossorção

Após 24 horas, o material foi novamente filtrado e submetido à inativação. Os ensaios de bioadsorção foram realizados a partir de três diferentes técnicas de inativação de biomassa: pelo calor úmido em alta e média temperatura e por meio de esterilização química. A inativação pelo calor úmido foi executada em autoclave (120°C, 1atm) por 20 minutos e pela fervura (água a 100 °C) por 20 minutos. A inativação química foi executada pelo emprego de uma solução 10% de hipoclorito de sódio por um período de 24 horas.

Após inativação, os *pellets* foram postos para secagem em estufa sob 60°C por 48 horas. Este material seco foi macerado, transformando a biomassa em pó para ser utilizado nos ensaios subseqüentes de bioadsorção. Estes foram realizados em duplicata contendo em cada frasco 10, 20, 40, 80, 160 mg de biomassa em pó seca juntamente com 10 mL de efluente bruto.

A biomassa permaneceu em contato com o efluente por 8 horas sob agitação à temperatura de 30°C. O efluente bioadsorvido foi então centrifugado, e o sobrenadante submetido à análise de infravermelho na região do ultravioleta de 350 a 700 nm na concentração de 20% de efluente.

Os dados referentes à bioadsorção do efluente permitiram a construção de uma curva de bioadsorção referente a cada um dos métodos de inativação empregados, baseada em diferentes concentrações de biomassa, tipo de inativação empregada e no tempo de contato com o efluente. Este gráfico permitiu a avaliação da taxa de bioadsorção associada à melhor técnica de inativação e o tempo mínimo de contato.

4.4 Descarte de resíduos

Todos os resíduos gerados durante o estudo foram armazenados e descartados seguindo as recomendações do laboratório de microbiologia industrial da universidade no que diz respeito principalmente aos riscos de contaminações biológicas. Após descarte, os resíduos foram destinados à estação de compostagem localizada nas imediações da universidade.

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento do trabalho se referem principalmente ao pó-de-fumo utilizado durante a preparação do caldo. Este foi armazenado em recipientes de plástico no laboratório, e posteriormente levados a estação de compostagem da universidade localizada junto à universidade pois, devido a ausência de contaminantes biológicos e de produtos químicos prejudiciais, este material orgânico pode ser utilizado como material para o enriquecimento de solos, contribuindo com a reciclagem ambiental de resíduos.

Da mesma forma, os resíduos de meio de cultivo utilizados para o crescimento dos microrganismos, após esterilização (calor úmido) foram descartados e juntamente levados para compostagem por também se constituírem de um material orgânico rico em nutrientes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do efluente e do caldo

Devido à inviabilidade de crescimento das amostras de *Aspergillus* sp. utilizando diretamente o efluente, o caldo preparado de pó-de-fumo foi testado visando simular a condição física de cor do efluente de empresa de processamento de tabaco. Todos os ensaios foram realizados utilizando-se uma condição extrema de coloração, para testar a capacidade máxima de bioadsorção das amostras simulando uma condição extrema de pigmentação do efluente.

Conforme a Figura 02 o espectro no infravermelho do efluente coletado em uma indústria fumageira e do caldo de pó-de-fumo apresentam os mesmos padrões de bandas, demonstrando desta forma similaridades químicas entre as duas amostras. Isto era esperado uma vez que o efluente industrial é composto pelo resíduo líquido da lavagem de talos e pelo efluente sanitário (que não o responsável pela coloração característica). A aparente diferença observada na região de 1100 cm^{-1} pode ser explicada por variações na quantidade de amostra analisada.

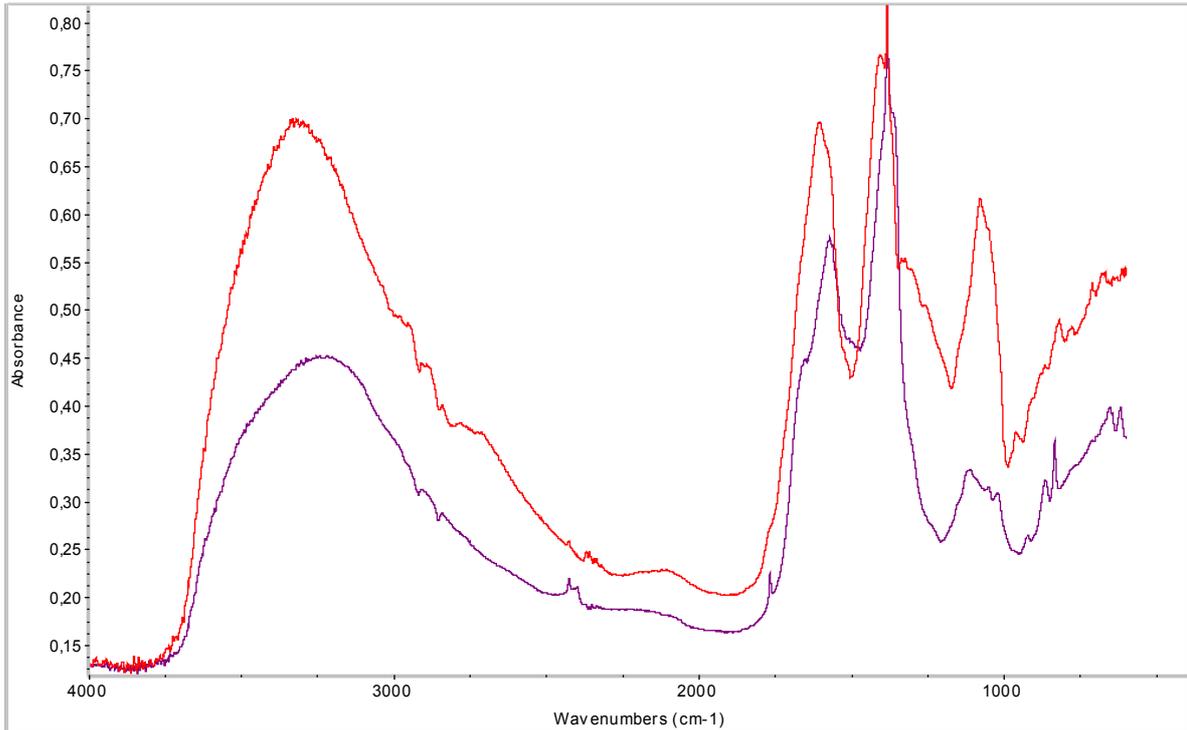


Figura 02 - Espectro de infravermelho para o caldo de pó-de-fumo (vermelho) e efluente (roxo).

Conforme a natureza vegetal do efluente e do caldo de fumo, resíduos moleculares da estrutura da clorofila deveriam estar presentes, uma vez que o caldo foi preparado por meio de um material de origem vegetal, classificado pela indústria fumageira como resíduo. Em termos estruturais a clorofila é uma molécula complexa e sob certas condições é degradada gerando estas formas residuais (STREIT et al., 2005).

Estas estruturas residuais moleculares foram confirmadas pela observação dos espectros de infravermelho. A existência de uma banda mais intensa na região de 3300 cm^{-1} possivelmente está associada ao resíduo fitol que possuem em sua extremidade um grupamento OH (Figura 03), enquanto os estiramentos observados na região de 1610 cm^{-1} que correspondem à ligação C=N, e 1081 cm^{-1} que corresponde a ligação C-O do éster alifático, ambos pertencentes à estrutura do anel porfirina associado à molécula de clorofila. Os demais estiramentos das regiões 1388 cm^{-1} estão associados à ligação $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ adjacente à carbonila.

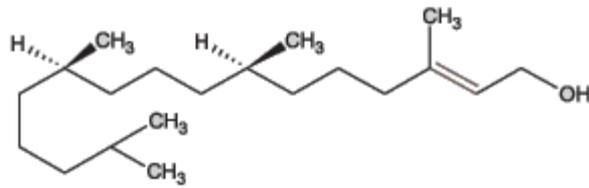


Figura 03 – Estrutura química do fitol

Fonte: Lanfer-Marques (2003)

5.2 Seleção de cepa *Aspergillus* sp.

A Figura 04 demonstra o cálculo das taxas de crescimento média (declividade) (μ) empregando o caldo para as 22 amostras de *Aspergillus* sp. estudadas.

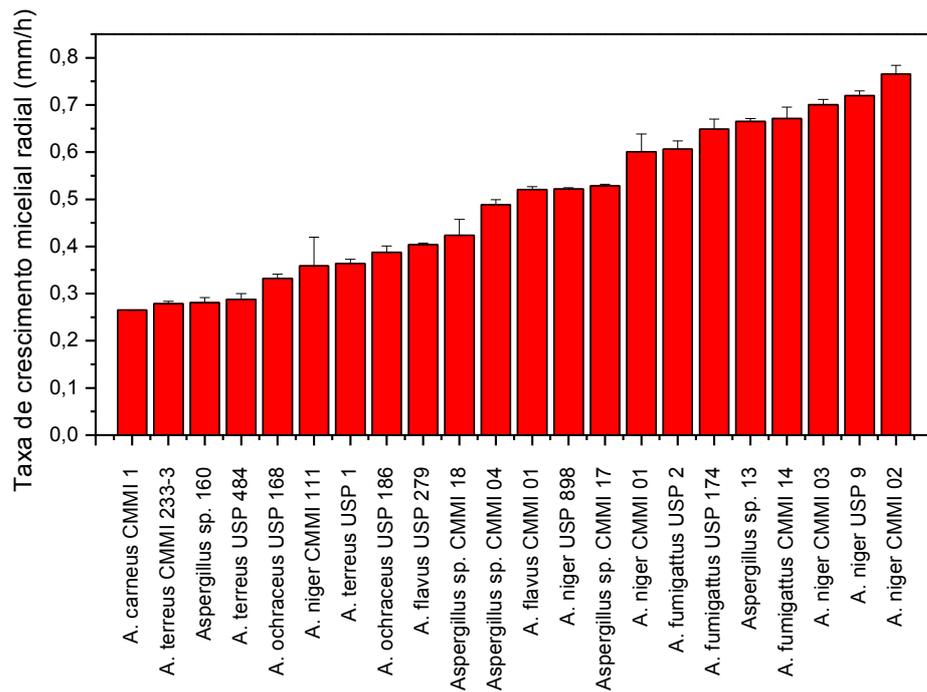


Figura 04 – Taxa de crescimento micelial radial de cepas de *Aspergillus* sp. cultivadas em ágar Sabouraud com extrato de pó-de-fumo.

Apresentaram maiores μ as amostras *A. niger* e *A. fumigatus*. Apesar de inicialmente apresentar um crescimento reduzido, algumas amostras *A. niger* tiveram um aumento significativo em sua taxa de crescimento, implicando em sua alta declividade final. Amostras *A. carneus*, *A. niger* e *A. terreus* apresentaram comportamento similar de crescimento, verificando-se uma menor adaptação ao meio em virtude de suas baixas taxas de crescimento.

Foi observada também a redução de crescimento em amostras de *A. niger*, *A. ochraceus* e outras amostras ainda não identificadas a partir dos tempos finais de medida, enquanto as demais amostras apresentavam taxas ainda crescentes de crescimento (Figura 05).

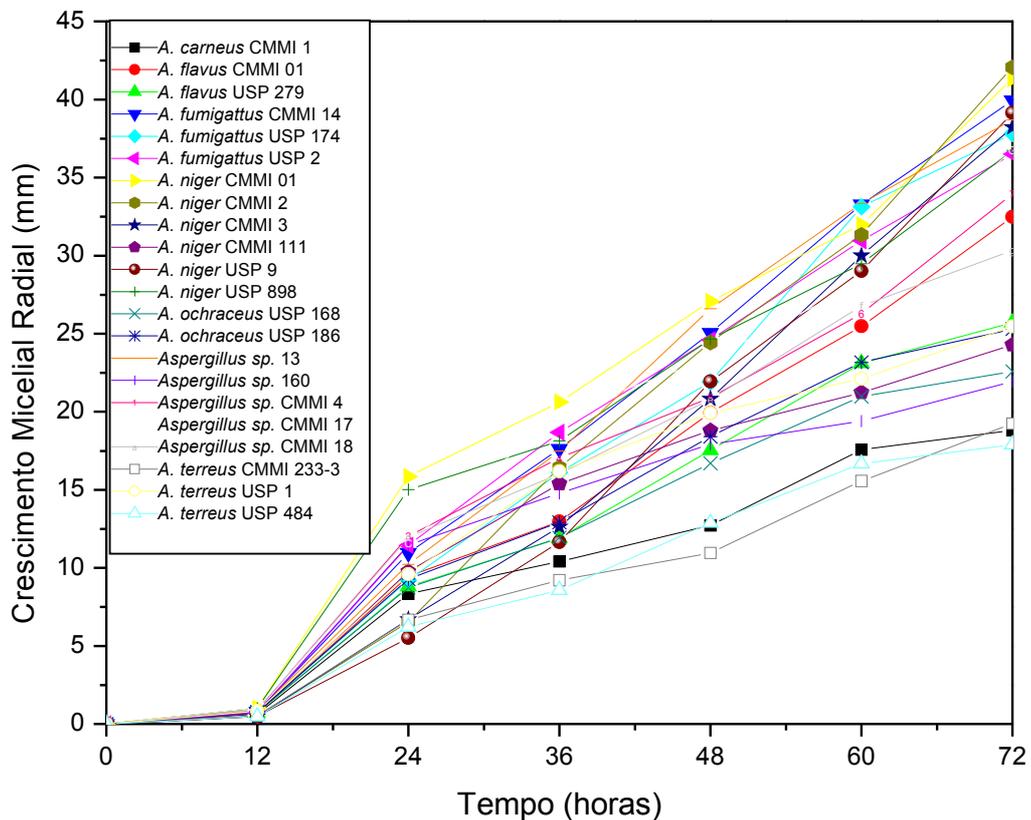


Figura 05 – Curvas de crescimento micelial radial de cepas de *Aspergillus* sp. cultivadas em ágar Sabouraud com extrato de pó-de-fumo.

Os coeficientes de correlação (R^2) das retas de crescimento micelial radial *versus* tempo estiveram entre 0,9557 e 0,9952, indicando uma boa relação entre os parâmetros associados, neste caso, o diâmetro da colônia em função do tempo. Os menores valores são referentes às espécies *A. niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus* e com coeficientes de 0,9557; 0,9592 e 0,9625 e os maiores valores 0,9857; 0,9860 e 0,9952 relacionados às amostras *A. niger* e *A. fumigatus*.

Durante a avaliação do crescimento radial, foi observada a presença de um halo de pigmentação em torno do micélio para algumas amostras, conforme demonstrada a Figura 06.



Figura 06 - Halo de pigmentação castanha (seta) observada em torno do micélio de algumas cepas de *Aspergillus* sp. quando cultivadas em ágar à base de extrato de pó-de-fumo.

As amostras que apresentaram este comportamento foram *A. terreus*, *A. ochraceus*, *A. flavus* e algumas amostras *Aspergillus* sp. ainda não identificadas (*Aspergillus* sp. 18 e *Aspergillus* sp. 160). As amostras com menor μ são as mesmas que apresentaram o halo de pigmento, com exceção da amostra de *A. niger* CMMI 111. Estes resultados ainda não foram reportados cientificamente, evidenciando a necessidade de uma melhor investigação a respeito do comportamento verificado para algumas cepas.

Possivelmente, este halo está relacionado a algum bioproduto gerado durante o período de incubação das cepas, ou então a algum produto resultante da

degradação da clorofila. Como o halo apresenta coloração mais escura que o próprio meio utilizado para o crescimento, as cepas geradoras de halo, não seriam a princípio recomendadas para a biorremediação de efluentes da indústria de tabaco, que objetiva-se reduzir a coloração final do efluente.

Como as taxas de crescimento micelial radial, bem como, a produção de biomassa não foram significativas para estas cepas geradoras de halo, a seleção de cepas mais indicadas, considerando as 22 testadas neste estudo, para a biorremediação de efluentes de indústria de processamento de tabaco pode ser realizada pela presença de halo de pigmentação em torno do micélio.

5.3 Halo de pigmentação

Visando complementar os estudos de crescimento micelial radial, foi investigada a natureza do halo de pigmentação observado em algumas amostras estudadas, a fim de compreender possíveis reações de biodegradação de componentes do extrato. Para isto, as amostras positivas e negativas ao halo foram submetidas à extração com etanol 95% com posterior aplicação em cromatografia de camada delgada.

Observou-se um padrão diferencial para as bandas das amostras com e sem halo de pigmentação e verificou-se que a substância associada ao halo é sensível à luz, uma vez que o padrão da banda associado desapareceu em poucos dias. Na tentativa de melhor visualizar as bandas diferenciais, as amostras foram submetidas ao crescimento em superfície líquida de caldo de pó-de-fumo, com posterior análise cromatográfica do caldo pó-de-fumo em camada delgada. Não foi possível a identificação de nenhum padrão de eluição que diferenciasse as amostras com e sem halo, conforme pode ser visualizado na figura a seguir:

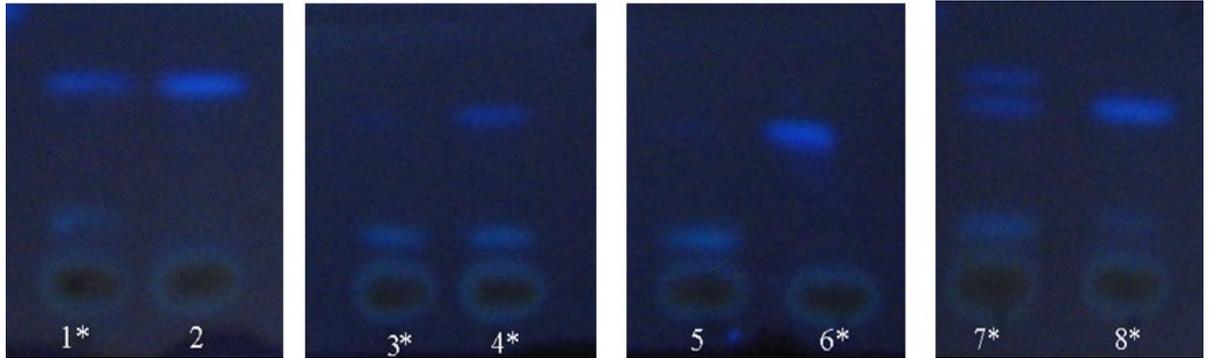


Figura 07 - Cromatogramas obtidos por eluição por cromatografia em camada delgada de caldos de cultura de amostras de *Aspergillus* sp. cultivadas em extrato de pó-de-fumo e reveladas por luz uv 365 nm. 1 – *A. terreus* USP 01, 2- *A.fumigatus* USP 174, 3- *Aspergillus* sp. 160, 4- *A. terreus* CMMI 233-3, 5- *A. fumigatus* USP 174, 6- *A. carneus* CMMI 01, 7 – *A. ochraceus* USP 169, 8- *A. ochraceus* USP 186. *: amostras com halo de pigmentação.

Como o halo de pigmentação apresenta coloração mais escura que o próprio extrato de fumo, as amostras positivas não são, a princípio, recomendadas para a descoloração de efluentes. No entanto, os resultados da cromatografia podem estar relacionados a algum novo produto que, sob condições específicas e determinadas pelo meio nutritivo extrato de fumo, foi estimulado.

Análises subseqüentes para caracterização do possível produto ou identificação da substância degradada foram realizadas. Para tanto, um novo experimento de crescimento micelial radial foi realizado para as nove amostras positivas ao halo de pigmentação.

O desenvolvimento do halo se deu proporcionalmente ao desenvolvimento micelial. Foi possível verificar o tempo exato de aparecimento do halo de pigmentação, que foi diferencial para as nove amostras, o que pode ser visualizado na Figura 08.

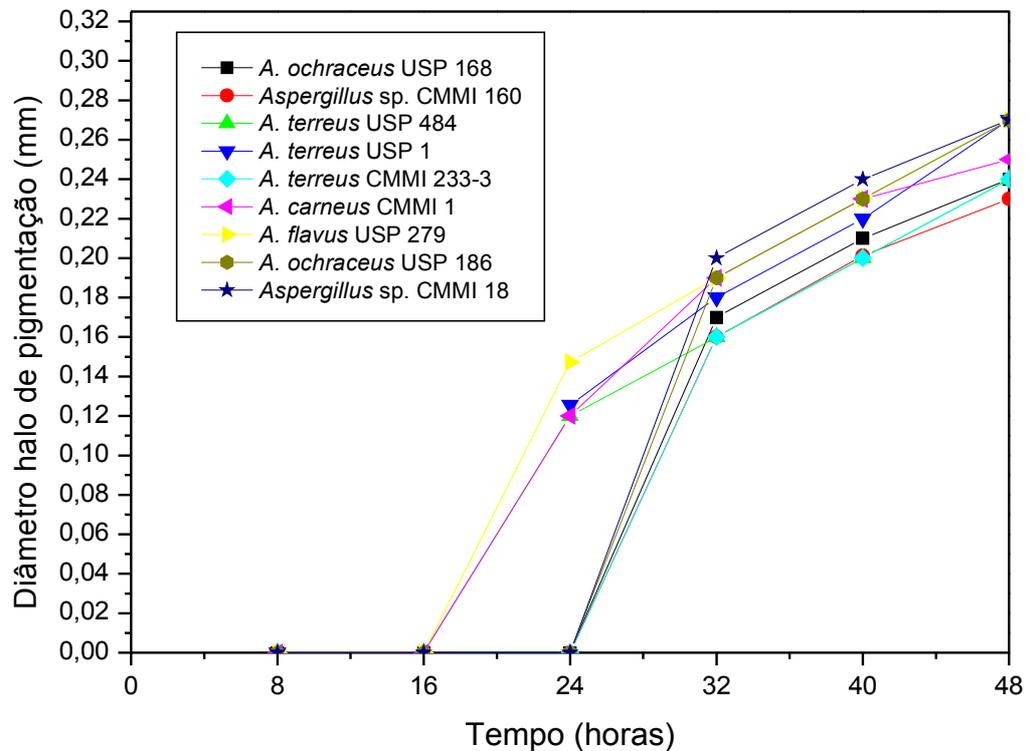


Figura 08 - Desenvolvimento do halo de pigmentação em cepas de *Aspergillus* sp. cultivadas em ágar à base de extrato de pó-de-fumo.

Durante a incubação, verificou-se o aparecimento de setores em algumas amostras. Estes estão diretamente associados à modificação da amostra na sua forma de crescimento, com reorganização do padrão morfológico para possibilitar a adaptação às novas condições ambientais externas. Isto demonstra a capacidade adaptativa destas amostras.

A Figura 09 evidencia a formação dos setores e de halos de pigmentação e de descoloração para diferentes amostras de *Aspergillus* sp.. O surgimento do halo permite associar inicialmente uma possível utilização dos nutrientes presentes no meio pelas amostras, com conseqüente clarificação.

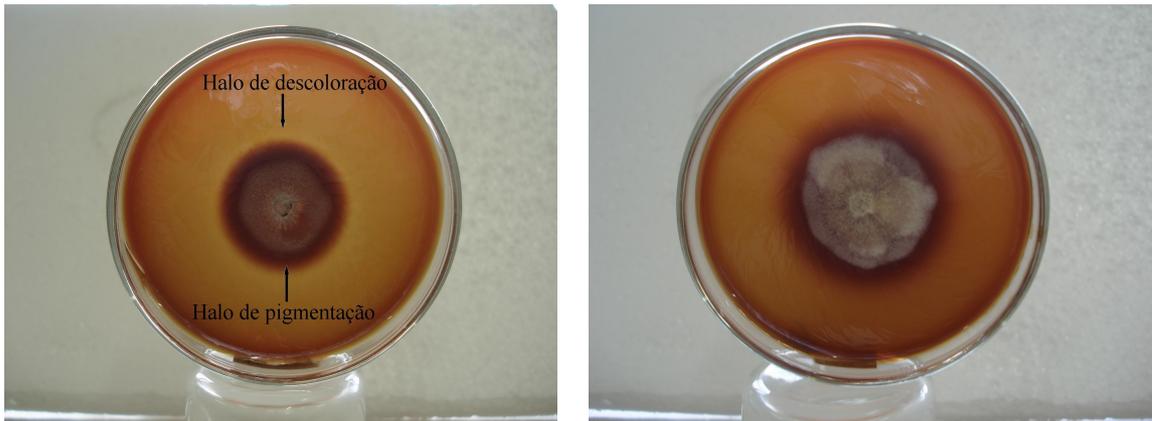


Figura 09 - Formação de halos de pigmentação e de descoloração e setores em cepas de *Aspergillus* sp. cultivadas em ágar à base de extrato de pó-de-fumo. À esquerda: *A. carneus* CMMI 01; à direita: *A. flavus* USP 279.

Amostras de ágar referentes às zonas de pigmentação e de descoloração junto com ágar intacto foram submetidas à análise por espectroscopia FTIR para verificar possíveis diferenças químicas associadas aos halos em comparação ao meio de crescimento, tal como ausência ou então a presença de substâncias atribuídas a biodegradação ou a um bioproduto desta biodegradação.

Adicionalmente, foi incluída nesta investigação uma porção de halo consumido de pigmentação observado em placas contaminadas. Esta situação pode ser visualizada pela Figura 10. Esta placa se diferencia das demais por apresentar uma porção de halo de pigmentação consumido, possivelmente devido ao desenvolvimento de uma contaminação ou então ao consumo por ela dos elementos de constituição do halo.



Figura 10 – Indicação de halo consumido em *A. carneus* CMMI 01 contaminado com cepa fúngica filamentosa.

A exploração do conjunto de espectros via PCA não identificou a formação de grupamentos quando foi considerada toda a faixa de comprimento de onda dos espectros de infravermelho, conforme Figura 11.

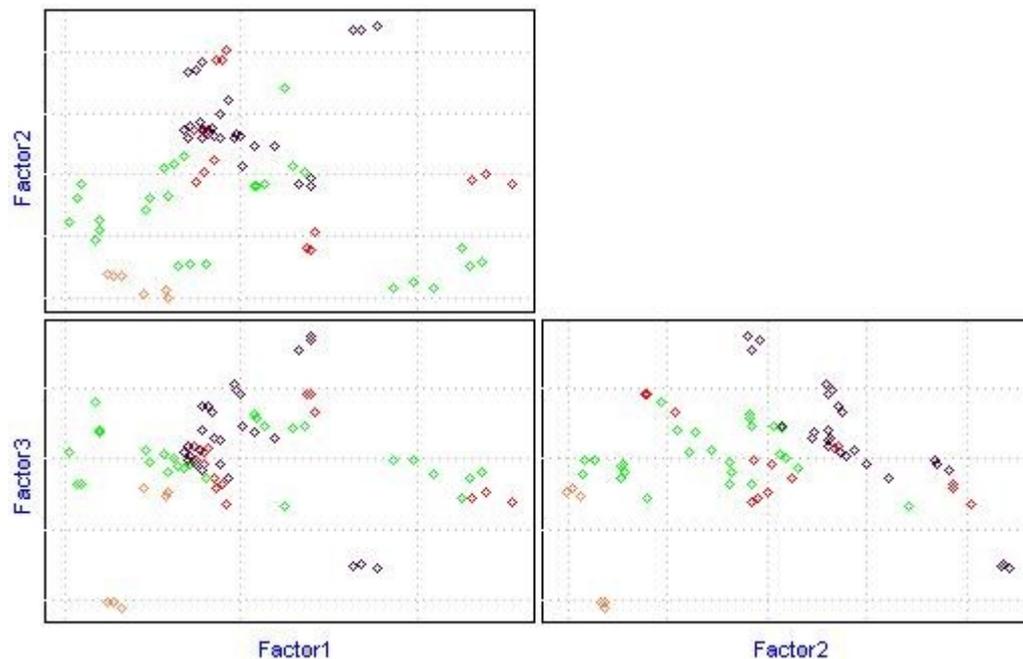


Figura 11 – Gráfico de scores de PCA de espectros FTIR (4000 a 600 cm^{-1}) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp.. Amostras em verde: halo de pigmentação; amostras em vermelho: halo de descoloração; amostras em laranja: halo consumido; amostras em roxo: meio intacto.

Este mesmo resultado foi observado para outras faixas de comprimento de onda analisadas tais como 1900 a 1200 cm^{-1} , 2400 a 1200 cm^{-1} e 1700 a 1100 cm^{-1} . Nesta última faixa foram observadas uma discreta tendência à formação de grupos referentes aos espectros FTIR associado às amostras de halos de meio intacto e de halo consumido.

No entanto quando a faixa analisada foi de 1700 a 1400 cm^{-1} uma melhor separação de grupamentos pode ser verificada, principalmente quando se considera o PC1 *versus* PC3, como pode ser visualizado pela Figura 12.

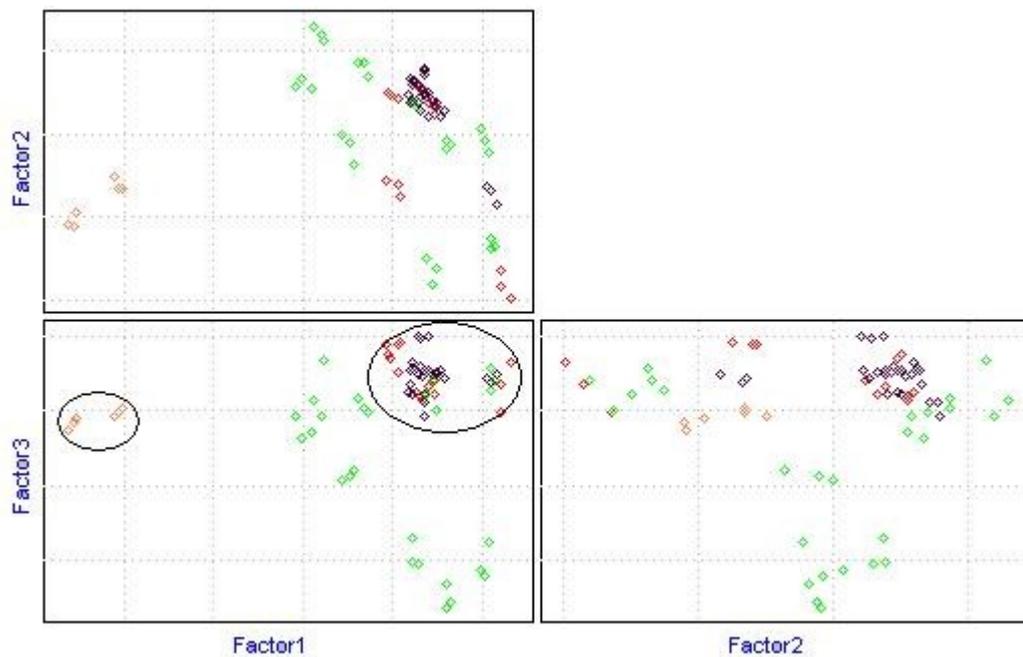


Figura 12 – Gráfico de *scores* de PCA de espectros FTIR (1700 a 1400 cm^{-1}) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp.. Amostras em verde: halo de pigmentação; amostras em vermelho: halo de descoloração; amostras em laranja: halo consumido; amostras em roxo: meio intacto.

Pode ser observada pela PC1 *versus* PC3 uma distinção entre o halo de pigmentação, halo consumido, e de descoloração que se encontra sobreposto sobre o meio de crescimento. Esta sobreposição pode ser explicada em virtude da

inexistência de distinção química entre o halo de descoloração e meio de crescimento, que por se mostrar mais clarificado que o meio foi atribuído, a princípio, ao uso de nutrientes do meio pelas amostras de *Aspergillus* sp. resultando neste clareamento.

Entretanto, como demonstra a figura acima, é evidente a separação observada principalmente entre os grupos associados ao halo de pigmentação e ao halo de descoloração. Esta distinção ocorreu em uma faixa de comprimento de onda associada às proteínas, uma vez que as absorções de amidas I, II e III são verificadas nas faixas de 1650 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} e 1400 a 1200 cm^{-1} (BARTH, 2007).

A PCA desta região incluiu 94% de toda informação química, considerando as componentes PC1, PC2 e PC3. Também foram encontradas 6 amostras anômalas que não influenciaram na interpretação dos dados uma vez que possuíam baixo índice de resíduo.

Após PCA, foi realizada HCA para esta mesma faixa de comprimento de onda para o estabelecimento do grau de similaridades entre os grupamentos formados. A Figura 13 apresenta o dendrograma obtido.

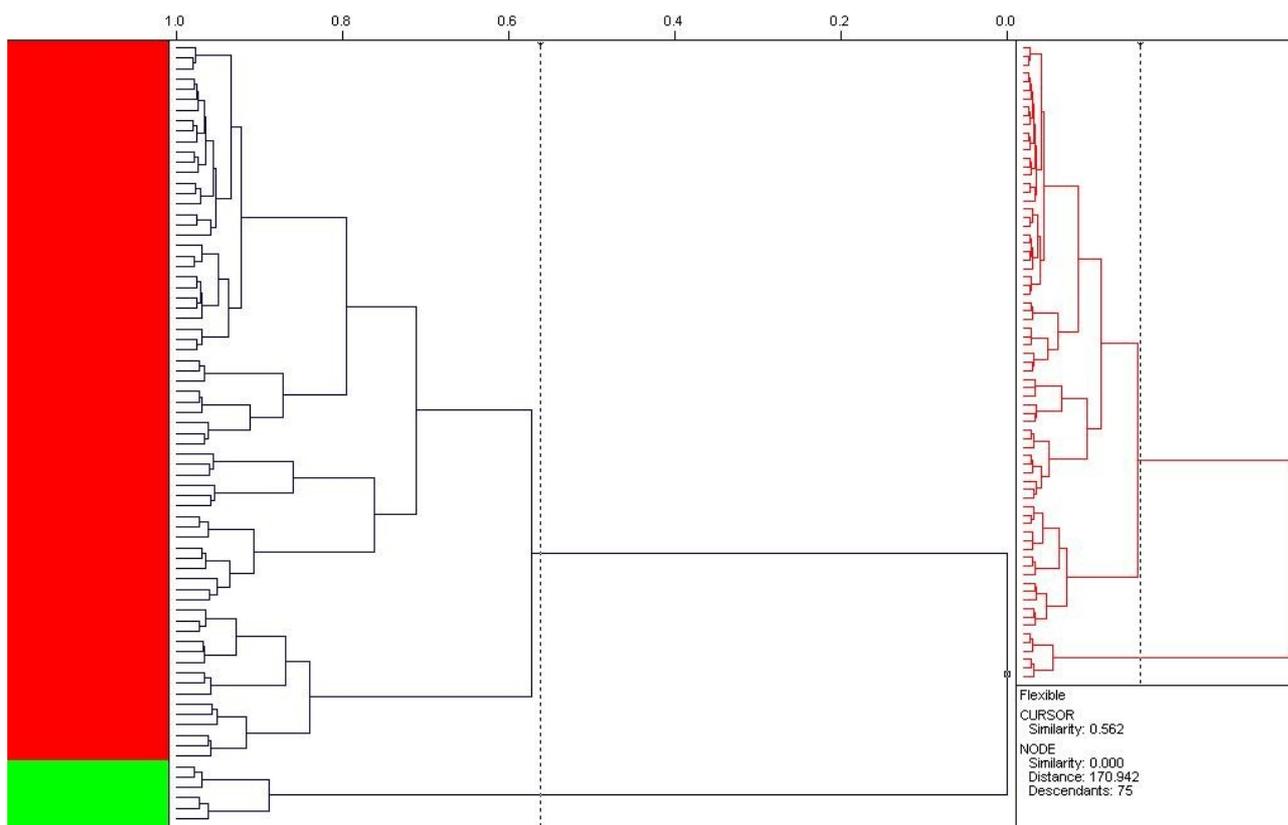


Figura 13 - Dendrograma do halo de pigmentação, de descoloração (vermelho) e consumido (verde) e do meio de crescimento intacto (vermelho) obtido pela HCA para região 1700-1400 cm^{-1} .

No dendrograma ficou evidente a formação de dois principais grupamentos relacionados ao halo consumido (verde) e halo de pigmentação, descoloração e o meio intacto (vermelho). Através do dendrograma, a formação de grupamentos entre os halos de pigmentação, descoloração e de meio não foi tão clara, e portanto não identificada por legenda na figura acima.

A similaridade entre os dois nós principais é de 0,562 sendo os grupos formados por 69 e 6 membros cada. O menor grupo é formado exclusivamente pelo halo consumido. A similaridade entre os grupos é de 0,889 (6 membros) e 0,573 (69 membros).

Desta forma, a existência pré-estabelecida de distinção entre halos e meio, feita pela simples visualização das placas pôde ser confirmada pelo emprego de ferramentas multivariadas que permitiram a distinção química clara destes grupamentos.

5.4 Ensaio e otimização da produção de biomassa

A evolução da produtividade de biomassa, em diferentes tempos de avaliação, tanto em condição de incubação estática e agitada, pode ser visualizadas pela Figura 14.

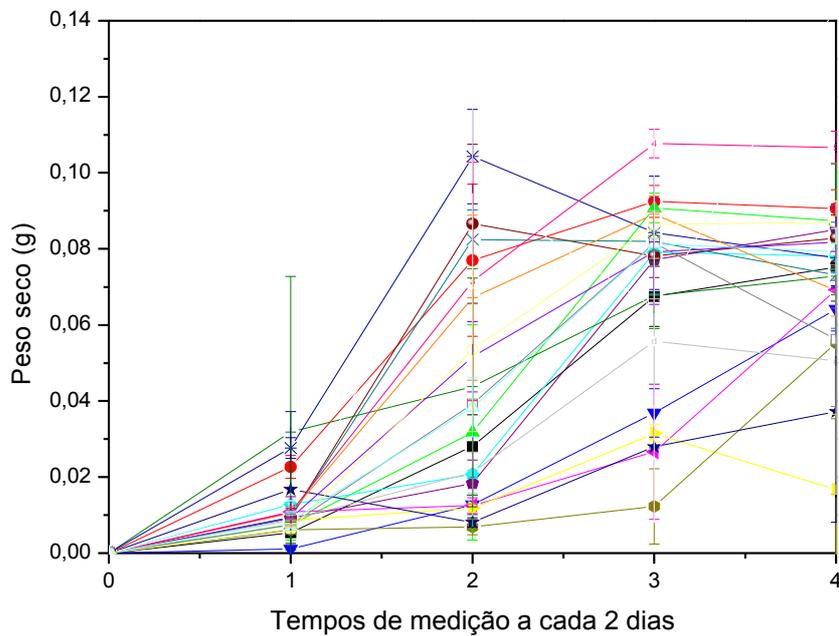
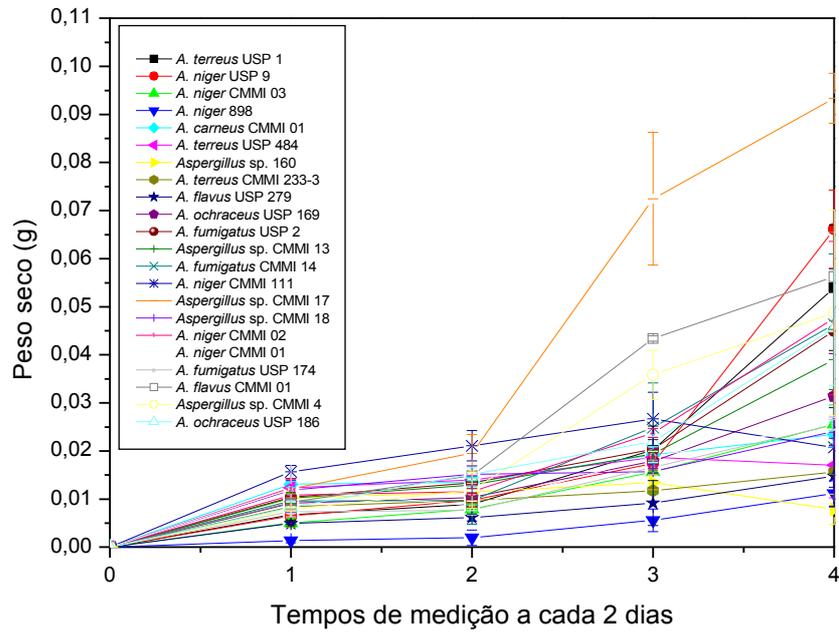


Figura 14 – Variação do peso seco de biomassa de cepas de *Aspergillus* sp. cultivadas em caldo de pó-de-fumo sob cultivo estático (superior) e sob agitação (inferior).

Conforme a figura 14, na estufa sem agitação a maior produção de biomassa foi atribuída a amostra *Aspergillus sp.* CMMI 17 seguida pela amostra *A. niger* USP 9. Para a condição agitação, verificaram-se menores variações de peso seco para as diferentes amostras de *Aspergillus sp.*, com maiores produtividades relacionadas às amostras *A. niger* CMMI 02 e *A. niger* USP 9, corroborando os resultados obtidos pelo crescimento micelial radial.

A diferença encontrada na comparação dos resultados de crescimento micelial e peso seco na condição estática pode ser atribuída ao comportamento de fungos não adaptados ao meio apresentam maiores taxas de crescimento buscando colonizar novos meios com nutrientes mais adequados. A velocidade de crescimento micelial, portanto, não foi utilizada como critério para a seleção de da cepa mais adequada ao ensaio de bioabsorção. Esta seleção se deu a partir da produção de biomassa por cultivo em fase submersa.

Outra diferenciação entre as condições de crescimento quando agitada ou estática está atribuída à produtividade de biomassa nestas diferentes condições. Maiores produtividades de biomassa foram atribuídas ao crescimento sob agitação, que apresentou 0,103 g como maior valor de peso seco, enquanto que na condição estática o maior valor de peso seco foi de 0,093 g, e foi bem superior os demais valores de peso seco nestas condições.

Além da produção de biomassa e, conseqüentemente, sua atribuição na forma de peso seco, foi avaliada qualitativamente também a capacidade de absorção de pigmentos presentes no meio de cultura líquido. As amostras retiradas da estufa agitada, no quarto tempo de medição (192 horas), que apresentaram melhor evidência de absorção foram as amostras *A. niger* CMMI 01, *A. niger* CMMI 02, *A. niger* USP 898 e *A. niger* USP 9, conforme Figura 15.

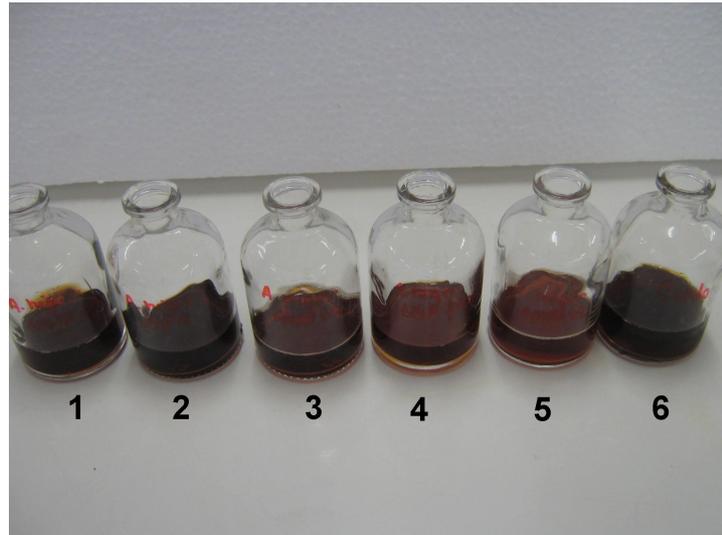


Figura 15 – Cor residual do caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de algumas cepas de *Aspergillus* sp. (1) *A. niger* CMMI 03, (2) *A. niger* USP 9, (3) *A. niger* CMMI 02, (4) *A. niger* USP 898, (5) *A. niger* CMMI 01 e (6) caldo de pó-de-fumo sem inoculação.

Pela figura se observa uma redução gradual da cor do caldo de pó-de-fumo principalmente para as amostras *A. niger* CMMI 01, *A. niger* CMMI 02 e *A. niger* USP 898. As demais amostras também apresentaram redução da coloração do caldo sendo esta mais discreta quando comparado ao caldo puro, sem inoculação.

Pela observação dos espectros de infravermelho para o caldo, verificou-se uma tendência de diminuição da intensidade da absorção das amostras após 192 horas de contato com o caldo, indicando um consumo pelos microrganismos dos componentes residuais da molécula de clorofila, utilizados para seu desenvolvimento como fontes de carbono e nitrogênio.

Situação similar pôde ser observada nos espectros de infravermelho do caldo onde as amostras de biomassa permaneceram em contato com o caldo por 24 horas, sendo verificadas mudanças no meio pela diminuição de algumas bandas de absorção. Assim, afirma-se intuitivamente que já existe uma boa adaptação às condições do meio caldo de pó-de-fumo em apenas 24 horas de contato.

A confirmação destas modificações químicas no caldo bem como na biomassa, procedeu-se com a análise multivariada dos dados por meio de PCA e HCA. Estudo via PCA permitiu a verificação de similaridades entre os conjuntos de dados

associado ao caldo de pó-de-fumo utilizado durante 192 horas como meio nutritivo para o desenvolvimento das amostras de *Aspergillus* sp.

Considerando toda a faixa de comprimento de onda por meio de um diagrama bidimensional de *scores*, houve a formação de dois grupos distintos, mostrados pela figura 16. As três primeiras componentes (PC1, PC2 e PC3) permitiram a clara separação de dois grupamentos, não havendo necessidade pela consideração das demais componentes principais. Estas três primeiras componentes descrevem 76,73% dos dados.

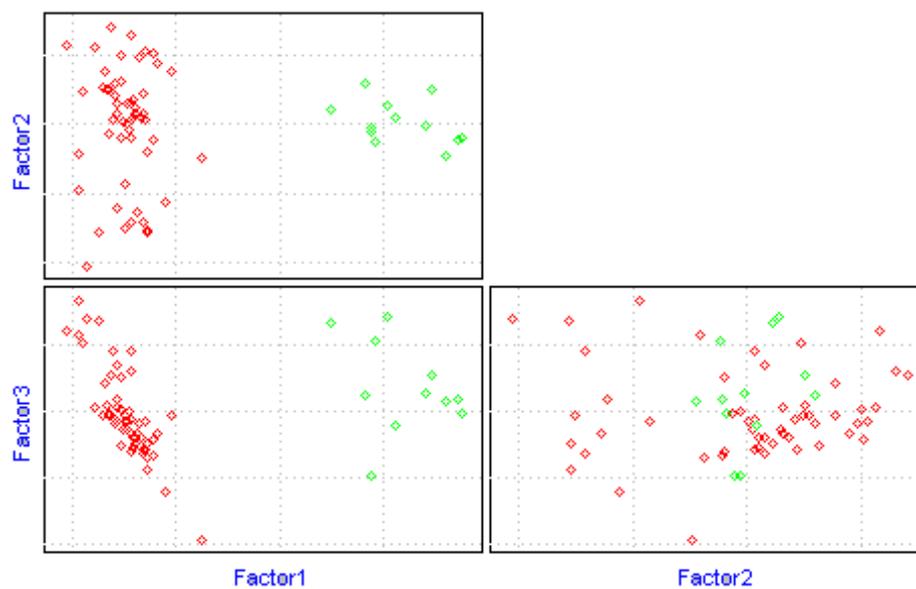


Figura 16 - Gráfico de *scores* de PCA de espectros FTIR (4000 a 600 cm^{-1}) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp.. Amostras em verde: cepas cujos caldos apresentaram maior remoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.

Segundo a figura, nos gráficos de *scores* da PC1 *versus* PC2 e PC3 *versus* PC1, é clara a formação de grupos distintos, havendo maior aglomeração de amostras no gráfico PC3 *versus* PC2. Isto demonstra que a componente principal PC1 discrimina dois grupamentos. Um desses grupos, localizado na porção positiva da PC1 (amostras em verde) é formado pelas amostras *A. niger* CMMI 02, *A. niger* USP 9, *A. niger* CMMI 01 e *A. niger* USP 898, que são as mesmas que apresentaram qualitativamente a maior remoção de cor em caldo de pó-de-fumo.

Situação diferente pode ser observada no gráfico de *scores* das componentes PC2 *versus* PC3. Neste caso, as amostras encontram-se sobrepostas e dispersas, sem possibilidade de estabelecimento de relação entre as mesmas.

De acordo com o gráfico de resíduos mostrado pela figura 17, três amostras são consideradas anômalas, sendo elas associadas a ambos os grupos. Entretanto, estas mesmas amostras não apresentam elevados níveis de resíduo, sendo desnecessária a sua remoção do conjunto.

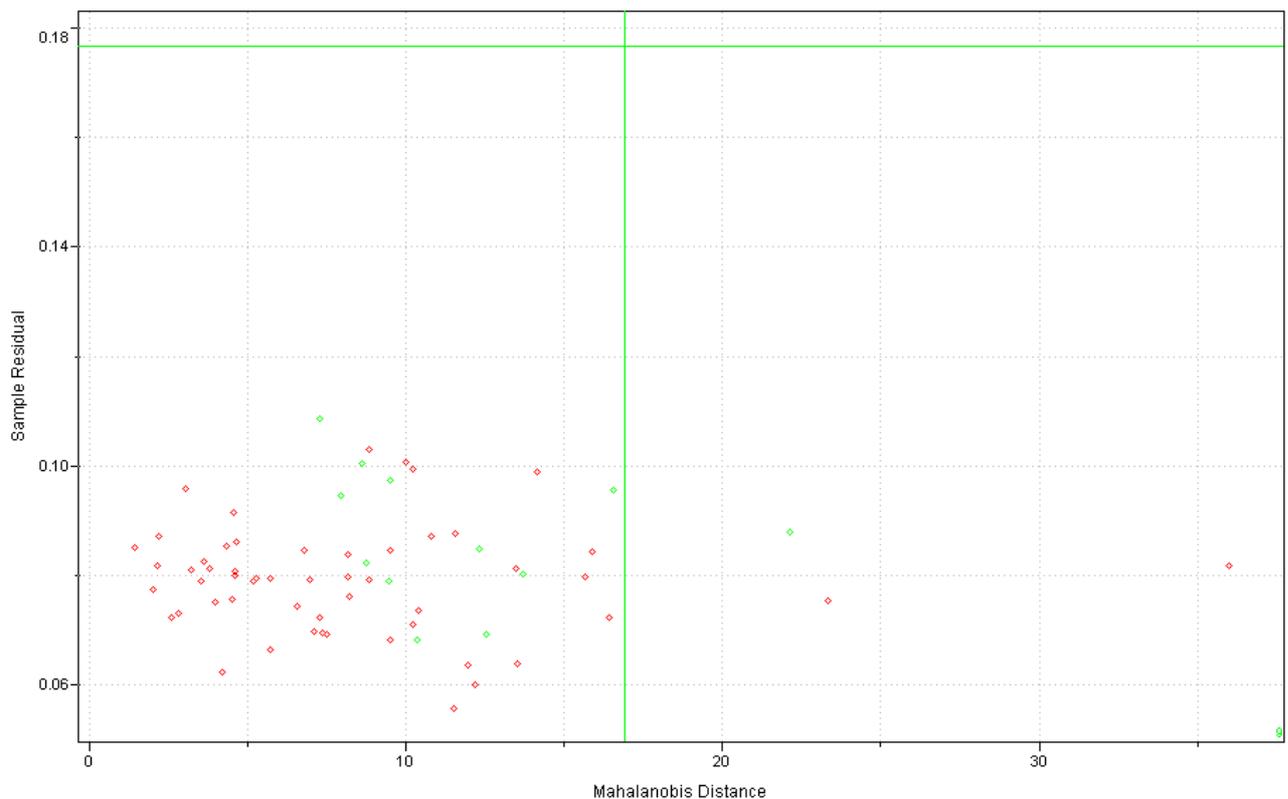


Figura 17 - Gráfico de amostras anômalas de espectros FTIR (4000 a 600 cm^{-1}) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp.. Amostras em verde: cepas com maior emoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.

A aplicação da PCA a diferentes faixas do espectro de infravermelho que compreendem a região de 2000 a 1400 cm^{-1} indicou a formação dos mesmos dois grupos foi identificada anteriormente pela figura 16, sendo que para algumas faixas, a separação entre os grupos foi apresentada de maneira mais intensa.

Considerando a faixa mais restrita de 1700 a 1400 cm^{-1} , o gráfico de *scores* mostra igualmente a formação de grupos associado novamente às cepas *A. niger* CMMI 02, *A. niger* USP 9, *A. niger* CMMI 01 e *A. niger* CMMI 03. A Figura 18 mostra os espectros relacionados a caldo de pó-de-fumo indicando a região 1700 a 1400 cm^{-1} .

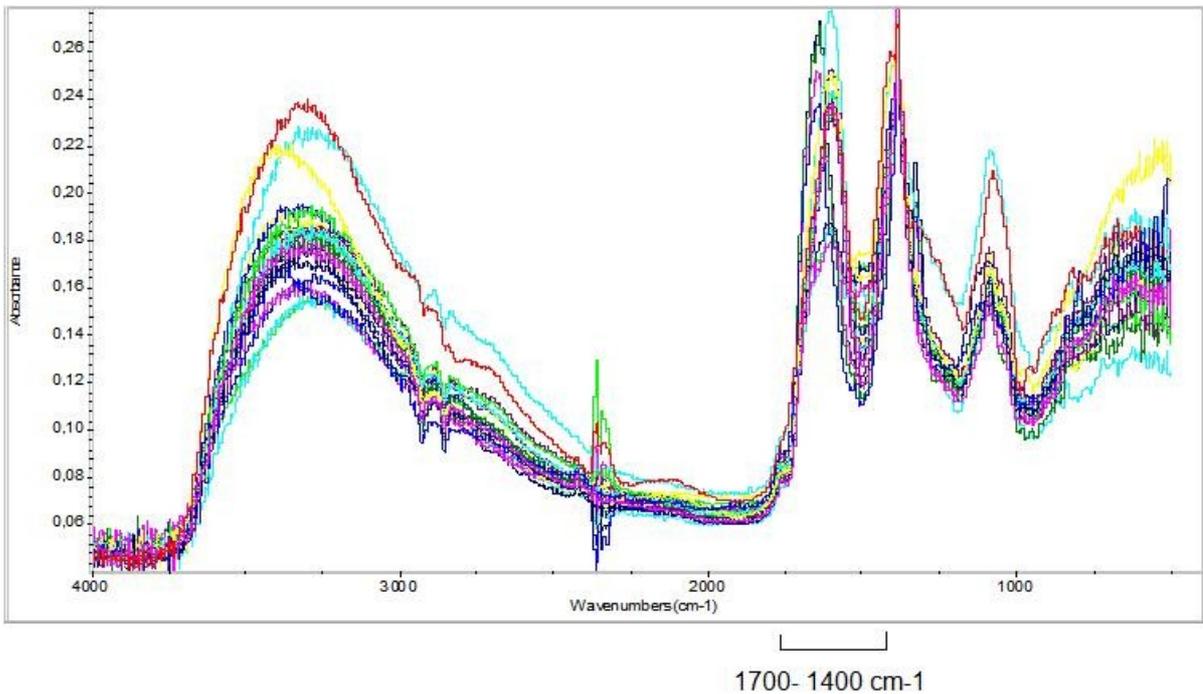


Figura 18 – Espectros FTIR para as amostras de caldo de pó-de-fumo analisadas após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp. e caldo sem inoculação (em vermelho).

A Figura 19 mostra a formação destes grupos. As componentes PC1, PC2 e PC3 acumularam juntas 98,30% de toda informação espectral das amostras, sendo 64,63% desta informação descrita apenas pela primeira componente.

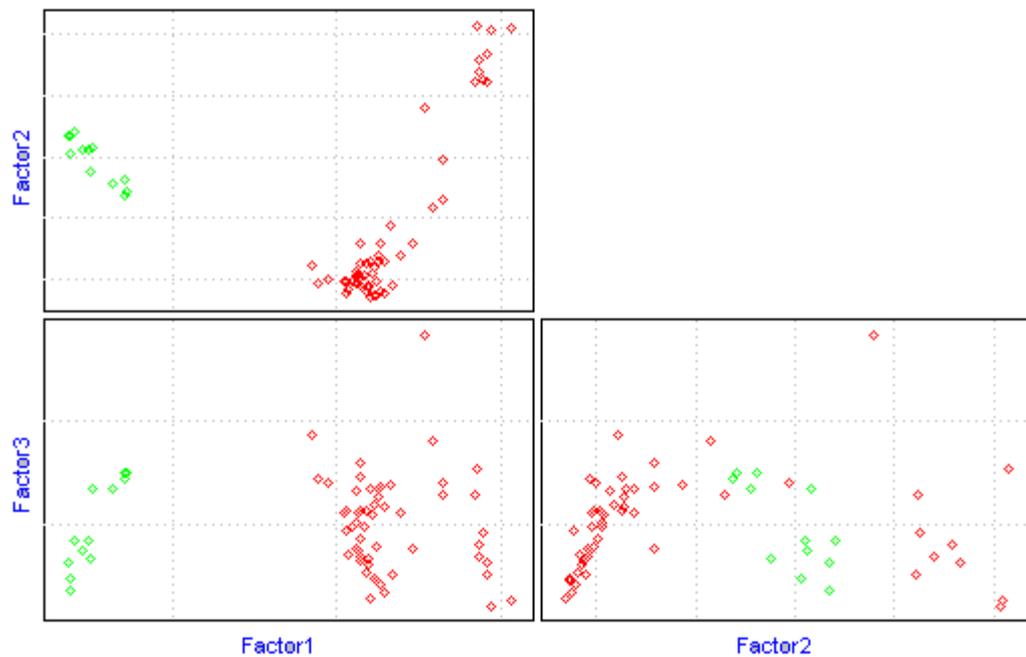


Figura 19 - Gráfico de scores de PCA de espectros FTIR (1700 a 1400 cm^{-1}) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp.. Amostras em verde: cepas com maior remoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.

Adicionalmente em PC1 *versus* PC2 se verifica a presença de um novo grupo composto por algumas das amostras formadoras de halo de pigmentação (*A. terreus* USP1, *A. ochraceus* USP 186, *A. ochraceus* USP 169, *A. carneus* CMMI 01 e *A. terreus* CMMI 233-3). Este novo grupamento está localizado na porção positiva da componente PC1 e PC2.

Pela componente PC1 *versus* PC2 verifica-se a formação de grupos principalmente devido à componente PC1, mas pela PC2 também é possível verificar a tendência de formação de grupamentos distintos. Verifica-se que os scores negativos estão associados ao grupo de maior redução de cor em caldo de pó-de-fumo, ou maior bioissorção. Já em PC1 *versus* PC3, a formação dos grupos se dá unicamente pela PC1, sendo um dos grupos consideravelmente disperso com alguma sobreposição. Em PC3 *versus* PC2 não há nenhuma formação de grupamento aparente, com todas as amostras razoavelmente dispersas.

Pelos *loadings* das amostras associadas a estas componentes principais, constata-se que os *loadings* da PC1 são direcionados negativamente pelos comprimentos de onda na faixa de 830 a 1200 cm^{-1} , 1350 a 1610 cm^{-1} e novamente em 2370 a 3400 cm^{-1} . Isto mostra que as faixas de comprimento de onda na porção positiva de PC1 foram as que mais contribuíram para a formação dos grupamentos visualizados na figura anterior.

Para PC1 versus PC3, os *loadings* de PC1 direcionam-se negativamente na faixa de 640 a 1300 cm^{-1} e 1400 a 1600 cm^{-1} . A porção positiva da faixa de comprimento de onda trabalhada é que contribui para a discriminação dos grupos presentes na componente PC1 versus PC3.

Foram identificadas 9 amostras anômalas para esta faixa analisada, das quais nenhuma apresentou elevado índice de resíduo não sendo necessária sua remoção do conjunto (Figura 20).

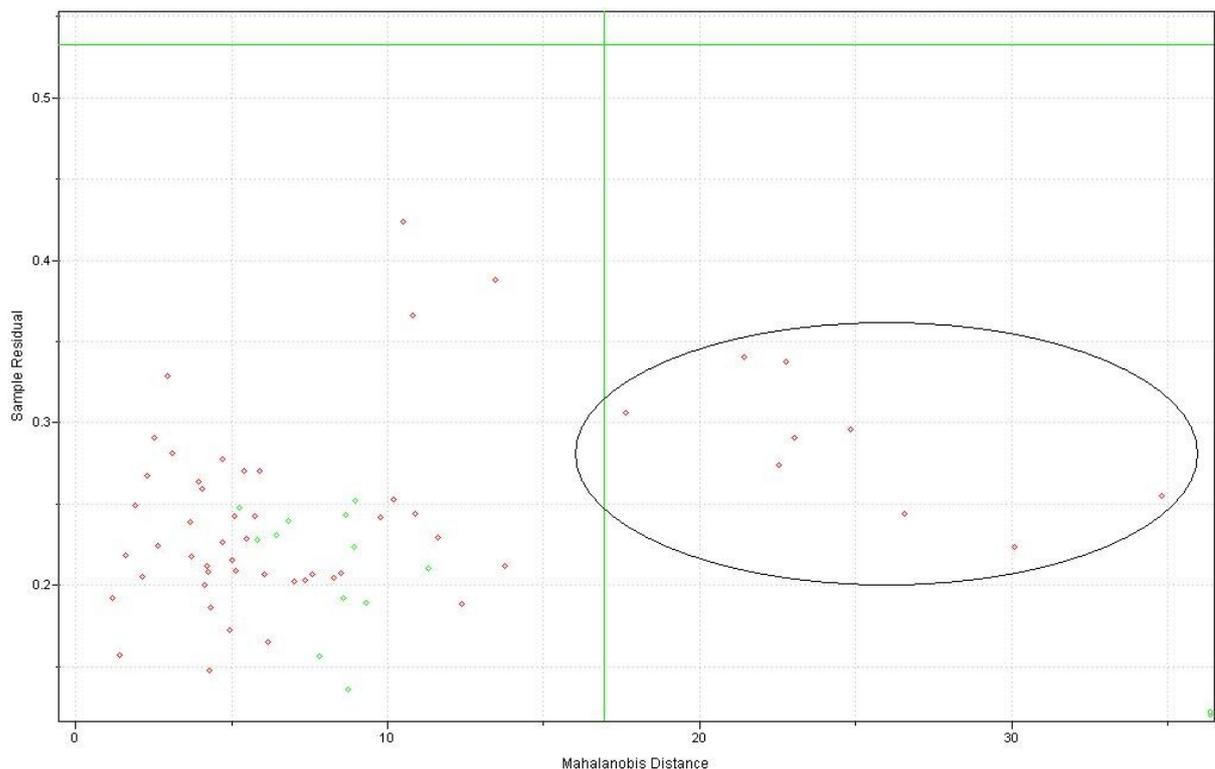


Figura 20 – Gráfico de amostras anômalas de espectros FTIR (1700 a 1400 cm^{-1}) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp.. Amostras em verde: cepas com maior emoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.

Enquanto que para o caldo, a PCA identificou grande distinção entre grupamentos, para a biomassa desenvolvida no caldo de 192 horas, esta separação ocorreu de maneira mais discreta. A figura 21 mostra o gráfico de *scores* relacionado à toda faixa de comprimento de onda (4000 a 600 cm^{-1}).

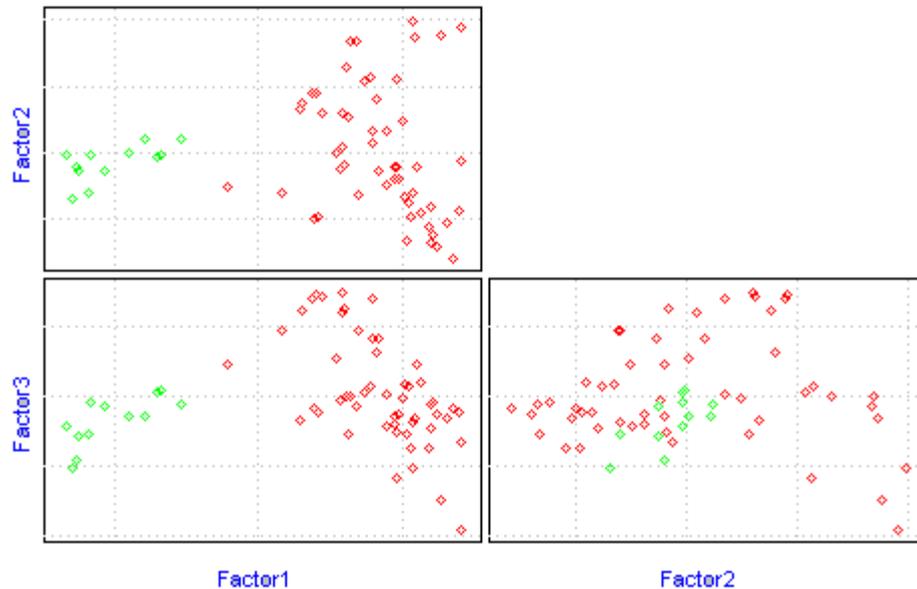


Figura 21 - Gráfico de *scores* de PCA espectros FTIR (4000 a 600 cm^{-1}) de biomassa de cepas de *Aspergillus* sp. após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp.. Amostras em verde: cepas com maior emoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.

A máxima separação é observada nas primeiras componentes (PC1, PC2 e PC3) que descrevem 81,07% dos dados. Apesar de algumas amostras serem consideradas anômalas, devido seu baixo índice de resíduo, elas não foram removidas do conjunto.

A faixa mais restrita analisada que apresentou melhores índices de separação entre grupamentos foi 1800 a 1500 cm^{-1} . A Figura 22 mostra os espectros de FTIR para as amostras de biomassa cultivadas em caldo de pó-de-fumo durante 192 horas, com identificação da região de 1800 a 1500 cm^{-1} como a que apresenta a maior diferenciação entre grupos pela PCA.

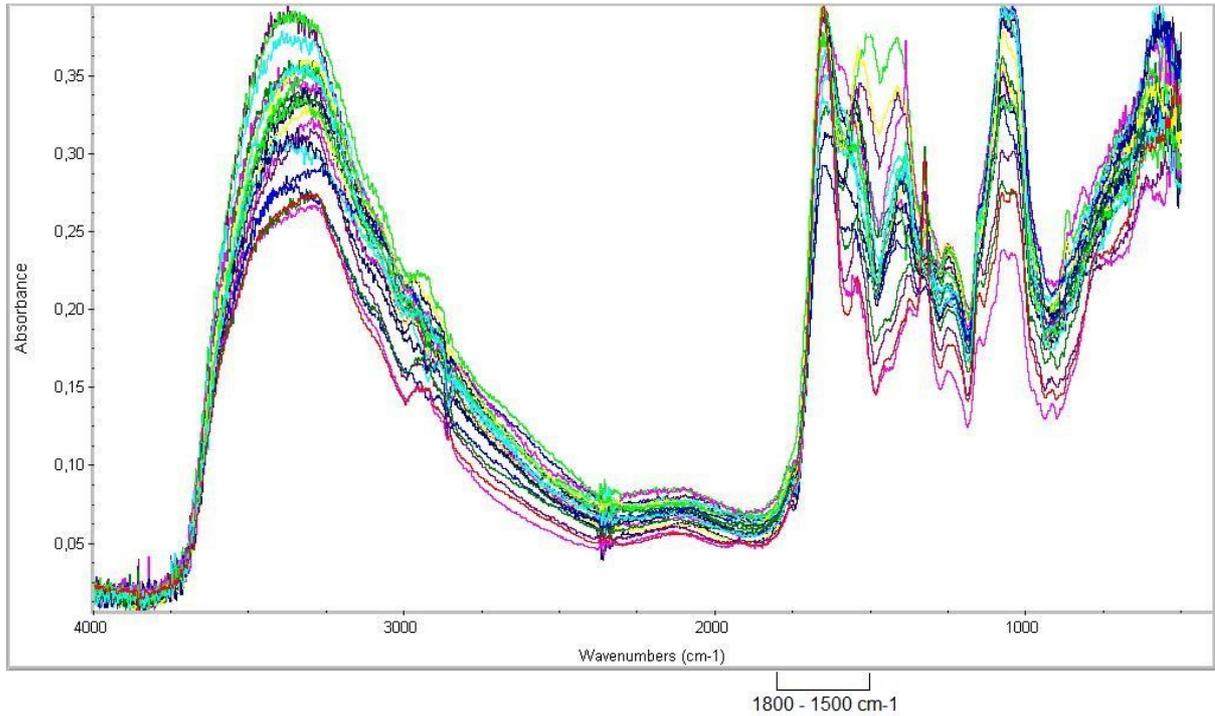


Figura 22 – Espectros de FTIR para as amostras de biomassa de cepas de *Aspergillus* sp. após 192 horas de cultivo com o caldo de pó-de-fumo.

A Figura 23 demonstra o gráfico de *scores* para as primeiras componentes relacionados a esta faixa.

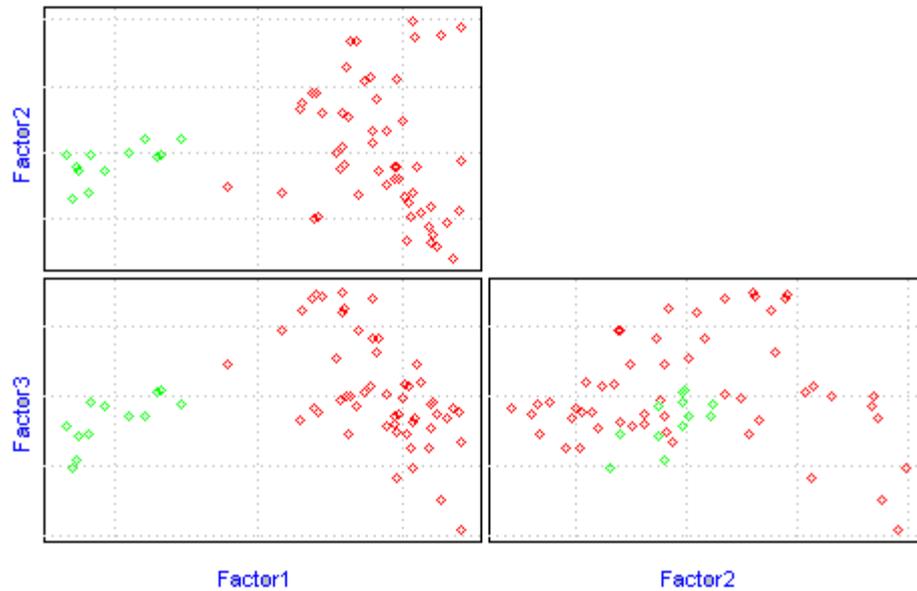


Figura 23 - Gráfico de *scores* de PCA de espectros FTIR (1800 a 1500 cm^{-1}) de biomassa de cepas de *Aspergillus* sp. após 192 horas de cultivo em caldo à base de extrato de pó-de-fumo. Amostras em verde: cepas com maior remoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.

A formação de grupos se dá pela PC1 *versus* PC2 e PC3 *versus* PC1, enquanto que na PC2 *versus* PC3, as amostras encontram-se dispersas com algumas sobreposições, impedindo a formação clara de grupos. 97,55% dos dados podem ser descritos por estas primeiras componentes principais, dos quais 71,52% pela PC1.

Segundo a Figura 24, amostras anômalas foram também encontradas nesta faixa analisada, mas como o índice de resíduos para estas amostras também foi baixo, não houve necessidade de removê-los do conjunto de dados.

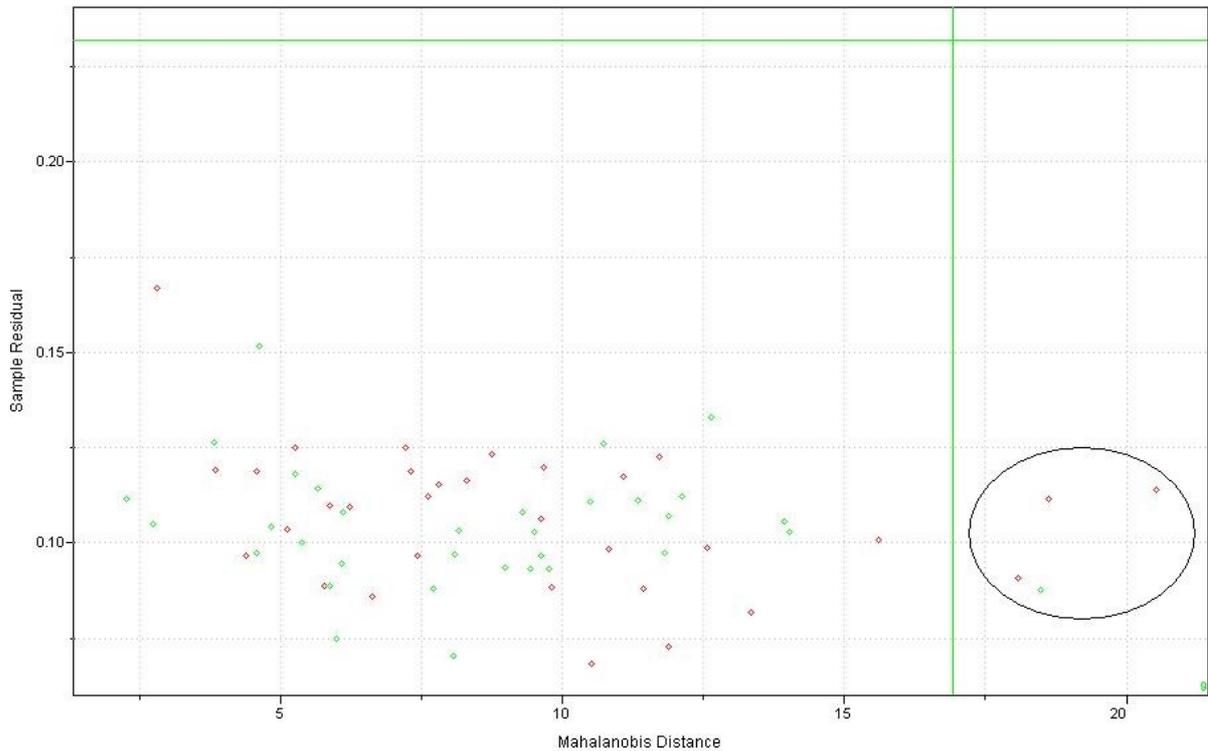


Figura 24 – Gráfico de amostras anômalas de espectros FTIR (1800 a 1500 cm^{-1}) de biomassa de cepas de *Aspergillus* sp. após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp.. Amostras em verde: cepas com maior emoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.

A HCA mostrou a distinção entre os dois principais grupos já verificados pela PCA quando observado o caldo após 192 horas de contato com a biomassa. Quando analisamos toda a região de absorção de infravermelho (4000 a 600 cm^{-1}), o dendrograma obtido mostra a formação de dois grupos com similaridade próxima de 0,300. Um deles está relacionado a amostras de maior bioabsorção, com índice de similaridade de 0,585, enquanto o outro grupo apresenta muitas extensões sem aparente tendência à formação de grupamentos em função das diferenças em termos de absorção pelas amostras.

No dendrograma da Figura 25, pode-se verificar também a tendência à formação de grupos quando a região de espectral de análise é restringida para 1700 a 1400 cm^{-1} .

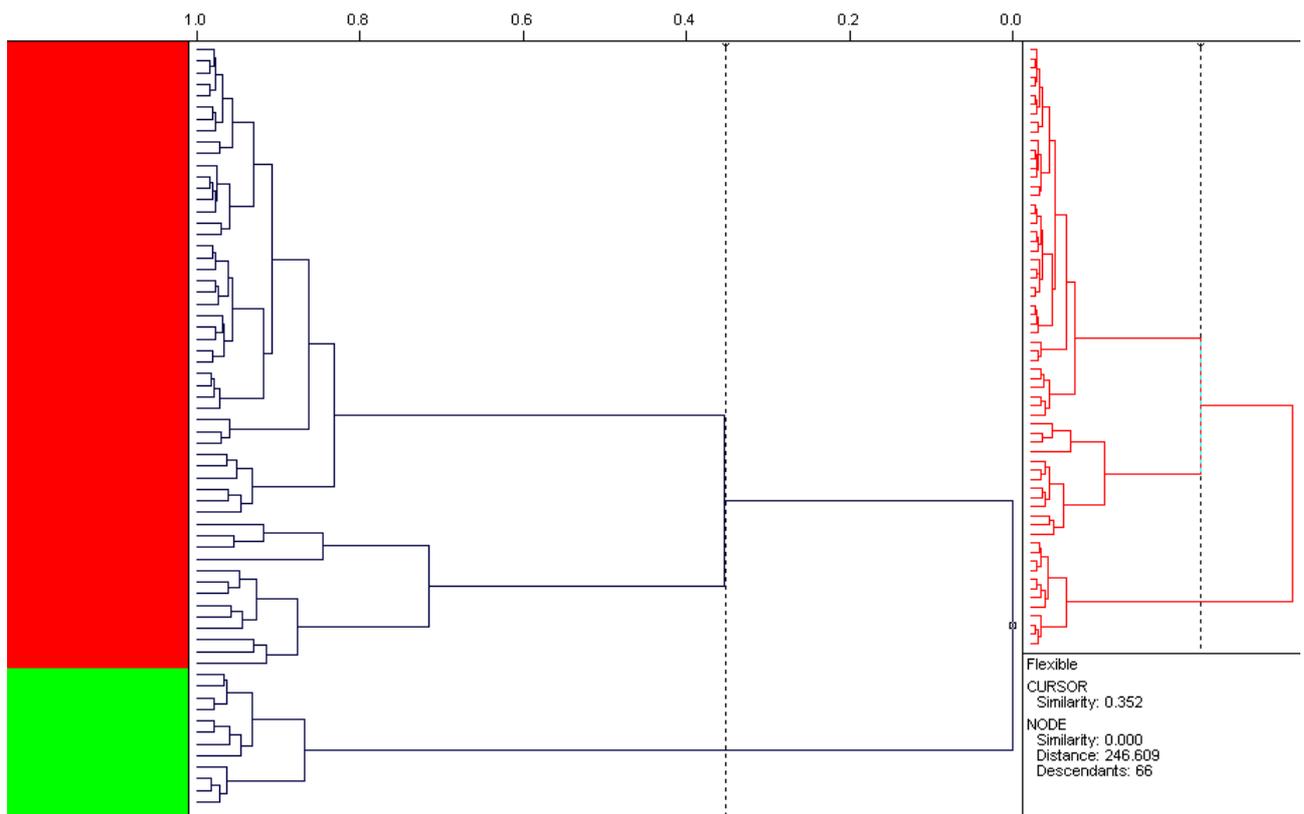


Figura 25 - Dendrograma de espectros FTIR (1700 a 1400 cm^{-1}) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp. . Amostras em verde: cepas com maior remoção qualitativa de cor. Amostras em vermelho: demais cepas.

Na HCA, há dois grupos distintos que possuem índice de similaridade de 0,350. O maior grupo contém 54 amostras enquanto que o menor é formado por 12 membros, todos associados às amostras que apresentaram maiores reduções de cor. A similaridade entre os membros deste último grupo é de 0,867, superior àquela encontrada quando a região de análise incluía toda a região do infravermelho (0,585). Isto evidencia que as possíveis diferenciações químicas relacionadas à composição final de pó-de-fumo submetidos à biossorção por diferentes amostras de *Aspergillus* sp. estão localizadas na região de 1700-1400 cm^{-1} .

A HCA na região de 4000 a 600 cm^{-1} para a biomassa demonstra novamente a formação de dois grupos principais, sendo a similaridade entre eles menor que 0,100. Entretanto, quando se considera a faixa de comprimento de onda (1800-1500

cm^{-1}), a similaridade entre estes dois grupamentos aumenta até próximo de 0,500 (Figura 26).

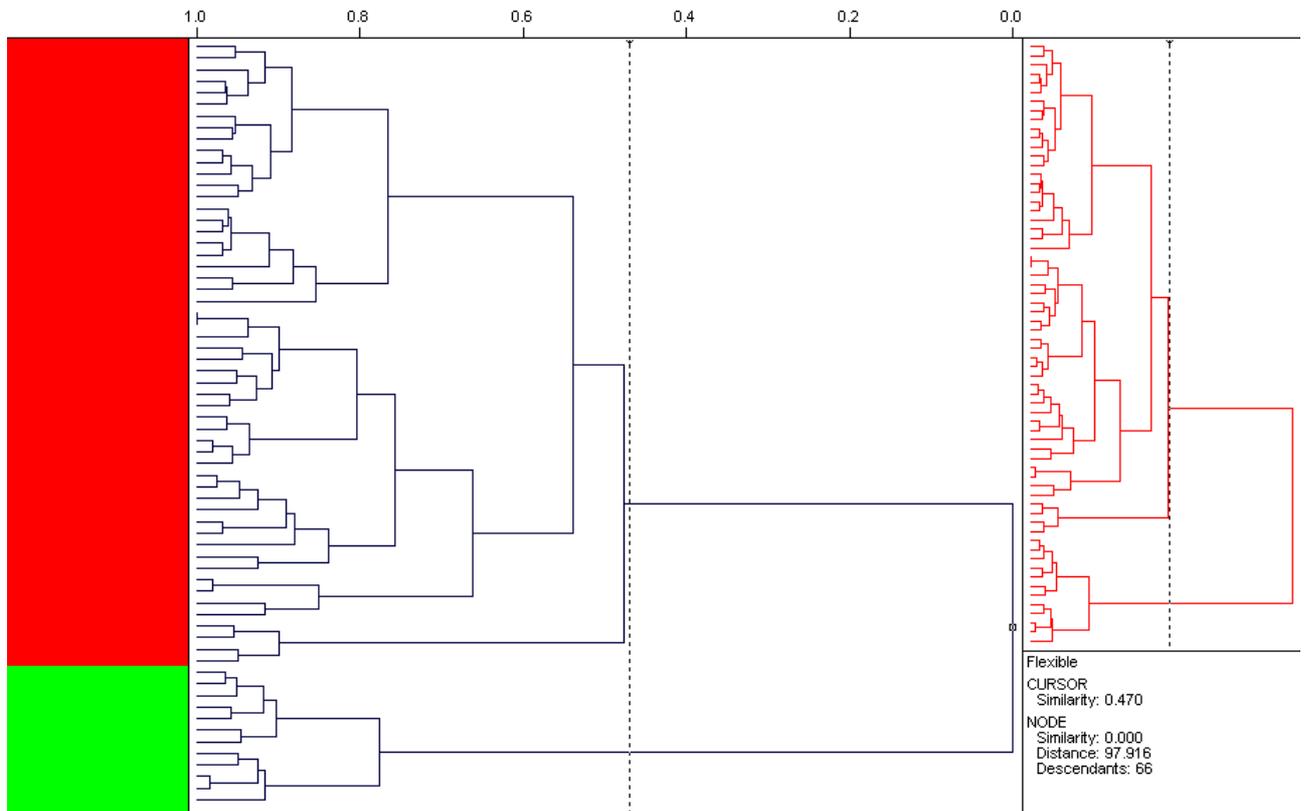


Figura 26 - Dendrograma de espectros FTIR ($1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) de biomassa de cepas de *Aspergillus* sp. utilizadas para bioissorção de pigmentos de caldo de pó-de-fumo. Amostras em verde: cepas com maior remoção qualitativa de cor. Amostras em vermelho: demais cepas.

A região que compreende a faixa de comprimento de onda de $1700\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$, também levou à formação de grupos, entretanto diferentes daqueles observados anteriormente pela PCA.

A produção de biomassa bem como a remoção qualitativa de cor do caldo de pó-de-fumo serviram como critérios de seleção da amostra de *Aspergillus* sp. para os ensaios de bioissorção. Os resultados da remoção qualitativa e dos dados quantificados desta remoção (análise em infravermelho) conduziram à seleção da amostra de *Aspergillus* sp. mais adequada à produção de biomassa para os testes

finais de bioissorção, e com base nos resultados apresentados a amostra selecionada foi *Aspergillus niger* CMMI 02.

Para caracterização das amostras fúngicas em virtude de suas diferenças químicas quanto ao seu comportamento em meio contendo caldo de pó-de-fumo, procedeu-se inicialmente com análise de infravermelho dos esporos. No entanto, as cepas de *Aspergillus fumigatus* não forneceram quantidades mínimas necessárias para a padronização da técnica de análise. Assim, conduziu-se a avaliação através de micélio fúngico na forma de *pellets* produzidos em caldo, com agitação, tempo e temperaturas controladas.

5.5 Ensaio de adsorção de pigmentos do extrato de pó-de-fumo

A Figura 27 demonstra a capacidade de absorção em termos de diferentes dosagens de biomassa macerada. Observa-se que a maior bsadsorção de pigmentos esta associada ao tratamento da biomassa com hipoclorito de sódio devido a sua menor absorção na região ultravioleta (350 - 700 nm). A curva de varredura para esta faixa referente ao efluente bruto pode ser observada no Anexo B.

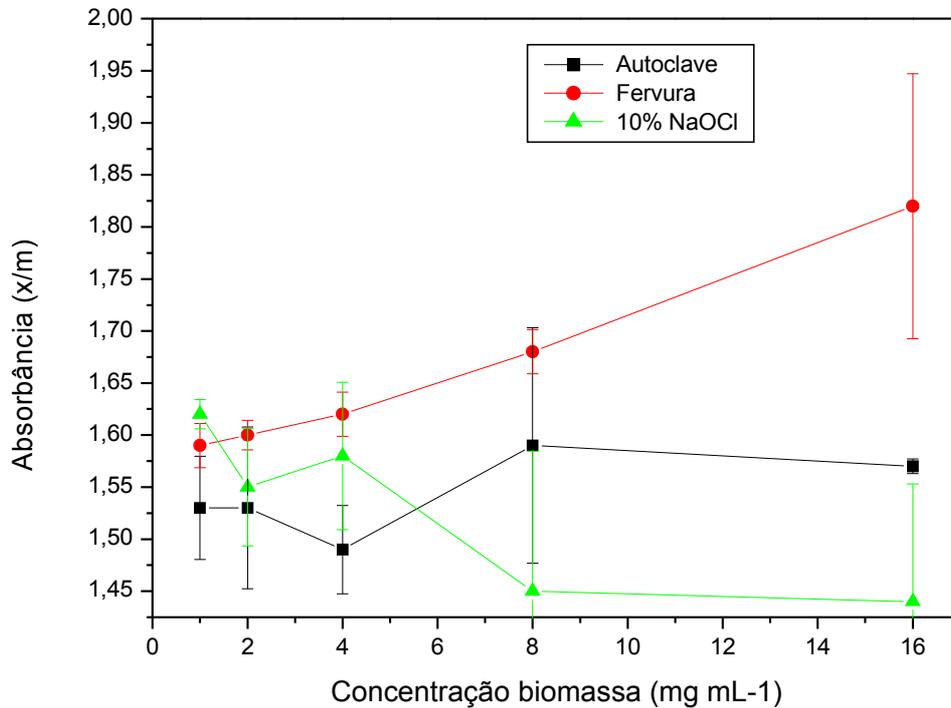


Figura 27 - Absorbância residual de pigmentos de extrato de pó-de-fumo após 8 h de contato com biomassa de *Aspergillus niger* CMMI 02 inativada por autoclavagem, fervura e hipoclorito de sódio avaliada em 355 nm.

Com a inativação pela autoclavagem, a maior adsorção de pigmentos foi verificada na concentração de biomassa de 4 mg mL⁻¹, enquanto que para a inativação química a melhor taxa de adsorção observada foi verificada quando a dose de biomassa foi de 16 mg mL⁻¹. A menor absorbância na região de 700 a 320 nm foi observada quando a dose de biomassa empregada foi de 16 mg mL⁻¹.

Kappor e Viraraghavan (1998) demonstraram que diversos processos físicos e químicos podem aumentar a capacidade de adsorção da biomassa e estes tratamentos podem ser por meio de bases, além do processo de autoclavagem e fervura. Este aumento da capacidade está associado ao aumento da área superficial com formação de poros e reentrâncias, além de exposição de sítios adsorptivos que favorecem o processo de adsorção (CHAVES et al, 2007). A autoclavagem causa

perturbação da estrutura fúngica, levando a um aumento da porosidade (FU; VARARAGHAVAN, 2002), assim como o emprego do processo de fervura.

Teoricamente com o aumento da concentração da biomassa, a taxa de adsorção deveria ter aumentado devido à maior disponibilidade de sítios de adsorção disponíveis, conforme observado por Khalaf (2008) durante estudos de adsorção de corante. Este comportamento foi observado no tratamento com NaOCl, cuja maior adsorção está atribuída ao maior número de sítios disponíveis à adsorção pela maior concentração de biomassa.

Nos demais tratamentos a maior absorvância não foi atribuída à maior concentração de biomassa, e isto pode ser devido ao estabelecimento de um equilíbrio entre os pigmentos e a biomassa. Os pigmentos não se ligam aos sítios ativos de adsorção e permanecem em solução (KHALAF, 2008).

Segundo Kappor e Viraraghavan (1995), em geral os tratamentos básicos apresentam-se mais eficientes em processos de inativação da biomassa para aumento da capacidade de adsorção. Isto foi confirmado de acordo com os resultados neste trabalho no ensaio de biossorção de pigmentos presentes em efluentes de fumageira.

A inativação da biomassa pela fervura apresentou comportamento linear, indicando sua direta interação entre os parâmetros. Neste caso, à medida que aumentou a concentração de biomassa, diminuiu-se igualmente a taxa de adsorção, verificada pelos altos valores de absorvância.

6. CONCLUSÕES

Verificou-se que as espécies de *Aspergillus* estudadas apresentam comportamentos diferenciais frente ao meio extrato de fumo, sendo as amostras *A. niger* as mais adaptadas às condições nutricionais fornecidas pelo pó de fumo. Observou-se a formação de um halo de pigmentação em torno do micélio durante a fase de crescimento para algumas amostras, comportamento que foi associado a possíveis mecanismos de biodegradação.

O estudo de crescimento do halo indicou que seu surgimento se dá proporcionalmente ao micélio, além de serem identificadas diferenças estruturais químicas em componentes do halo e do meio utilizado para o crescimento fúngico. O halo de descoloração apresentou similaridade com o meio, sendo considerado semelhante quando avaliado por técnicas multivariadas.

Através do crescimento micelial radial e pela produção de biomassa, a amostra selecionada para o ensaio de biossorção foi a *A. niger* CMMI 02. Para a produção de biomassa da amostra selecionada foi utilizada a fermentação submersa agitada a 30°C.

O ensaio de produção de biomassa demonstrou qualitativamente a redução da cor para o meio líquido formado pelo caldo preparado de fumo. Estes resultados estimularam o emprego da biomassa na remoção de pigmentos presentes em efluente de indústria fumageira. A análise multivariada permitiu a comprovação de diferenças existentes entre aquelas amostras que apresentaram taxas de adsorção distintas durante a fase de fermentação.

O processo de inativação química pelo uso de hipoclorito de sódio 10% apresentou os melhores resultados em termos de biorremediação do efluente de empresa processadora de tabaco após contato de 8 horas sob agitação em temperatura ambiente.

A melhor condição para a produção de biomassa de *Aspergillus niger* CMMI 02 se estabeleceu pela fermentação submersa agitada a 30°C, com lavagem abundante dos *pellets* em água destilada e com conseqüente esgotamento endógeno por 48 horas. Para o condicionamento desta biomassa, ela deve

inativada com NaOCl 10% seca e macerada e adicionada na dose de 16 mg mL^{-1} de efluente sob agitação e temperatura ambiente.

Houve redução da adsorção de efluente submetido ao contato com biomassa inativada. Desta forma, este trabalho demonstrou algumas espécies de *Aspergillus* sp. capazes de utilizar as fontes nutricionais presentes no meio extrato de fumo para seu desenvolvimento, evidenciando uma boa capacidade de adaptação ao qual foram submetidas.

O seu emprego como bioproceto pode ser somado ao tratamento de efluentes de indústrias fumageiras que enfrentam problemas na reutilização de seus resíduos líquidos, atribuídos a sua coloração. A biomassa inativada na forma de pó poderia ser adicionada anteriormente ao processo de tratamento para minimizar a carga orgânica do efluente, ou mesmo como tratamento terciário, no sentido de promover uma remoção complementar dos pigmentos ainda presentes no efluente.

7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Devido à grande importância ambiental atribuída ao emprego de técnicas de biorremediação, este trabalho pode ser visto como uma alternativa potencial de tratamento de efluentes, pois atende tanto as necessidades da indústria de processamento de tabaco como aos preceitos ambientais de conservação do meio ambiente.

Após a identificação das cepas de *Aspergillus* sp. mais adaptadas às condições nutricionais pré-estabelecidas pelo pó-de-fumo, procura-se entender como ocorrem as mudanças estruturais capazes de originar um halo de pigmentação ao mesmo tempo em que promove uma redução de coloração em meio ágar pó-de-fumo, da mesma forma que busca-se respostas para a diferenciação estrutural de cepas capazes de bioadsorver ou adsorver os pigmentos presentes em caldo de pó-de-fumo.

Testar a aplicação do bioadsorvente à base de *Aspergillus niger* CMMI 02 na forma de um bioproduto, observando as melhores condições de crescimento e inativação, é uma proposta de trabalho futuro que representam uma alternativa para a biorremediação do efluente final de indústrias de processamento de tabaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALCANTARA JR., P. *Espectroscopia molecular: curso de física moderna II*. Universidade Federal do Pará, 2002, p.1-5.
2. AMINI, M. et al. Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 154, 694–702, 2008.
3. ALEXOPOULOS, C. J. et al. *Introductory mycology*. United States of America: John Wiley & Sons, Inc., 1996, 865p.
4. AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu(II) ions from an aqueous solution. *Biore-source Technology*, v. 97, 1780-1787, 2006.
5. AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, v. 40, 997-1026, 2005.
6. BARBOSA, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Viçosa: UFV, 2007, 189p.
7. BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1767, 1073-1101, 2007.
8. BENIMELI, C.S et al. Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 61, 233-239, 2008.
9. BHAINSA, K.; D`SOUZA, S. F. Thorium biosorption by *Aspergillus fumigatus*, a filamentous fungal biomass. *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, 670-676, 2009.
10. BHALERAO, T. S.; PURANIK, P. R. Microbial degradation of monocrotophos by *Aspergillus oryzae*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 63, 503-508, 2009.
11. BIOLCHI, M. A. A cadeia produtiva do fumo. *Revista do Departamento de estudos Sócio-econômicos rurais- Deser*. Ano V, n. 5, 2005.
12. BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. v. 74, 63-67, 2000.
13. BLANQUEZ, P. et al, Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*, v.38, 2166-2172, 2004.

14. BRERETON, R. G. *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2003. 489p.
15. CARLOS et al. Remediação de rejeitos industriais empregando microorganismos. *In: Anais XV Jornada de Iniciação Científica – CETEM, 2007, Rio de Janeiro.*
16. CHAVES, K. O. et al. Cinética da adsorção de corante índico Carmim em biomassa fúngica morta de *Aspergillus niger* tratado alternadamente com soluções ácida e alcalina. *In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. João Pessoa, 2007.*
17. COLLA, L. M. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, 809-813, 2008.
18. CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, CIB. *Nova tecnologia limpa o meio ambiente de maneira natural*. Ano 2, N. 4. Junho 2004.
19. CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova*, v. 30, 481-487, 2007.
20. EVANS, G. M.; FURLONG, J. C. *Environmental biotechnology: theory and application*. England: John Wiley & Sons Ltd , 2002, 300p.
21. FANG, H. et al. Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 61, 294-303, 2008.
22. FERREIRA, M. M. .C. Multivariate QSAR. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, 742-753, 2002.
23. FERREIRA, M. M. .C et al. Seleção de variáveis em QSAR. *Química Nova*, v. 25, 439-448, 2002.
24. FLICKINGER, M. C.; DREW, S. W. *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. Canada: John Wiley & Sons, Inc., 1999, 2798p.
25. FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Removal of Congo Red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*. *Advances in Environmental Research*, v. 7, 239 - 247, 2002.

26. GADD, G. M. *Fungi in bioremediation*. New York: Cambridge University Press, British Mycology Society, 2001, 496p.
27. GAYLARDE, C. C. et al. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.34, 36-43, 2005.
28. GIGLIOTTI, G. et al., Composition changes of soil humus after massive application of urban waste compost: a comparison between FT-IR spectroscopy and humification parameters. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 55, 23–28, 1999.
29. GOSWAMI, S. et al. Biodegradation of α e β endosulfan by *Aspergillus sydoni*. *Chemosphere*, v. 75, 883-888, 2009.
30. GREENPEACE. Disponível em: <www.greenpeace.org>. Acesso em: 10 fevereiro 2009.
31. HOGG, S. *Essential Microbiology*. England: John Wiley & Song Ltd, 2005, 480p.
32. HUANG, W. E. Rapid characterization of microbial biodegradation pathways by FT-IR spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, v. 67, 273-280, 2006.
33. IWAMOTO, T; NASU, M. Current bioremediation practice and perspective: review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, 1-8, 2001.
34. JOHNSON, H. E. et al. High-throughput metabolic fingerprinting of legume silage fermentations via Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, 1583-1592, 2004.
35. JOO, H. S. et al, Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. *Environmental Pollution*, 156, 891-896, 2008.
36. KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption: An alternative treatment for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technology*, v. 53, 195-206, 1995.
37. KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 61, 221-227, 1997.
38. KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: effect of pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 63, 109-113, 1998.
39. KAPOOR, A. et al. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus*

- niger*. *Bioresource Technology*, v. 70, 95-104, 1999.
40. KHALAF, M. A. Biosorption of reactive dye from textile wastewater by non-viable biomass of *Aspergillus niger* and *Spirogyra* sp.. *Bioresource Technology*, v. 99, 6631-6634, 2008.
 41. LANFER-MARQUES, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, 227-242, 2003.
 42. MAQUELIN, K. et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, v. 51, 255-271, 2002.
 43. MASSOUD, A. H. et al. Microbial detoxification of metalaxyl in aquatic system. *Journal of Environmental Science*, v. 20, 262-267, 2008.
 44. MATHIALAGAN, T.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by fungal biomass. *Bioresource Technology*, v. 100 549-558, 2009.
 45. MAZAREVICA, G. et al. On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy. *Applied spectroscopy*, v. 58, 803-810, 2004.
 46. MEURER, E. J. *Fundamentos de química do solo*. 2. ed. Porto Alegre: Gênese, 2004. 290 p.
 47. MORAES, D. S. L ; JORDÃO, B.Q. Degradação dos recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, 370-374, 2002.
 48. MUKHOPADHAYAY, S. et al. Copper biosorption in a column of pretreated *Aspergillus niger* biomass. *Chemical Engineering Journal*, v. 144, 386-390, 2008.
 49. NAUMANN, D. *Infrared spectroscopy in microbiology*. In: Meyers, R.A. (ed.). *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000, 102-131.
 50. NETO, M. L. F.; FERREIRA, A. P. Perspectivas da sustentabilidade ambiental diante da contaminação química da água: desafios normativos. *Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente*, v.2, n.4, Seção 1, 2007.
 51. NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova*, v. 21, 467-469, 1998.

52. NGO-THI, N. A. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. *Journal of Molecular Structure*, v. 661-662, 371-380, 2003.
53. ORSINI, F. et al. FT-IR microspectroscopy for microbiological studies. *Journal of Microbiological Methods*, v. 42, 17-27, 2000.
54. PARREIRA, T. F. *Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariada*. 2003, 106f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de química, Campinas.
55. PARSHETTI, G. K. et al. Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Biosource Technology*, v. 96, 3638-3642, 2007.
56. PEREZ, J. E.; MEYER, R. T. *FTIR spectroscopy*. CIC Photonics. Disponível em: <http://www.irgas.com/ftir_spectroscopy.html>. Acesso em: 24 de março 2009.
57. PRICHARD, P. H. et al. *Bioremediation research in EPA: An overview of needs, directions and potentials*. HICKEY, R. F.; SMITH, G. (ed). *Biotechnology in industrial waste treatment and bioremediation*. Lewis Publishers: Boca Raton, 1996, 400p.
58. QUINTERO, J. C. et al. Bioremediation of HCH present in soil by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* in a slurry batch bioreactor. *International Biodeterioration & Biodegradation* v. 60, 319-326, 2007.
59. RAO, J. R.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass. *Bioresource Technology*, v. 85, 165-171, 2002.
60. REN, W.-X. et al. Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 167, 164-169, 2009.
61. SABIN, J. G. et al. Quimiometria e meio ambiente: Sua aplicação no desenvolvimento de metodologias limpas de análise aplicadas no controle da qualidade das águas para consumo humano. *In: Workshop Bacia Hidrográfica: Unidade de Gestão Ambiental*. Santa Cruz do Sul, 2003.
62. SEPLAG, Secretaria de planejamento e gestão. *Atlas Sócioeconômico do Rio Grande do Sul*. Disponível em: <<http://www.scp.rs.gov.br/atlas>>. Acesso em 19 fevereiro 2009.
63. SILVA, I. S. et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, 224-229, 2009.

64. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, SINDAG. Dados de mercado, 2007 e 2008. Disponível em: <www.sindag.com.br>. Acesso em: Outubro 2008.
65. Sindicato da Indústria do Fumo da Região Sul do Brasil, SINDITABACO. 2009. Disponível em: <www.siditabaco.com.br>. Acesso em: fevereiro 2009.
66. SOUZA CRUZ. Nosso negócio: processamento do fumo. Disponível em: <www.souzacruz.com.br>. Acesso em: novembro de 2009.
67. STREIT, N. M. et al. As clorofilas. *Ciencia Rural*, v. 35, 748-755, 2005.
68. TAVCAR, M. et al. Biodegradation of azo dye RO16 in different reactors by immobilized *Irpex lacteus*. *Acta Chimica Slovenica*, v. 53, 338-343, 2006.
69. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 718 p.
70. WCAS, West Coast Analytical Service. Disponível em <www.wcaslab.com/tech/tech2.htm>. Acesso em: 24 de março 2009.
71. YANG, G. et al. Effect of environment factors on dye decolorization by *P. sordida* ATCC90872 in an aerated reactor. *Process Biochemistry*, v.39, 1401-1405, 2004.

72. ANEXO A – Laudo de análise efluente bruto de elevatória



LAUDO DE ANÁLISE
REGISTRO 2572/2009-0
Página 1 de 1

CLIENTE

Joyce Cristina Gonçalves
Rua México, 83 – Santa Cruz do Sul – Rio Grande do Sul
Telefone: 51 9746-5080 / Fax: -
Contato: —



AMOSTRA

Tipo: Efluente bruto
Identificação: -
Local: BR 471 km 46,5 - Santa Cruz do Sul
Ponto de coleta: Elevatória
Responsável pela coleta: Central Analítica
Informações adicionais: -
Data e/ou hora da coleta: 13/07/2009 14h 30min
Data de entrada no laboratório: 13/07/2009

ANÁLISE(S)

	RESULTADO(S)		LIMITE(S)
Cálcio	522,0	mg L ⁻¹	-
Cor aparente	> 1000	uH	-
DBOs	6.669	mg L ⁻¹ (O ₂)	-
DQO	9.257	mg L ⁻¹	-
Fosfato	65,38	mg L ⁻¹	-
Magnésio	356,2	mg L ⁻¹	-
Nitrogênio orgânico	264,5	mg L ⁻¹	-
Nitrogênio total Kjeldahl	427,8	mg L ⁻¹	-
pH	7,3	-	-
Sólidos suspensos	2.143,3	mg L ⁻¹	-
Sólidos totais	19.672,5	mg L ⁻¹	-
Turbidez	830,0	uT	-

LEGENDAS:

NR – não realizado
VMP – valor máximo permitido
mg L⁻¹ – miligrama por litro
NMP – número mais provável
UFC – unidades formadoras de colônias

“Os resultados apresentados no presente laudo de análise têm significação restrita e se aplicam somente à amostra ensaiada. As informações referentes à amostragem são de responsabilidade do cliente, exceto quando a coleta é realizada pela Central Analítica.”
A reprodução do documento somente poderá ser realizada integralmente, sem nenhuma alteração.

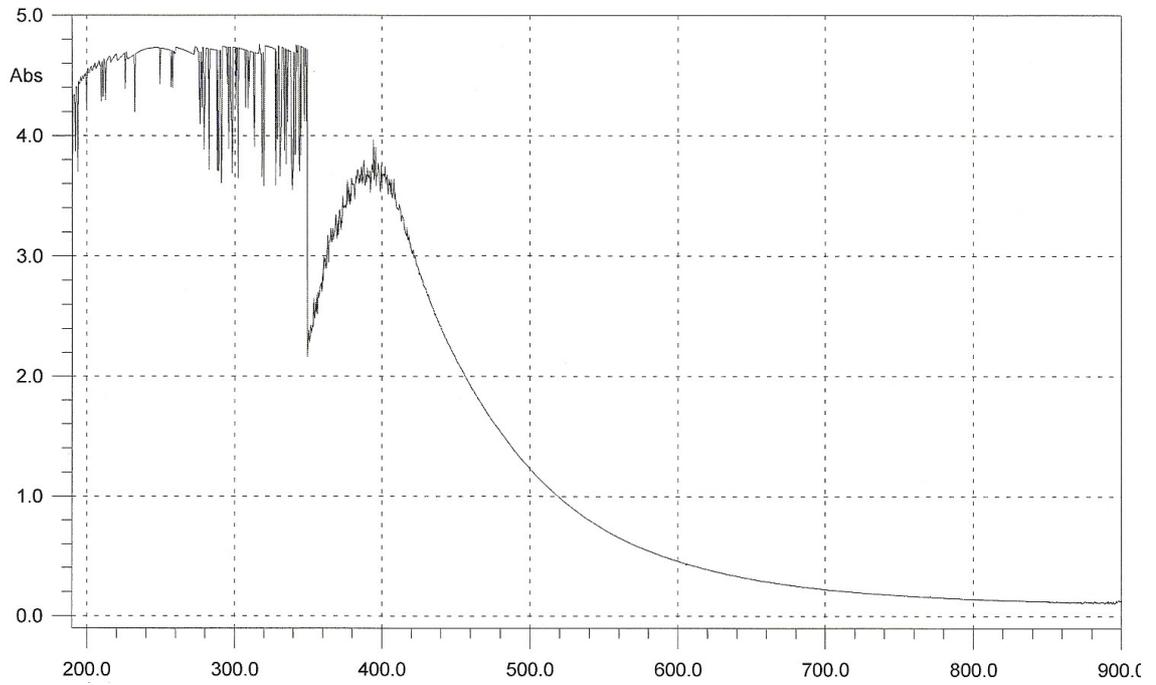
Santa Cruz do Sul (RS), 28 de julho de 2009.

Alcido Kirst

Responsável Técnico - CRQ-V 05100435

Cadastro na FEPAM como Laboratório de Análises Ambientais sob o certificado N° 17/2009-DL
Avenida Independência, 2293 – Bloco 11 – Santa Cruz do Sul – RS – CEP 96.815-900
Fone (0xx51) 3717-7500 Fax (0xx51) 3717-7530 www.unisc.br/centralanalitica central@unisc.br

ANEXO B – Curva de varredura na faixa de 200 a 900 nm para o efluente bruto (5%).



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)