

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL- UFRGS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL - UERGS

JULIANA FABRÍCIO TISCA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
RECURSOS HÍDRICOS DO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL
(BRASIL): DESCOLORAÇÃO DE CORANTES.

IMBÉ
2011

JULIANA FABRÍCIO TISCA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
RECURSOS HÍDRICOS DO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL
(BRASIL): DESCOLORAÇÃO DE CORANTES.

Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão de curso de graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Orientadora: Prof^a Dr^a. Patricia Valente

IMBÉ

2011

Aos examinadores,

Este trabalho está formatado segundo as normas de GRANDI, Cleci *et al.* **Orientações para elaboração e apresentação de trabalhos e relatórios acadêmicos.** Porto Alegre: UERGS, 2010. 95 p. O qual segue as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas . ABNT.

T598p Tisca, Juliana Fabrício

Potencial biotecnológico de leveduras isoladas de recursos hídricos do litoral norte do Rio Grande do Sul (Brasil): descoloração de corante. / Juliana Fabrício Tisca. - - 2011.

57 f.

Orientadora: Patrícia Valente.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Biociências, Imbé/ Cidreira, BR- RS, 2011.

1. Leveduras. 2. Descoloração. 3. Cristal de violeta. 4. Biorremediação. 5. Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí. I. Valente, Patrícia, orient. II. Título

Adaptado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha cartográfica da UFRGS com os dados fornecidos pela autora.

JULIANA FABRÍCIO TISCA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
RECURSOS HÍDRICOS DO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL:
DESCOLORAÇÃO DE CORANTES.

Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão de curso de graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Aprovado em 07/ 07/ 2011

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a. Melissa Fontes Landell

Msc. Luciana Senter

Prof^o Dr^o Eduardo Barboza
Coordenador da atividade
Trabalho de Conclusão II – CBM

Dedico este trabalho aos incentivadores desse novo projeto de vida: meus pais e à
minha fiel companheira, Nala.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem me apoiado incondicionalmente nesse sonho, entendido e principalmente dedicado atenção, carinho, amor e paciência nessa jornada acadêmica e aos quais dedico este trabalho e todas as conquistas realizadas ao longo desses quatro anos. Aos idealizadores e fundadores desse curso, Professor Damiani Pinto e Professora Norma Würdig, que além da contribuição para o desenvolvimento do litoral norte, consolidaram e ainda consolidarão muitos dos sonhos dos aspirantes à biólogos, proporcionando momentos inesquecíveis aos estudantes.

Aos meus queridos colegas, que ao longo desses quatro anos tornaram-se muito mais do que meros colegas e sim uma grande e verdadeira família. Pessoas essas, que vivi problemas, chuvas, ciclones, dias sem dormir, festas, tardes, noites e manhãs de conversas regadas a chimarrão. A todos os funcionários do Ceclimar que de alguma forma contribuíram para a formação acadêmica de todos os estudantes, em especial, à Marcinha pelo carinho e solucionamento de problemas; ao Ângelo e à Stellinha pelo acolhimento carinhoso e auxílio no mundo dos livros; à Ivone, pela amizade e carinho; ao seu Oswaldo pela sabedoria inigualável; ao seu Nunes e ao Cláudio, pelo humor incomparável; à Neusa, Nelida, Ruth, Rejane e Ângela pela amizade e simpatia e à Cachinele, pela compreensão e auxílio.

A todos os professores que dedicaram seus dias rumo ao litoral para ministrar excelentes aulas, em especial, à Professora, amiga e minha querida orientadora Patrícia Valente, que me acolheu, me ensinou e me orientou ao longo dessa estressante etapa, sempre com seu positivismo, seu sorriso e simpatia incomparável. À doutoranda e amiga Luciana Senter, que além toda sua dedicação, foi uma pessoa muito especial em minha jornada. Ao mestrando Rodolfo Ribas pela ajuda imprescindível neste trabalho, pelas conversas, companhia, carinho, amizade, pelos cálculos de diluições e pela curva padrão. À professora Maria Lúcia que sempre me acolheu junto ao seu laboratório. A todos do laboratório de micologia, em especial à Márcia, à Jandora, à Sandra, à Priscila, à Nicole, ao Diórgenes e ao Maurício. A minha banca examinadora. À UFRGS e ao Instituto de Biociências por terem proporcionado esse curso maravilhoso e de altíssima qualidade. Aos meus familiares que junto com meus pais foram a base de toda a minha formação, em

especial meus avós, Celau e Cecília, que me acolheram em sua casa nas idas e vindas à Porto Alegre. Enfim, obrigado a todos (as) que me ajudaram, compreenderam e conviveram comigo durante os quatro melhores anos da minha vida.

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e de toda arte”

Albert Einstein

RESUMO

A poluição do meio ambiente por efluentes industriais tem aumentado gradativamente nas últimas décadas, tornando-se um grave problema social e ambiental. As indústrias têxteis possuem importante representatividade no potencial de poluição, devido ao elevado uso de corantes e aditivos para sua produção industrial. Os problemas relacionados aos corantes envolvem recalcitrância, compostos com potencial carcinogênico e mutagênico, além de bioacumulação. Existem diversas formas de tratamento para efluentes têxteis, incluindo tratamento físico, químico e biológico. Estudos com biorremediação de corantes com microrganismos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos de bactérias, algas, fungos e inclusive leveduras, demonstram que a biorremediação para a descoloração de corantes pode ser uma tecnologia promissora. Este trabalho teve como principal objetivo verificar se alguma levedura isolada da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí (BHRT) possuía este potencial biotecnológico. Foram utilizados 69 isolados de leveduras da Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia- ICBS/UFRGS). As leveduras utilizadas são oriundas de alguns recursos hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí. Para o experimento de descoloração de corantes com leveduras utilizou-se os corantes vermelho de metila, fucsina ácida e cristal de violeta. Primeiramente os isolados foram inoculados em placas com meio Agar Sabouraud acrescido de 0,003% de corante. Como resultado desse experimento pôde-se observar halos de descoloração em sete isolados somente no corante cristal de violeta. Para verificar a taxa de descoloração de cada isolado testado em meio líquido foi utilizada a espectrofotometria, com o pico de absorvância de 585nm. Cada isolado foi inoculado em volume de 5mL em um Erlenmeyer contendo 50mL de caldo Sabouraud acrescido de 1µg/mL de corante cristal de violeta. Foram retiradas alíquotas diárias de cada isolado e feitas leituras diárias de absorvância. Com o final do experimento em meio líquido pôde-se verificar que todos os sete isolados que apresentaram potencial de descoloração em meio Agar também apresentaram potencial biotecnológico de descoloração em Caldo Sabouraud.

Palavras-chave: Cristal de violeta. Biorremediação. Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí.

ABSTRACT

The environmental pollution by industrial effluents has increased gradually in recent decades, becoming a serious social and environmental problem. Textile industries have major representation in the pollution potential due to the high use of colorants and additives for industrial production. The problems involve the recalcitrant dyes, compounds potentially carcinogenic and mutagenic, and bioaccumulation. There are several ways to treat textile effluents, including physical, chemical and biological treatments. Studies on bioremediation of dyes by microorganisms belonging to different taxonomic groups of bacteria, algae, fungi, including yeasts, show that the bioremediation for dye discoloration may be a promising technology. This study aimed to determine if any of the yeasts isolated from River Tramandaí Basin (BHRT) had this potential. We used 69 yeast isolates from the Culture Collection of the Mycology Laboratory (Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS / UFRGS). The yeasts are from some of the water resources from River Tramandaí Basin. For the experiment with yeast discoloration of dyes, methyl red, acid fuchsin and crystal violet were used. First, isolates were inoculated on Sabouraud agar plus 0.003% of dye. As a result of this experiment, halos of discoloration could be observed in only seven isolates in the crystal violet dye. To check the rate of discoloration of each isolate tested, it was used spectrophotometry, with peak absorbance of 585 nm. Each isolate was inoculated into 5 ml volume in an Erlenmeyer flask containing 50 ml of Sabouraud broth plus 1 µg/mL crystal violet. Daily aliquots of each isolate were taken and daily readings of absorbance were performed. With the end of the experiment in liquid medium, it could be verified that all seven isolates that showed potential for discoloration in Agar also had the biotechnological potential of discoloration in Sabouraud broth.

Key-words: Crystal Violet. Biorremediation. Tramandaí River Basin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Localização da BHRT no âmbito regional	27
Figura 2- Análise espectrofotométrica da amostra de um efluente de indústria têxtil comparada a um padrão definido.....	34
Figura 3- Halo de descoloração de MAR A1 em meio Agar Sabouraud corado com cristal de violeta.....	38
Figura 4- Halo de descoloração de TR 31 em meio Agar Sabouraud corado com cristal de violeta.....	38
Figura 5- Contagem de células no inóculo inicial dos experimentos (UFC/mLx10 ³)	40
Figura 6- Curva padrão do corante cristal de violeta entre as concentrações 1µg/mL-20µg/mL	41
Figura 7- Curva padrão do corante cristal de violeta entre 0,5 µg/mL à 5,0 µg/mL, onde apresenta linearidade.....	42
Figura 8- Leitura das absorbâncias de cada experimento pelo tempo de experimento (em dias)	45
Figura 9- Imagem dos sete isolados (3) ao lado do Agar Sabouraud, branco, (2) e meio com cristal de violeta sem inóculo, modelo	47
Quadro 1- Quadro dos isolados de leveduras amostradas em relação ao teste com os três Corantes	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS	15
2.2 LEVEDURAS E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	16
2.3 CORANTES: HISTÓRICO, PROBLEMÁTICA, FIXAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	18
2.3.1 Corantes utilizados	22
2.3.1.1 <i>Fucsina ácida</i>	22
2.3.1.2 <i>Vermelho de metila</i>	22
2.3.1.3 <i>Cristal de violeta</i>	23
2.4 DESCOLORAÇÃO DE CORANTES ATRAVÉS DO USO DE LEVEDURAS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 ÁREA DE ESTUDOS	25
3.1.1 Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí	26
3.1.1.1 <i>Complexo Estuarino Armazém/Tramandaí</i>	28
3.1.1.2 <i>Lagoa Rondinha</i>	29
3.1.1.3 <i>Lagoa Bacopari</i>	29
3.1.1.4 <i>Lagoa Marcelino Ramos</i>	29
3.2 COLETA E ISOLAMENTO DE LEVEDURAS	30
3.3 PREPARO DO INÓCULO	31
3.4 EXPERIMENTO DE DESCOLORAÇÃO DE CORANTES EM PLACAS DE PETRI	31
3.5 EXPERIMENTO EM MEIO LÍQUIDO	32
3.5.1 Determinação do pico de absorbância	32
3.5.2 Determinação da curva padrão/ curva de calibração	32
3.5.3 Experimento de descoloração de corante em meio líquido	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 EXPERIMENTO COM ISOLADOS DE LEVEDURAS EM MEIO AGAR COM CORANTE	35
4.2 CONTAGEM DE CÉLULAS	39
4.3 ESPECTROFOTOMETRIA	40

4.3.1 Determinação do máximo de absorbância e a curva padrão do corante cristal de violeta	41
4.3.2 Determinação das taxas de absorbâncias diárias dos isolados	42
5 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE	59

1 INTRODUÇÃO

A biorremediação consiste na técnica de aplicação de processos biodegradáveis no tratamento de diversos poluentes para recuperar e regenerar ambientes degradados, procurando manter o equilíbrio biológico do ecossistema. Por usar processos biológicos é também chamada de biotecnologia ambiental. Em síntese, a biotecnologia é baseada na busca e na descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. Um dos grandes problemas ambientais enfrentados atualmente é a descarga de poluentes industriais nos recursos hídricos, entre eles os corantes. Os prejuízos desses efluentes industriais ao ambiente são incalculáveis, tendo como resultado diversos compostos mutagênicos, cancerígenos e bioacumulativos acoplados a toda a cadeia trófica. Existem vários estudos que relatam a utilização de microrganismos, inclusive de leveduras, no processo de biorremediação de corante.

A área amostrada está inserida na Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí (BHRT). Diversos estudos evidenciaram a importância desse ambiente para as espécies, no entanto, poucos estudos relatam a diversidade e as interações microbianas. Para o conhecimento de leveduras nesse ecossistema conhece-se apenas o trabalho de Bueno (2010), sendo assim, com a finalidade de enriquecer os conhecimentos sobre os microrganismos da BHRT, realizou-se este trabalho. Além disso, nos últimos anos processos de biorremediação tem ganhado destaque no meio acadêmico apresentando importância econômica em diversas aplicações. Sendo assim, tornam-se importantes estudos que visem à descoberta de novos microrganismos com este potencial biotecnológico.

Os experimentos realizados iniciaram-se em meio Agar Sabouraud contendo os três corantes utilizados pelo trabalho (fucsina ácida, vermelho de metila e cristal de violeta). Foram realizados experimentos em Caldo Sabouraud acrescido de 0,1µg/ mL de corante. Para a análise da taxa de descoloração em meio líquido foi necessária a utilização da espectrofotometria. O objetivo geral deste projeto é contribuir para o conhecimento acerca dos microrganismos presentes na Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí (Rio Grande do Sul- Brasil). Como objetivos específicos, têm-se a padronização das metodologias já empregadas para a

descoloração de corantes com leveduras e a verificação deste potencial biotecnológico nos isolados de leveduras obtidos na Bacia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O referencial teórico está subdividido em: potencial biotecnológico de microrganismos; leveduras e seu potencial biotecnológico; corantes: histórico, problemática, fixação e classificação e descoloração de corantes através do uso de leveduras.

2.1 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e indispensáveis na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais nas cadeias alimentares ou nos ciclos biogeoquímicos. No geral, a grande maioria dos esforços de estudos e do uso sustentável da biodiversidade tem sido focada em macrorganismos. Estimativas recentes indicam que os microrganismos e os invertebrados constituem quase 90% das espécies da biosfera e desempenham um papel fundamental no funcionamento de todo o ecossistema (CANHOS; MANFIO, 2010). Atualmente tem-se o conhecimento de mais de 80% de plantas e mais de 90% de vertebrados existentes, enquanto que conhecemos menos de 1% de vírus e bactérias e menos que 5% dos fungos. Embora estes organismos sejam menos estudados, muitos exercem funções essenciais para a sobrevivência das formas de vida na Terra. (HAMMOND¹, 1995 *apud* CANHOS; MANFIO, 2010).

O termo biotecnologia apresenta uma série de conceitos. Em síntese, a biotecnologia é a aplicação da bioquímica, da biologia, da microbiologia e da engenharia química aos processos e produtos industriais e ao meio ambiente. Ou ainda pode ser definida como a utilização de sistemas celulares para obtenção de produtos ou desenvolvimento de processos industriais.

¹ Hammond, 1995. The current magnitude of biodiversity. In: Global Biodiversity Assessment. Heywood (Ed.). Cambridge, Cambridge University Press. p. 113-138.

A biotecnologia tem grande potencial para contribuição da sustentabilidade e segurança na produção alimentar, na manutenção da biodiversidade como proteção ao ambiente gerando fontes de energias e processos industriais alternativos. A biotecnologia regulamentada, justa e responsável poderá exercer papel fundamental no desenvolvimento sustentável (MELO, 2005).

É importante enfatizar a importância dos microrganismos nos avanços biotecnológicos modernos e na agricultura, já que grande parte desses avanços são provenientes das descobertas na área da genética, da fisiologia e do metabolismo dos microrganismos. A diversidade genética e metabólica dos microrganismos vem sendo explorada há muitos anos para a obtenção de produtos biotecnológicos. Com o aumento dos estudos e do conhecimento da diversidade microbiana, espera-se que os benefícios científicos conseqüentemente também prosperem, entre eles, um melhor conhecimento das funções exercidas por esses organismos no seu ambiente e da interação com outros organismos; descobertas de novos organismos com importante potencial econômico para a utilização de novos antibióticos; produtos químicos; probióticos; enzimas e polímeros para a aplicação industrial e tecnológica; biorremediação de poluentes, entre outras prospecções positivas.

2.2 LEVEDURAS E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

As leveduras são fungos com talo predominantemente unicelular, não filamentosos, esféricas ou ovais, se reproduzem de forma assexuada, por brotamento ou fissão binária, sem corpo de frutificação e da mesma forma que os fungos filamentosos são amplamente encontrados na natureza (KURZTMAN ; FELL, 1998). As leveduras são capazes de crescer em anaerobiose facultativa, podendo utilizar oxigênio ou compostos orgânicos como aceptor de elétrons. Esse atributo é muito valioso para a conquista e colonização de diversos ambientes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Leveduras aquáticas ainda são pouco estudadas e ainda há muita divergência na literatura em relação à sua origem autóctone ou alóctone nesse ambiente, no entanto, leveduras são originárias no ambiente terrestre e estariam contaminando e colonizando os ambientes aquáticos. Diferentes espécies de

leveduras têm sido descritas em ambientes aquáticos, sendo que as mais frequentes pertencem aos gêneros, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Trichosporon* (ROSA *et al.*, 1995). Segundo Hagler *et al.* (1995), as condições relativamente uniformes do ambiente aquático conservam a diversidade de leveduras em diferentes zonas nesse ambiente, sendo encontradas em maior diversidade em ambientes dulcícolas próximos a esgotos.

Outros estudos envolvendo leveduras aquáticas se focam na utilização desses microrganismos como indicadores de poluição de diversos corpos d'água (BOGUSLAWSKA-WAS; DABROWSKI, 2001; SLAVIKOVA; VADKERTIOVÁ, 1995) apresentando grande importância como ferramenta na avaliação ecológica. Existe uma variedade de trabalhos que enfatizam bons resultados em relação à bioindicação orgânica em águas doces utilizando leveduras. Nas últimas décadas, estudos analisando as comunidades de leveduras de água doce foram realizados principalmente em associação com águas poluídas. Segundo Woollet e Hedrick (1970), no geral em ambientes poluídos há uma predominância de leveduras fermentativas e em ambientes não poluídos de leveduras estritamente aeróbias. Segundo Libkind *et al.* (2005), no geral, em ambientes poluídos encontra-se em prevalência leveduras ascomicéticas e em ambientes não poluídos leveduras basidiomicéticas, com relatos de algumas leveduras balistosporogênicas.

Além dos sistemas aquáticos poluídos, as leveduras estariam colonizando ambientes de águas doces não poluídos assim como também ambientes de água salobras, salinas e até mesmo oceânicas. Atualmente não se tem estudos que comprovem uma diferença fisiológica evidente entre leveduras de água doce, salobra, salina ou marinha, já que as mesmas espécies encontradas no ambiente terrestre também são encontradas no ambiente aquático. Não obstante, provavelmente uma das características fenotípicas importantes para o sucesso da colonização em ambientes com concentrações salinas é a halotolerância.

Leveduras halotolerantes são aquelas que possuem uma taxa de crescimento quase que constante até uma determinada concentração de sal, a partir do qual o seu crescimento diminui, sendo completamente inibido em concentrações elevadas de sal. A halotolerância é fundamental para leveduras que colonizam e conseguem se estabelecer em ambientes salinos ou salobros. Trabalhos que tratam da investigação de fungos filamentosos e leveduras em ambientes marinhos, estuarinos

e aquáticos são bastante escassos, fato este que vem estimulando pesquisadores a realizar estudos para compreender a diversidade e a fisiologia desses fungos.

Além disso, existe um grande interesse biotecnológico em relação a esses organismos, sendo que há algum tempo, as leveduras são estudadas pelo homem a fim de fornecer benefício econômico. A fermentação das leveduras é um exemplo, já que é amplamente utilizada e, ultimamente, observa-se um grande interesse acerca de outros produtos biotecnológicos. Estudos que enfatizem a obtenção de produtos de interesse humano, econômico e ecológico, tais como, a produção de determinadas enzimas, o fato de conseguirem inibir o crescimento de certos fungos patogênicos e a produção das toxinas “killer”, devem ocupar mais espaço de destaque no meio acadêmico (MAUTONE, 2008).

Os fungos no geral estão cada vez mais se tornando alvo de pesquisas científicas e isto se deve em especial pela sua capacidade de produzir enzimas extracelulares, tais como a lignina peroxidase (LiP), o manganês peroxidase (MnP) e a lacase. Estas enzimas atuam sob compostos poluentes recalcitrantes, removendo-os ou transformando-os em outros produtos menos tóxicos (KARAM; NICEL, 1997). Essas enzimas são as mais comuns e são as que apresentam o maior potencial em aplicações industriais (AZEVEDO; ESPOSITO, 2004). Nestas enzimas falta a especificidade pelo substrato e, com isso, são capazes de degradar uma ampla faixa de xenobióticos incluindo efluentes corados (DE SOUZA ; PERALTA, 2003).

2.3 CORANTES: HISTÓRICO, PROBLEMÁTICA, FIXAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Desde a Revolução Industrial os recursos hídricos vêm sofrendo com o lançamento indevido dos efluentes industriais, corroborando para a contaminação e poluição desses mananciais (OLIVEIRA *et al.*, 2010). As indústrias têxteis possuem importante representatividade no potencial de poluição, devido ao elevado uso de corantes e aditivos para sua produção industrial. Essas indústrias são responsáveis pela alta produção de efluentes com grande quantidade de corantes, Demanda Química do Oxigênio (DQO) e sólidos suspensos. Não obstante, dentre todos esses danos ambientais, o problema dos corantes é o que mais tem atraído a atenção dos pesquisadores, ambientalistas e governadores (RODRIGUES, 2010).

O problema ainda é potencializado devido à grande mistura dos corantes têxteis com estruturas complexas, característica que proporciona a esta molécula estabilidade e, por conseqüência, uma baixa biodegradabilidade dos corantes nos sistemas convencionais de tratamento (FORGIARINI, 2006). Além da poluição ambiental existe a preocupação com a contaminação humana já que esses compostos se bioacumulam nos seres vivos, entrando assim na cadeia trófica. Outra preocupação está relacionada com os compostos mutagênicos ou carcinogênicos presentes nesses efluentes e como não se tem estudos para averiguar qual o resultado dessa contaminação nos organismos a situação torna-se ainda mais alarmante (DELLAMETRICE, 2005).

Os resíduos possuem uma composição diversificada e conforme mencionado anteriormente podem conter poluentes tóxicos e resistentes aos sistemas convencionais de tratamento. A poluição hídrica provocada pelos corantes das indústrias têxteis, além do problema de recalcitrância e potencial carcinogênico desses compostos, culmina na dificuldade de penetração dos raios solares, prejudicando o metabolismo fotossintético de algumas espécies (PETERNEL; KOPRIVANAC; KUŠIĆ, 2006).

Em suma, a cor é a primeira sinalização visível da contaminação no efluente e raramente se obtém a completa exaustão dos corantes durante a remoção, o que resulta na descarga do excedente em águas residuais (SOARES, 2000). Não obstante, apesar de a cor apresentar inúmeros malefícios ao ambiente natural, ao compará-los com os outros problemas resultantes dos corantes, este ainda é o menos preocupante e, apesar disso, a descoloração ainda é o primeiro passo para reduzir o impacto e descontaminar o efluente têxtil.

Para controlar, fiscalizar e com o intuito de minimizar os possíveis danos ambientais e à humanidade foi criada em 1974 a associação internacional ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing). A proposta de trabalho desta entidade baseia-se na divulgação de artigos científicos demonstrando os possíveis riscos toxicológicos e ecológicos causados pelos corantes e seus intermediários (GUARATINI; ZANONE, 2000).

Nos últimos 100 anos, vários compostos químicos coloridos são sintetizados e destes cerca de 10.000 são produzidos em escala industrial para atender a elevada demanda. Destes corantes estima-se que cerca de 2.000 tipos diversificados de corantes estejam disponíveis para as indústrias têxteis. Esta diversidade justifica-se,

pelo fato de que cada tipo de fibra têxtil a ser tingida requer corantes com características próprias e definidas. Durante o processo de fixação dos corantes às fibras podem ocorrer basicamente quatro tipos de interações: ligação iônica, de hidrogênio, de Van der Waals e covalente (GUARATINI; ZANONE, 2000).

A classificação dos corantes ocorre de acordo com a estrutura química ou de acordo com o método pelo qual é fixado à fibra têxtil. Conforme Guaratini e Zanone (2000) a classificação quanto à fixação da fibra têxtil pode ser:

a) corantes reativos: Neste tipo de corante, a reação química ocorre diretamente através substituição do grupo nucleofílico pelo grupo hidroxila da celulose. Este grupo se caracteriza por apresentar como característica a alta solubilidade em água e o estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra, o que confere maior estabilidade ao tecido tingido.

[...] são corantes contendo um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos (GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 72).

b) corantes diretos: Este grupo se caracteriza por serem compostos solúveis em água e capazes de tingir as fibras de celulose através de interação de Van der Waals.

[...]esta classe de corantes é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo ou pré-transformados em complexos metálicos. A grande vantagem desta classe de corantes é o alto grau de exaustão durante a aplicação e consequente diminuição do conteúdo do corante nas águas de rejeito (GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 72).

c) corantes Azóicos: Corantes azos são considerados compostos xenobióticos recalcitrantes que apresentam uma dupla ligação entre nitrogênio ($N=N$) e outros possíveis grupos que não são facilmente biodegradados como o grupo sulfônico (SO_3H). Os corantes azos são tóxicos e também podem formar aminas aromáticas (anilinas) que são carcinogênicas e/ou mutagênicas (MARTINS *et al.*, 2001). São compostos coloridos e insolúveis em água e são realmente sintetizados na fibra durante o processo de tingimento.

[...] a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, conhecido como agente de acoplamento que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio provoca uma reação com o agente de acoplamento já fixado na fibra e produz um corante insolúvel em água (GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 72).

d) corantes ácidos: possuem um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Estes grupos substituintes ionizáveis tornam o corante solúvel em água e têm vital importância no método de aplicação do corante nas fibras.

[...]no processo de tintura, o corante previamente neutralizado se liga à fibra através de uma troca iônica envolvendo o par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilato das fibras protéicas, na forma não-protonada. Estes corantes caracterizam-se por substâncias com estrutura química baseada em compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, ketonimina, nitro e nitroso (GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 73)

e) corantes à Cuba: Estes corantes são aplicados praticamente insolúveis em água, no entanto, durante os processos de tinturaria são reduzidos com ditionito em solução alcalina, transformando-se em composto solúvel. Após a oxidação pelo ar, ocorre a regeneração da forma original do corante sobre a fibra.

[...] é uma grande e importante classe de corantes baseada nos índigos, tioindigóides e antraquinóides. Entretanto, como a produção química de hidrossulfito de sódio pode causar problemas ecológicos, o custo desta classe de corantes tem sido bastante alto (GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 73).

f) corantes de Enxofre: Este grupo de corantes resulta usualmente em resíduos altamente tóxicos. É uma classe que após a aplicação se caracteriza por compostos macromoleculares com ponte de polissulfetos, os quais são altamente insolúveis em água.

[...] no tingimento são aplicados após pré-redução em banho de ditionito de sódio que lhes confere a forma solúvel, são reoxidados subsequentemente sobre a fibra pelo contato com ar(GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 73).

g) corantes Dispersivos: São corantes insolúveis em água e aplicados nos tecidos através de suspensão.

[...] durante o processo de tintura, o corante sofre hidrólise e a forma originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa sobre o acetato de celulose. Usualmente o processo de tintura ocorre na presença de agentes dispersantes com longas cadeias que normalmente estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato entre o corante e a fibra hidrofóbica (GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 73).

h) corantes Pré-Metalizados: Este grupo se caracteriza pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao cromóforo azo, permitindo assim a formação de íons metálicos.

[...]neste tipo de tintura explora-se a capacidade de interação entre o metal e os agrupamentos funcionais portadores de pares de elétrons livres. A

desvantagem ecológica deste tipo de corante está associada ao alto conteúdo de metal (cromo) nas águas de rejeito (GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 73).

i) corantes Branqueadores: As fibras têxteis naturalmente apresentam uma coloração amarelada por conterem primariamente certos materiais orgânicos e absorverem luz na faixa de baixo comprimento. Para modificar essa característica, as indústrias utilizam alvejantes químicos ou corantes brancos (branqueadores ópticos/ branqueadores fluorescentes) para oxidar a fibra.

[...]estes corantes apresentam grupos carboxílicos, azometino ou etilênicos aliados a sistemas benzênicos, naftalênicos, pirênicos e anéis aromáticos (GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 74).

2.3.1 Corantes utilizados

Os corantes utilizados foram a fucsina ácida, o vermelho de metila e o cristal de violeta.

2.3.1.1 Fucsina ácida (*Violeta ácida*)

A fucsina ácida é um corante que além da utilização na indústria têxtil tem aplicação nas aulas de citologia. Como o próprio nome já antecipa é um corante de classificação ácida de coloração magenta e fórmula química $C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$. Este corante é um homólogo da fucsina básica acrescida de grupos sulfônicos, apresenta doze isômeros que não apresentam grandes diferenças nas suas propriedades (HUNGER, 2003).

2.3.1.2 Vermelho de Metila (*Vermelho ácido*)

O vermelho de metila é um corante de classificação azo, devido à presença da ligação dupla entre os átomos nitrogênio com fórmula química $C_{15}H_{15}N_3O_2$. Este

corante é utilizado como indicador de pH (<4,4 é avermelhado, >6,2 é amarelado) (SANTOS, 2007).

2.3.1.3 Cristal de violeta

O cristal de violeta é um corante largamente utilizado nas indústrias têxteis e manufatura de cartuchos de tintas para impressora, além de sua utilização em colorações microbiológicas. Este corante é um triarilmetano e pertence à classe dos corantes básicos, sua fórmula química é $C_{25}H_{30}ClN_3$ (MORI; CASSELA, 2009).

2.4 DESCOLORAÇÃO DE CORANTES ATRAVÉS DO USO DE LEVEDURAS

Existem diversas formas de tratamento para efluentes têxteis, incluindo tratamento físico, químico e biológico (coagulação/floculação, adsorção com carvão ativado, precipitação, degradação biológica), sendo que os microrganismos têm sido intensamente estudados com a finalidade de minimizar ou remover os compostos tóxicos no meio ambiente (KAMIDA *et al.*, 2005). Pesquisas com microrganismos têm mostrado grande eficiência na remoção de substâncias recalcitrantes. Há um grande número de microrganismos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos de bactérias, algas, fungos e leveduras sendo relacionados ao sucesso em descolorir corantes azos (KHEHRA *et al.*, 2001; KIM; YOUNG AN; KIM, 2008; ZHENG *et al.*, 1999).

Os fungos são exemplo de microrganismos que apresentam grande importância em biorremediações, pois possuem a capacidade de degradar moléculas mais complexas devido à produção de enzimas específicas (SOUZA; ROSADO, 2009). A remoção da tintura por leveduras pode ocorrer através da bioadsorção ou biodegradação do corante. As leveduras representam uma fonte barata, prontamente disponível e possuem um alto potencial de acúmulo de corante. (DONMEZ, 2002). Estudos demonstraram que algumas espécies de leveduras ascomicéticas como *Candida zeylanoides* (MARTINS *et al.*, 2009; RAMALHO *et al.*,

2002), *Candida oleophila* (LUCAS *et al.*, 2006), *Debaryomyces polymorphus* (YANG *et al.*, 2003) e *Issatchenkia occidentalis* (RAMALHO *et al.*, 2004) apresentam uma importante atividade enzimática de biodegradação concomitante com a descoloração de corantes azo. Ainda assim, há poucos estudos que explorem a capacidade das leveduras na descoloração.

Resultados sobre a micorremediação são promissores (POZDNYAKOVA; RODAKIEWICZ-NOWAK; TURKOVSKAYA, 2004). Não obstante é necessária a realização de mais estudos para melhorar a aplicabilidade e compreensão dos mecanismos de biodegradação e bio sorção, assim como, as interações que ocorrem com o ecossistema onde foram inseridos (AZEVEDO ; ESPOSITO, 2004). Normas e regulamentações vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos pelos órgãos fiscalizadores com a finalidade de controlar os efluentes coloridos e com isso vem aumentando o interesse pelas pesquisas e desenvolvimento de novas tecnologias para a redução de impactos ambientais no descarte de efluentes coloridos das indústrias de beneficiamento têxtil (FORGIARINI, 2006). Sendo assim, estudos que focalizem na obtenção de novos microrganismos como biorremediadores capazes de descoloração de corantes são promissores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As leveduras utilizadas pelo presente trabalho são oriundas de parte das coletas do trabalho de conclusão de Bueno (2010), assim como também, do projeto: "Biodiversidade de leveduras da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí"* e do presente projeto de conclusão. Os recursos hídricos abrangidos estão localizados na Planície Costeira Rio Grandense, na Bacia Hidrográfica do Rio Grande do Sul sendo estes: o complexo Estuarino Armazém/Tramandaí e as lagoas Bacopari, Rondinha e Marcelino Ramos.

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A planície Costeira do Rio Grande do Sul, onde se encontra a BHRT, corresponde à parte emersa da bacia sedimentar de Pelotas e é constituída por uma faixa estreita entre o escudo e a linha marginal às lagoas litorâneas (IRGANG, 1996). Estende-se desde a barra do Chuí, ao sul, até a desembocadura do Mampituba, ao norte. Seu comprimento é de 620 km e oferece um aspecto de linha inarticulada, pouco sinuoso, formando no seu conjunto uma grande curva de convexidade voltada para sudeste (RAMBO, 2000). Ainda, segundo Tomazelli e Villwock (1995), a costa Rio Grandense se caracteriza também por possuir um sistema múltiplo e complexo de barreiras arenosas aprisionando o sistema lagunar (laguna dos Patos e lagoa Mirim), e uma série de outros corpos d'água isolados ou interligados com o mar por intermédio de canais estreitos e rasos.

A zona Costeira do Estado do Rio Grande do Sul caracteriza-se por apresentar uma planície sedimentar recente, no período do Cenozóico, com ecossistemas vulneráveis. Segundo Fujimoto *et al.* (2006), a região Norte da Planície Costeira Rio Grandense, caracteriza-se pela sequência de ambientes dispostos longitudinalmente à costa, chegando até as escarpas do Planalto Meridional. Logo após a área de interface com o mar, identifica-se uma planície

*Projeto de doutorado (em andamento) da aluna de pós graduação do ICBS-UFRGS, Luciana Senter.

sedimentar costeira composta por dunas, que são seguidas pelo cordão de lagoas litorâneas até o contato com o Planalto Meridional, sendo entalhadas pelos vales dos rios Maquiné e Três Forquilhas.

Na planície costeira originaram-se com os sistemas deposicionais do tipo laguna-barreira a formação dos corpos d'água costeiros, ocasionando também parte da evolução lateral do lado leste da Planície Rio Grandense. Cada um desses sistemas registra um pico de transgressão, seguida de um evento regressivo da altura média do mar (TOMAZELLI; VILLWOCK, 1995). Este sistema de lagoas costeiras apresenta grande heterogeneidade de ambientes, resultado de um conjunto de características ambientais associadas, tais como clima, ventos, padrões morfométricos e variações de salinidade (SCHAWARZBOLD, 1982).

3.1.1 Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí

De acordo com o Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí (RS) (2007), a BHRT está incluída na Região Hidrográfica das Bacias Litorâneas (Figura 1), onde as fragilidades para manutenção da água doce são ainda maiores por causa da influência oceânica. A Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí está localizada na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, litoral norte do estado, abrangendo 17 municípios. Ela estende-se desde as nascentes dos rios Maquiné e Três Forquilhas (a oeste) até o norte da Lagoa Itapeva e até o sul da lagoa da Cerquinha. Todos estes rios e lagoas escoam em direção a Foz do Rio Tramandaí.

A Bacia possui uma área de aproximadamente 2.500km², sendo que desta 500km² são de porção alagada. Como característica principal, apresenta uma sequência de lagoas paralelas à linha de costa, interligadas entre si, embora existam algumas pequenas lagoas isoladas. Essas interligações ocorrem através de canais, rios e em alguns casos de forma artificial (COMITÊ DE GERENCIAMENTO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TRAMANDAÍ, RS, 2007).

o estuário Tramandaí, onde a interferência do mar faz com que a água seja salobra. Entretanto é importante ressaltar que a salinidade pode variar muito devido a diversos fatores, como ventos, estiagem, alta pluviosidade, retirada excessiva de água, entre outros (COMITÊ DE GERENCIAMENTO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TRAMANDAÍ, 2007).

A bacia hidrográfica do Rio Tramandaí pode ser subdividida em dois subsistemas, conforme Schwarzbold (1984) o subsistema norte e o subsistema sul. O subsistema Norte abrange 87% da área da bacia e compreende as áreas a partir da lagoa Itapeva até a laguna de Tramandaí (estuário de Tramandaí). As lagoas deste subsistema têm uma cota acima do nível do mar que não permite refluxo de água salgada pelo rio Tramandaí. O subsistema Sul inicia na lagoa da Cerquinha até a lagoa do Armazém (estuário de Tramandaí). Neste subsistema, algumas lagoas possuem influência salina.

3.1.1.1 Complexo Estuarino Armazém/Tramandaí

O complexo estuarino Armazém/Tramandaí está localizado entre os municípios de Tramandaí e Imbé, na Planície Costeira do Litoral Norte do Rio Grande do Sul. As lagoas formam um corpo de água com características estuarinas, comunicando-se com o mar através de um canal de 1,5km de extensão e 100 m de largura. O complexo possui 18,5km² de área aproximada e 20,2x10⁶ m³ de volume (BEMVENUTI; ROSA-FILHO, 2010). O canal de ligação do mar é um ambiente sujeito a fortes variações de salinidade e elevada hidrodinâmica, onde a temperatura média anual é de 20°C e a taxa de precipitação situa-se em torno de 1300 mm anuais (KAPUSTA, 2001; TOMAZELLI, 1990). Esse complexo apresenta uma série de atividades antrópicas, resultado de uma forte pressão urbana (WOLLMANN, 2004).

3.1.1.2 Lagoa Rondinha

A lagoa Rondinha possui 8,92 km² de superfície e até 2,5 m de profundidade, circundada, na maior parte, por dunas eólicas (BUENO, 2010). Esse sistema aquático ainda é pouco explorado, restringindo-se à exploração pesqueira, à circulação de pequenas embarcações e à balneabilidade durante o veraneio. Ainda segundo Bueno (2010) este recurso não possui estudos científicos e por este motivo a descrição da área é ineficiente, no entanto, observa-se características comuns a todas as lagoas costeiras, como a presença de macrófitas aquáticas.

3.1.1.3 Lagoa Bacopari

A lagoa Bacopari, também chamada de lagoa dos Barros ou Solidão, localiza-se ao Norte do município de Mostardas e é um importante reservatório de água doce. Nesta área observa-se a presença do campo de dunas, plantação de arroz, áreas de banhados e campo úmido e a introdução de espécies exóticas arbóreas sobre os campos secos. A região é pouco povoada, no entanto, a ocupação na maioria dos casos é irregular (Área de Proteção Ambiental) e sem saneamento básico. Outra característica observada é a presença de processos erosivos nas margens e a drenagem da água para irrigação de cultivo de arroz (BUENO,2010).

3.1.1.4 Lagoa Marcelino Ramos

A Lagoa Marcelino Ramos está localizada no município de Osório, na Planície Costeira do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, pertencente à BHRT. Essa lagoa é uma lagoa rasa, sem influência salina, interligada ao sistema flúvio lacustre do rio Tramandaí através de canais de ligação artificiais ou naturais (SECRETARIA DE PLANEJAMENTO E MEIO AMBIENTE DE OSÓRIO, 2010). Segundo Machado (2000), a lagoa Marcelino tem como medidas morfométricas de área 0,43Km², de

profundidade máxima 1,30m e de profundidade média com 0,74m. Um grande problema para a lagoa Marcelino é a eutrofização e isto se deve ao grande aporte de esgoto cloacal sem tratamento e ao aterramento das margens sem disciplinamento. Além disso, durante o período de verão, o município de Osório recebe um grande número de turistas, aumentando assim consideravelmente a população e a produção de resíduos domésticos, que são lançados sem tratamento na lagoa Marcelino Ramos. Não obstante, ainda existem outras degradações preocupantes na região, como a ocupação desordenada das margens e a supressão das Áreas de Preservação Permanente aliado com a não preservação da vegetação original, alterando assim a hidrodinâmica da lagoa (SECRETARIA DE PLANEJAMENTO E MEIO AMBIENTE DE OSÓRIO, 2010).

3.2 COLETA E ISOLAMENTO DE LEVEDURAS

Os isolados do rio Tramandaí e das Lagoas Bacopari e Rondinha (TR) foram obtidas a partir do trabalho de conclusão de curso de Bueno (2010) e estão depositados na coleção de culturas do Laboratório de Micologia (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia- ICBS/UFRGS). Os isolados do estuário Tramandaí (EST) e das Lagoas Armazém (ARM) e Marcelino Ramos (MAR) são oriundos do projeto de doutorado sobre a “Biodiversidade de leveduras da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí” e do presente projeto de conclusão de curso. As coletas de águas foram feitas com amostras superficiais em cada recurso hídrico. As amostras foram encaminhadas para o laboratório em isopor com gelo.

O isolamento das leveduras de EST, ARM e MAR ocorreu a partir de três diluições seriadas decimais ($10^0, 10^{-1}, 10^{-2}$), sendo que cada amostra de água foi filtrada (uma única vez) em membranas com poros de $0,45\mu\text{m}$ de diâmetro. O isolamento das leveduras foi feito em meio Agar YM (0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona, 1% glicose, 2% Agar) acrescido de 0,04% cloranfenicol. As leveduras foram purificadas e armazenadas em tubos contendo Agar GYMP (0,5% glicose, 2% extrato de malte, 0,5% extrato de levedura, 0,2% fosfato de sódio monobásico, 2% Agar) cobertas com óleo mineral e conservadas em geladeira. Todos os isolados de leveduras utilizados pelo presente projeto estão armazenados na coleção de culturas

do Laboratório de Micologia (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia- ICBS/UFRGS).

3.3 PREPARO DO INÓCULO

Utilizou-se no experimento um total de 69 isolados. Para iniciar o experimento estas leveduras foram inoculadas no meio Agar Sabouraud (2% glicose; 1% peptona; 0,5% extrato de levedura; 2% Agar). Após o inóculo, as placas foram cobertas com filme plástico, para evitar contaminação, e incubadas por 48 horas em uma estufa microbiológica à temperatura de 25°C. Todos os experimentos de descoloração de corante foram realizados com inóculos recentes.

3.4 EXPERIMENTO DE DESCOLORAÇÃO DE CORANTES EM PLACAS DE PETRI

Após o preparo do inóculo, os isolados foram transferidos para meio Agar Sabouraud (2% glicose; 1% peptona; 0,5% extrato de levedura; 2% Agar) acrescido de 0,003% de corante e incubados à uma temperatura de 25°C. Os corantes utilizados foram o vermelho de metila, a fucsina ácida e o cristal de violeta. Em cada placa foram inoculados oito isolados de leveduras e depois de transcorrida uma semana foi feita a primeira leitura das placas para a verificação do halo de descoloração ao redor das colônias das leveduras. Ao verificar os isolados com este potencial biotecnológico no teste em placa, realizou-se um experimento de descoloração em meio líquido. Durante quatro semanas foram realizadas novas leituras para verificar se houve alguma alteração nos resultados. Além disso, foram realizadas triplicatas com os isolados que apresentaram potencial de descoloração com o respectivo corante descolorido e uma nova réplica com os isolados que não obtiveram êxito de crescimentos nos meios.

3.5 EXPERIMENTO EM MEIO LÍQUIDO

Este tópico está subdividido em: determinação do pico de absorvância; determinação da curva padrão/curva de calibração e experimento de descoloração de corante em meio líquido.

3.5.1 Determinação do pico de absorvância

Para o experimento em meio líquido foi utilizada a espectrofotometria. A espectrofotometria baseia-se no fato de que a concentração de uma substância é proporcional à sua absorvância em um determinado comprimento de onda. Sendo assim, para identificar a concentração do corante, é necessário medir a absorção de radiação da solução no comprimento de onda de máxima absorvância. Para isso utilizou-se o espectrofotômetro de marca Spectrum. Para descobrir o pico de absorvância foi utilizada uma amostra com 1µg/mL de corante em água destilada, uma pequena alíquota foi retirada desta solução e colocada nas provetas fazendo uma varredura entre a faixa do visível (400nm- 800nm). O controle (branco) utilizado nesta etapa foi água destilada.

3.5.2 Determinação da curva padrão/ curva de calibração

Para as leituras das amostras foi necessária primeiramente a determinação da curva de calibração de concentração. A curva de calibração baseia-se no fato de que a concentração é proporcional à sua absorção no comprimento de onda de máxima absorvância, sendo realizadas leituras no espectrofotômetro em concentrações diferentes do corante, gerando um gráfico de curva padrão. Para a curva padrão o controle utilizado foi água destilada.

3.5.3 Experimento de descoloração de corante em meio líquido

Primeiramente foram inoculadas as leveduras com o potencial observado em 10mL de caldo Sabouraud (2% glicose; 1% peptona; 0,5% extrato de levedura) e incubadas por 36 horas à temperatura de 25 °C. Para a contagem das células realizou-se três diluições seriadas decimais (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) em água peptonada, no entanto, utilizou-se para a contagem apenas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} . A contagem foi feita em Agar Sabouraud em triplicata, sendo que de cada diluição se retirou 250µl. Por conseguinte, foram preparados os meios com Caldo Sabouraud acrescido de 1µg/mL do corante em um volume de 50 mL para cada isolado em Erlenmeyers. Em cada Erlenmeyer foram adicionados 5 mL do isolado de levedura com potencial, previamente cultivado em caldo Sabouraud. Os cultivos foram incubados em Shaker com uma velocidade de 100 RPM e temperatura ambiente. Para as leituras no espectrofotômetro retirou-se de cada Erlenmeyers um total de 6,0mL, para a realização das triplicatas (2,0mL cada). Antes da realização das mensurações no espectrofotômetro, as alíquotas dos cultivos eram centrifugadas (centrífuga Lab-line) a uma rotação de 4000RPM (por 5 minutos) com a finalidade de retirar as células de leveduras. Os sobrenadantes foram transferidos para as cubetas para realização da leitura em espectrofotômetro em um volume de 1,5mL para cada leitura de absorbância. As leituras foram realizadas uma vez ao dia em um período de sete dias para cinco isolados e de seis dias para dois isolados.

Como controle (branco), foi utilizada uma solução elaborada com 50mL de Caldo Sabouraud e como modelo foi utilizado uma solução com 50mL de Caldo Sabouraud acrescido da mesma concentração de corante (1µg/mL).

No final do experimento foi calculada a porcentagem de degradação do corante utilizando a mesma fórmula do estudo de Saratale *et al.* (2009):

$$\% \text{ de descoloração} = \frac{\text{ABS. inicial do corante} - \text{Média das ABS. do último dia}}{\text{ABS. inicial do corante}} \times 100$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em geral, devido à sua própria natureza, os corantes são altamente detectáveis a olho nu. Esta característica possui certa vantagem, já que uma pequena quantidade lançada nos efluentes aquáticos pode ser detectada. Isto é perceptível devido à mudança na coloração dos recursos hídricos o que facilita o controle pela própria população e pelas autoridades que fiscalizam os assuntos ambientais. Por isso, nos últimos anos cada vez mais vem se buscando alternativas eficientes para a remoção da cor dos efluentes contaminados.

De um modo geral, a efetividade da remoção da cor pode ser avaliada pelo padrão Espectrofotometricamente permitido (Figura 2), o que pode ser utilizado para controlar a diluição do corante nos recursos hídricos. Sendo assim, através da comparação entre a absorbância da amostra e o padrão da qualidade requerido para coloração em rios, pode-se avaliar o grau de contaminação do ambiente. Não obstante, o problema com corantes ainda é maior, pois existem variáveis não detectáveis pelo espectrofotômetro, como por exemplo, o fato da bioacumulação nos organismos presentes neste ambiente (GUARATINI; ZANONI, 2000).

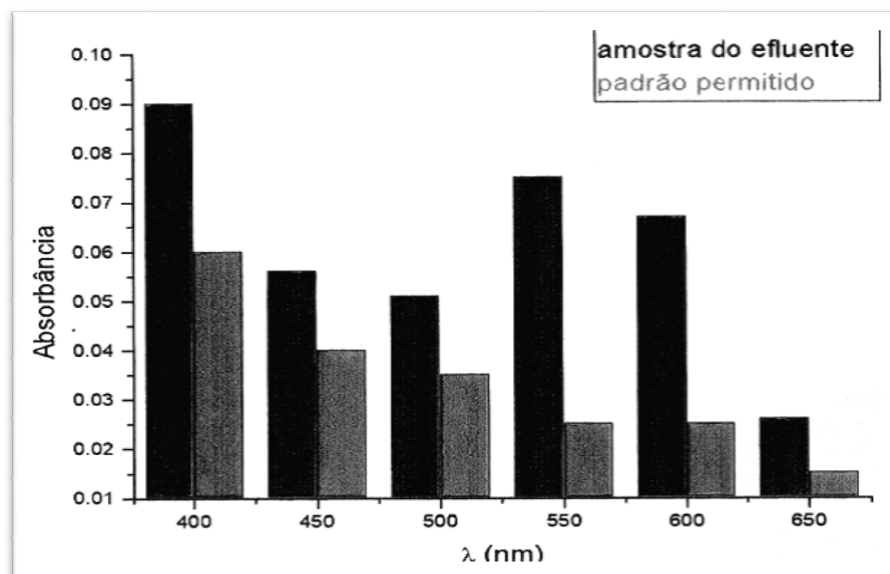


Figura 2. Análise espectrofotométrica da amostra de um efluente de indústria têxtil comparada a um padrão definido.
FONTE: GUARATINI; ZANONI, (2000)

4.1 EXPERIMENTO COM ISOLADOS DE LEVEDURAS EM MEIO AGAR COM CORANTE

Ao realizar o experimento pôde-se constatar que os isolados não conseguiram descolorir os corantes fucsina ácida e vermelho de metila, entretanto, pode-se observar a formação de halos de descoloração em sete isolados para o corante cristal de violeta. Além disso, pôde-se observar que alguns isolados não conseguiram crescer nos meios corados (Quadro 1).

Continua

Isolado/ Corante	Fucsina Ácida	Vermelho de Metila	Cristal de Violeta
ARM A1	-	-	-
ARM A4	-	-	-
ARM A5	-	-	-
ARM A6	-	-	*
ARM B1	-	-	*
ARM B2	-	-	-
ARM B3	-	-	-
ARM B4	-	-	+
ARM B5	-	-	-
ARM C3	-	-	-
ARM C4	-	-	-
ARM C5	-	-	-
ARM D3	-	-	-
ARM D4	-	-	+
EST 01	-	-	-
EST 06	-	-	-
EST A3	-	-	-
EST A4	-	-	-
EST A5	-	-	+
EST A6	-	-	-
EST C5	-	-	-
EST D2	-	-	-
EST D5	-	-	-
MAR A1	-	-	+
MAR A2	-	-	-
MAR B1	-	-	-
MAR C1	-	-	-
TR 01	-	-	-
TR 02	-	-	+
TR 04	-	-	-
TR 05	-	-	-
TR 07	-	-	-
TR 08	-	-	-
TR 09	-	-	-
TR 10	-	-	*
TR 11	-	-	-

Isolado/ Corante	Conclusão		
	Fucsina Ácida	Vermelho de Metila	Cristal de Violeta
TR 12	-	-	-
TR 13	-	-	-
TR 14	-	-	-
TR 15	*	-	*
TR 17	-	-	+
TR 18	*	*	*
TR 19	*	*	*
TR 20	*	*	*
TR 21	-	-	*
TR 22	*	*	*
TR 24	-	-	*
TR 25	-	-	-
TR 26	*	-	*
TR 27	-	-	-
TR 28	-	-	*
TR 29	-	-	-
TR 31	-	-	+
TR 32	-	-	*
TR 33	-	-	-
TR 34	-	-	-
TR 35	-	*	*
TR 36	-	-	-
TR 40	-	-	-
TR 41	-	-	-
TR 43	-	*	*
TR 45	*	-	*
TR 46	-	-	-
TR 47	-	-	*
TR 48	*	*	*
TR 51	*	-	*
TR 53	-	-	-
TR 54	-	-	*
Total (+)	0	0	7
Total (-)	60	62	42
Total (*)	9	7	20
Total	69	69	69

(- sem halo/ + com halo/ *não cresceram)

QUADRO 1- Quadro dos isolados de leveduras amostradas na BHRT (Complexo Tramandaí- EST /Armazém – ARM; Lagoa Marcelino Ramos – MAR; Lagoa Bacopari- TR; , Lagoa Rondinha- TR e Estuário- TR) em relação ao teste com os três corantes em uma concentração de 0,003%.
FONTE: Autora, 2011.

O corante fucsina ácida tem importância em relação ao lançamento de efluentes contaminados, em especial por indústrias têxteis, sendo assim, tornam-se necessários estudos que padronizem alguma técnica de remediação deste corante, o que não foi encontrado pelo presente levantamento bibliográfico.

Em relação ao corante vermelho de metila encontrou-se estudos com degradação total do corante através do consórcio bacteriano em até 6 horas em um pH entre 6 e 7 (ADEDAYO *et al.*, 2004). Ainda com o mesmo corante foi relatado descoloração no trabalho de Novotný *et al.* (2001), onde o fungo *Irpex lacteus* apresentou uma taxa de descoloração de 56% em 14 dias. Outros estudos utilizam a fotocatalise com o auxílio de fotocatalizadores, como por exemplo, ZnO e TiO₂, e/ou simplesmente pela própria radiação fotolítica da UV-C (SANTOS, 2007).

O corante cristal de violeta possui uma diversidade de trabalhos com potencial biotecnológico de descoloração. Estudos com biorremediação a partir de fungos e leveduras foram documentados por diversos autores. Gill, Arora e Chander (2002) estudaram algumas espécies de fungos filamentosos e sua porcentagem de descoloração *Dichomitus squalens* descoloriu em 5 dias 100% do corante, *Phanerochaete chrysosporium* descoloriu em 5 dias 58,3% do corante, *Phlebia brevispora* descoloriu em 2 dias 60% do corante, *Phlebia fascicularia* descoloriu em 5 dias 100% do corante, *Phlebia floridensis* descoloriu em 5 dias 95,2% do corante. Segundo Raghukumar (2000), *Flavodon flavus* descoloriu em 11 dias 87% do corante. No trabalho de Carvalho (2005), *Corioloopsis byrsina* descoloriu 63% em 2 dias e *Lentinus* sp 51,7% em 2 dias. Saratale *et al.* (2009), documentou que *Trichosporon beigelii* descoloriu em 1 dia 57%. Além dos estudos de biorremediação com este corante, ainda existem outros, como a utilização de espumas de poliuretano (MORI; CASSANELA, 2009) e a ação fotolítica (GUPTA; PAL; SAHOO, 2006).

Para esse corante pôde-se observar que os isolados ARM B4, ARM D4 e MAR A1 (Figura 3.a e 3.b) apresentaram um halo de descoloração bem visível em uma semana após o inoculo em meio Agar com cristal de violeta. Os isolados TR 31 (Figura 4.a e 4.b) e TR 17 apresentaram um halo de descoloração pouco visível em uma semana, sendo que se pôde confirmar o potencial com um halo visível em duas semanas após o inóculo inicial. Os isolados TR 02 e EST A5 apresentaram halos de descoloração somente na quarta semana procedente ao inóculo inicial. Na triplicata realizada com estes isolados o padrão de tempo de descoloração manteve-se igual.

Em relação aos isolados que não cresceram, foi realizado um novo experimento para o corante cristal de violeta, já que este meio corado foi o único em que as leveduras conseguiram descolorir, entretanto, nenhum isolado cresceu novamente.

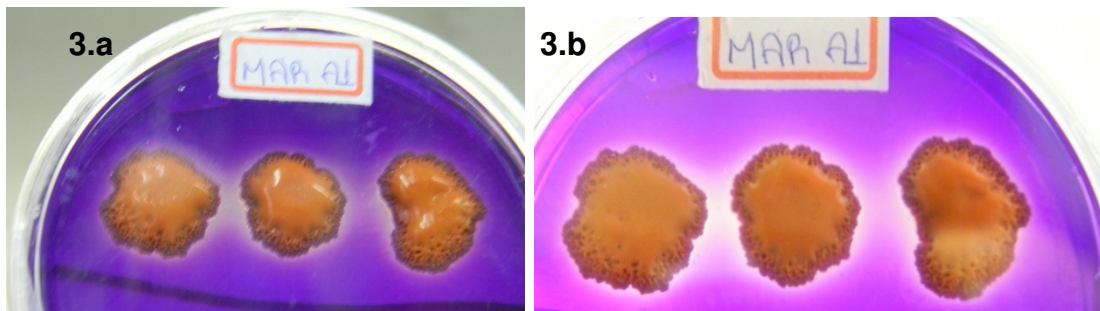


Figura 3. Halo de descoloração de MAR A1 em meio Agar Sabouraud corado com cristal de violeta / Figura 3.a Halos de descoloração de MAR A1 após uma semana do início do experimento. / Figura 3.b Halos de descoloração de MAR A1 após duas semanas de experimento.
FONTE: Autora, 2011.

Conforme observado nos experimentos, MAR A1 apresentou um grande halo de descoloração (em relação aos outros isolados) o que pode ser observado nas figura 3.a e 3.b. Outro isolado que apresentou um potencial rápido de descoloração foi ARM D4.

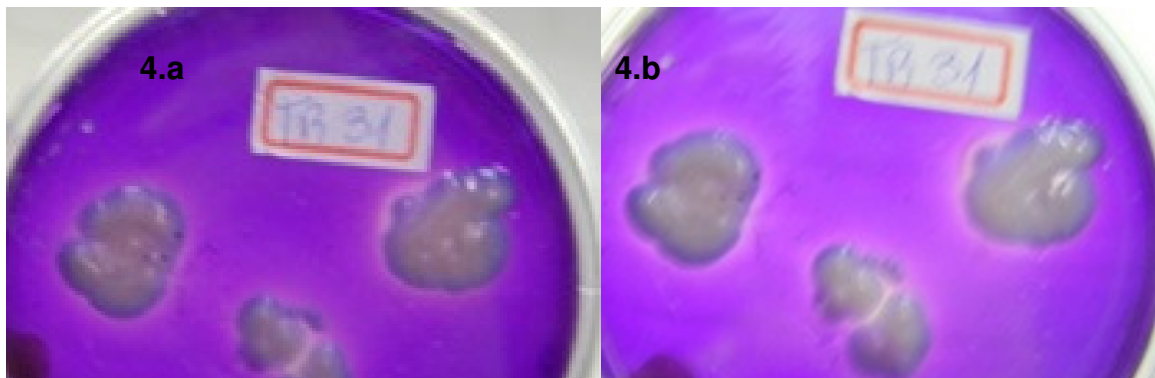


Figura 4. Halo de descoloração de TR 31 em meio Agar Sabouraud corado com cristal de violeta. / Figura 4.a Halos de descoloração de TR 31 após duas semanas o início do experimento. / Figura 4.b Halos de decoloração de TR 31 após três semanas de experimento.
FONTE: Autora, 2011.

Em relação às leveduras que não apresentaram halos de descoloração encontrou-se algumas características limitantes apresentadas em outros estudos que podem ter dificultado e até impedido o crescimento. No estudo de Saratale *et al.*, (2009), com experimentos muito semelhantes ao do presente projeto, o meio utilizado para a levedura *Trichosporon beigeli*, foi GYMP ao invés de Agar Sabouraud. Além disso, o pH do meio foi controlado, fato este que não foi verificado no presente estudo. É extremamente importante verificar e controlar as condições

físico-químicas do meio, entre elas o pH, para o crescimento e para a taxa de descolorização (CORSO, 1998; CHEN *et al.*, 2002; KHEHRA *et al.*, 2005; NACHIYAR, RAJKUMAR, 2003; SARATALE *et al.*, 2009; WONG; YUEN, 1996). Ainda segundo Mohana *et al.* (2008), a fonte de nitrogênio e o tamanho do inóculo são importantes para o sucesso do trabalho.

Outras variantes importantes são a temperatura e a concentração do corante. A temperatura ideal para boas taxas de descoloração e crescimento varia (SARATALE *et al.*, 2009). Ainda segundo o mesmo estudo, a taxa de descoloração diminui com o aumento da concentração do corante, o que pode ocorrer em virtude da toxicidade do corante às células de levedura, isto também poderia explicar o fato de alguns isolados não terem crescido no meio. Em síntese, o presente trabalho, manteve as placas com meio coradas a uma temperatura de 25°C, não tendo testado outras temperaturas de incubação. Em relação à concentração de corante, pH, fonte de nitrogênio e tamanho do inóculo não foram realizados nenhum experimento para verificar as condições ideais de crescimento e descoloração.

4.2 CONTAGEM DE CÉLULAS

Com a finalidade de quantificar as células no inóculo utilizado nos experimentos em meio líquido, foram realizadas três diluições seriadas e utilizadas para a contagem as diluições 10^{-2} e 10^{-3} , aplicando 250µl em cada placa. Após a contagem, foi feita uma média de cada triplicata e o cálculo de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro do inóculo (Figura 5). Com os resultados, pode-se observar a grande quantidade de células nos isolados TR 02 e TR 17. No geral observou-se um bom crescimento em todos isolados, fato este que corrobora com o sucesso da etapa inicial do experimento em meio líquido.

Segundo os resultados de Saratale *et al.* (2009), a taxa de descoloração aumenta com a concentração das células e, conseqüente, reduz o tempo necessário para a completa descoloração, ou seja, é de suma importância quantificar o número de células presente no experimento. Apesar de não ter sido realizada neste trabalho, a contagem celular diária é extremamente importante, já que com esses dados pode-se correlacionar a taxa de crescimento celular com a taxa de descoloração.

Em relação ao experimento, pôde-se observar que quase todos os isolados apresentaram após a inoculação inicial diferenciação na coloração do Caldo (apresentando sua própria coloração celular) o que demonstra o crescimento celular.

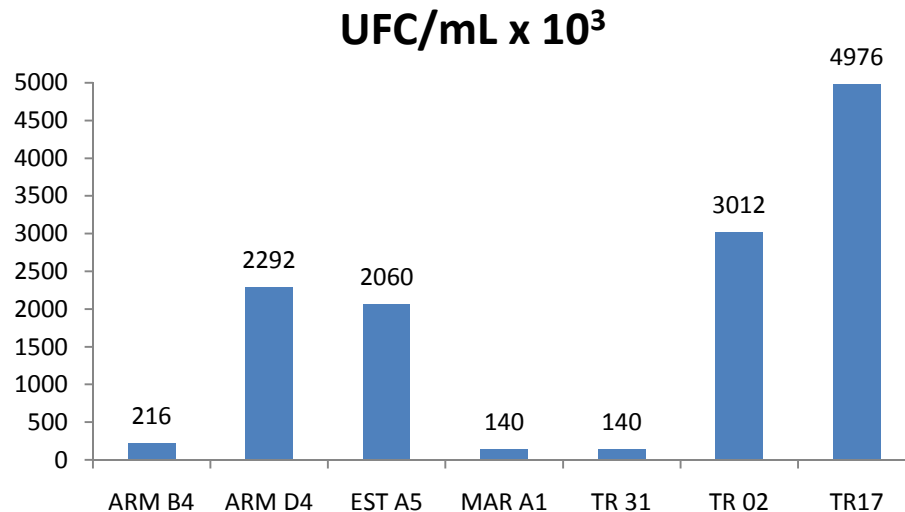


Figura 5- Contagem de células no inóculo inicial dos experimentos (UFC/mL x 10³). Onde o eixo x representa os isolados e o eixo y representa as UFC/mL
 FONTE: Autora, 2011.

4.3 ESPECTROFOTOMETRIA

A espectrofotometria na luz visível baseia-se na porção entre a faixa da radiação da ultravioleta e do infravermelho esta faixa intermediária chama-se faixa do visível e varia entre 400nm à 800nm. O espectrofotômetro é um aparelho que faz passar um feixe de luz monocromático através de uma solução e por um prisma ele separa a luz em feixes com diferentes comprimentos de onda. Sendo assim, ele consegue passar pela amostra um feixe de luz com um único comprimento de onda. O espectrofotômetro permite saber qual a quantidade de luz é absorvida a cada comprimento de onda.

A análise da cor de uma amostra permite quantificar a presença de compostos que atribuem a esta uma coloração característica, a qual é responsável pelo desvio das características de transparência da amostra padrão (no caso da curva padrão, a água destilada e no caso das leituras diárias de absorbância o meio com Agar Sabouraud).

4.3.1 Determinação do máximo de absorvância e a curva padrão do corante cristal de violeta

Depois de realizada a varredura no comprimento do visível (400nm- 800nm) encontrou-se o máximo de absorvância do cristal de violeta na faixa de onda de 585nm. Outros estudos encontraram picos de absorvância do cristal de violeta semelhantes ao encontrado pelo presente projeto, como por exemplo, o trabalho de Carvalho (2005) com o pico de 589nm, e o trabalho de Saratale *et al.* (2009) com o pico de 592nm. Para realizar o experimento com sucesso é necessário preparar uma série de soluções com o composto a ser quantificado, com uma concentração conhecida e medir as absorvâncias com o comprimento de onda adequado, assim irá gerar uma curva padrão ou também chamada de curva de calibração. Com a curva padrão (Figura 6) foi feito um ajuste linear com a linha de tendência aos pontos experimentais, possibilitando assim estabelecer uma equação de reta com alta confiabilidade, uma vez que o coeficiente de correlação (R^2) apresentou valor próximo de 1. Pôde-se observar que a relação entre a absorvância e a concentração do corante foi linear até pouco antes a 10 $\mu\text{g/mL}$.

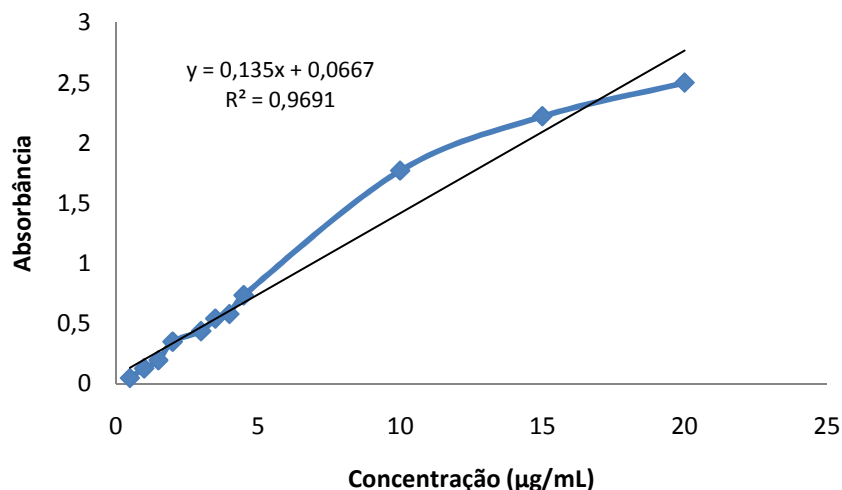


Figura 6.- Curva padrão do corante cristal de violeta entre as concentrações 1 $\mu\text{g/mL}$ - 20 $\mu\text{g/mL}$ (eixo x) e as absorvâncias (eixo y)
FONTE: Autora, 2011.

Ainda assim, muitas vezes o método só é linear até certa concentração da substância. Neste caso se utiliza a zona em que a relação é linear, diluindo a solução a medir, de modo que a absorbância resultante esteja contida no intervalo da reta da curva padrão. No experimento pôde-se observar isto, onde a concentração ideal encontra-se entre os intervalos de 0,5µg/mL e 5,0µg/mL (Figura 7).

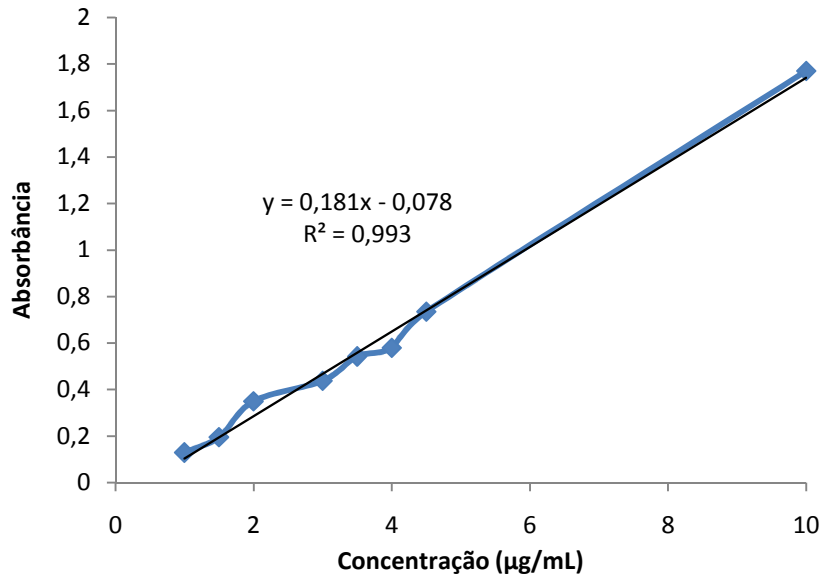


Figura7: Curva padrão do corante cristal de violeta entre 0,5 µg/mL à 5,0 µg/mL (eixo x) e as absorbâncias (eixo y) onde apresenta linearidade.

FONTE: Autora, 2011.

4.3.2 Determinação das taxas de absorbâncias diárias dos experimentos

Para a determinação da descoloração diária do cristal de violeta realizou-se um experimento em meio líquido com todos os isolados que apresentaram potencial de descoloração de corantes em Agar Sabouraud. A partir das leituras diárias de cada isolado pôde-se observar um padrão em todos os isolados (Figuras 8.a à 8.g). Observou-se uma tendência geral de descoloração e um pico de absorbância em todos os isolados entre o 3° e 5° dia.

Quanto ao aparecimento do pico observado em todos gráficos, a hipótese sugerida é que nestes dias verificaram-se os menores valores de leitura de absorbância do controle (meio de cultura sem o corante) (Apêndice). Como a absorbância do controle é descontada (feita a tara/ zerada), isto acabou por

influenciar todas as leituras de absorvância feitas nestes dias, ou seja, um menor valor foi descontado das absorvâncias. A baixa absorvância do controle (comparada aos outros dias) pode ter sido resultado de uma homogeneização ineficiente do meio, fazendo com que a alíquota destes dias tivesse uma menor coloração. Durante todo o experimento, os meios utilizados como controle e como modelo (meio com corante) mantiveram-se sem contaminação, sendo que todos os procedimentos com estes caldos foram realizados com todo o cuidado de assepsia. Ou seja, as alterações das absorvâncias não se justificam por contaminação.

No isolado TR17 (Figura 8. a), o pico de absorvância observado em relação à todas as outras leveduras, foi muito maior sendo maior até que a absorvância do próprio corante puro. Além da absorvância do controle ter sido menor nestes dias, observou-se também um aumento no crescimento celular para este isolado a partir do 4º dia, onde o Caldo ficou denso e com uma coloração branca/esverdeada. Este aumento do crescimento pôde ser verificado após a centrifugação, com o resultado de uma grande massa de *pellet*. Apesar da influência da absorvância do desconto do controle, a absorvância do isolado TR 17 neste pico foi muito maior do que os demais isolados. Este fato pode ser explicado devido ao excesso de células suspensas, o que a centrifugação pode não ter solucionado, influenciando assim as leituras de absorvância já que o comprimento de onda para a leitura celular é muito próxima à utilizada para o corante (entre 550nm a 600nm).

O isolado TR 31 (Figura 8.b) no 2º dia após a inoculação inicial apresentou uma absorvância superior à absorvância do próprio corante. Isto também pode ser explicado pelo aumento celular e ineficiência da centrifugação já que este isolado apresentou um grande crescimento em caldo corado em 48 horas após a inoculação inicial.

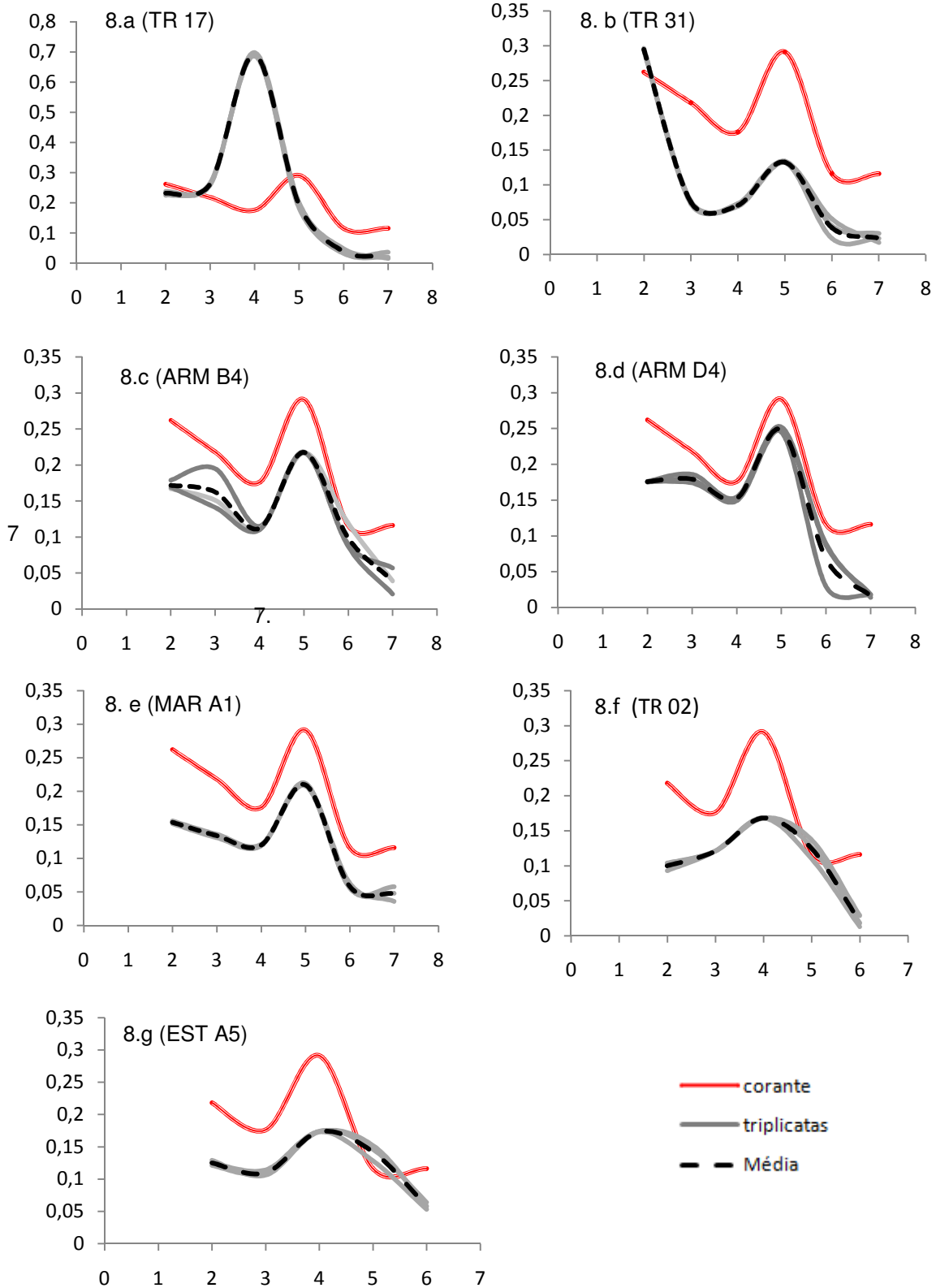
Para os isolados TR 02 e EST A5 pode-se observar nas respectivas figuras 8.f e 8.g que ao 5º dia a absorvância do corante foi menor do que a absorvância do corante com meio, ou seja, o corante sozinho estaria mais descolorado. Isto se explica também pela mesma hipótese de crescimento celular e ineficiência de centrifugação.

Em síntese, o que pôde ser observado foi que houve a descoloração do meio inoculado com corante o que pode ser observado nas figuras 8.a à 8.g. e no Apêndice na última e penúltima coluna correspondente ao 7º dia (ARM B4, ARM D4, TR 31, TR 14 e MAR A1) e ao 6º dia (TR 02 e EST A5) de observação. Outra característica importante observada nas figuras 8.a - 8.g foi a descoloração do

corante cristal de violeta sem nenhuma cultura. Esta condição pode ser explicada pela fotólise. Em concentrações baixas, como a que foi utilizada pelo modelo deste projeto (caldo com corante e sem inóculo), pode ocorrer fotólise através da luz visível. Alguns estudos enfatizam a utilização de dois métodos para experimentos com fotólise, um sem oxigênio molecular e o outro com o oxigênio molecular na amostra. Em ambas variantes há a descoloração, no entanto, sem a presença do oxigênio molecular há uma prevalência, ou seja, a descoloração é mais efetiva.

Em síntese, sabe-se que há uma relação direta entre a concentração do corante em meio líquido e a taxa de fototransformação (SILVA, 2010), além do mais, quanto maior a intensidade da luz, maior e mais ágil será a descoloração (SANTOS 2007). Ainda em relação à fotólise, existem outras metodologias que empregam semi-condutores, catalisadores, como TIO_2 e ZnO (LACERDA, 2010; MORAES, 2010; SANTOS, 2007; SAUER, 2002). A utilização desses catalisadores acelera o processo de descoloração e segundo Santos (2007) é o que deixa o processo viável comercialmente. Entretanto, nessa técnica existe a desvantagem da necessidade de separação do efluente tratado do fotocatalisador em suspensão (SANTOS, 2007). Contrapondo a essa desvantagem, os estudos com biorremediação despertam grandes interesses especialmente devido ao baixo custo financeiro e ambiental (SARATALE *et al.* 2009). Para a repetição desse experimento, o meio modelo e todos os meios utilizados nos experimentos devem ser protegidos em papel alumínio para que seja evitada a fotólise.

Outra característica importante observada durante os experimentos foi que após a centrifugação das alíquotas havia diferenciação nas cores dos *pellets*. Nos isolados TR31, TR02 e TR17 (que possuem uma coloração celular original branco/perolado), os *pellets* possuíam uma coloração arroxeado claro. Nos isolados MAR A1 e EST A5 (que possuem uma coloração celular original alaranjado forte), após a centrifugação os *pellets* possuíam uma coloração alaranjado escuro, levemente arroxeado. Em relação aos isolados ARM D4 (com coloração celular original branco/perolada) e ARM B4 (com coloração original alaranjado) os *pellets* eram menos abundantes, comparado aos outros isolados. Além disso, os *pellets* de ARM D4 eram apenas roxos da cor do corante e em pequenos grânulos, os *pellets* de ARM B4 eram alaranjados (da mesma coloração da colônia) com alguns grânulos com coloração do corante.



Figuras 8- Gráfico das absorbâncias de cada experimento pelo tempo de experimento (em dias) . Onde y representa os valores de absorbância e x representa os valores de dias do experimento. FONTE: Autora, 2011.

Para determinar e constatar o que está acontecendo com o corante nas leveduras, necessita-se a realização de outros experimentos. Para células vivas, há dois mecanismos através do qual os organismos podem retirar a cor do efluente, a biodegradação e bioadsorção. A biodegradação ocorre por meio da utilização de enzimas que atacam e desfazem as ligações químicas mais importantes dos corantes (ou seja, utilizam o corante como uma forma alternativa de carbono). As enzimas são imprescindíveis no processo de biodegradação que só ocorre devido à especificidade genômica de cada microrganismo apto para reconhecer um determinado tipo de substrato orgânico (RODRIGUES, 2010).

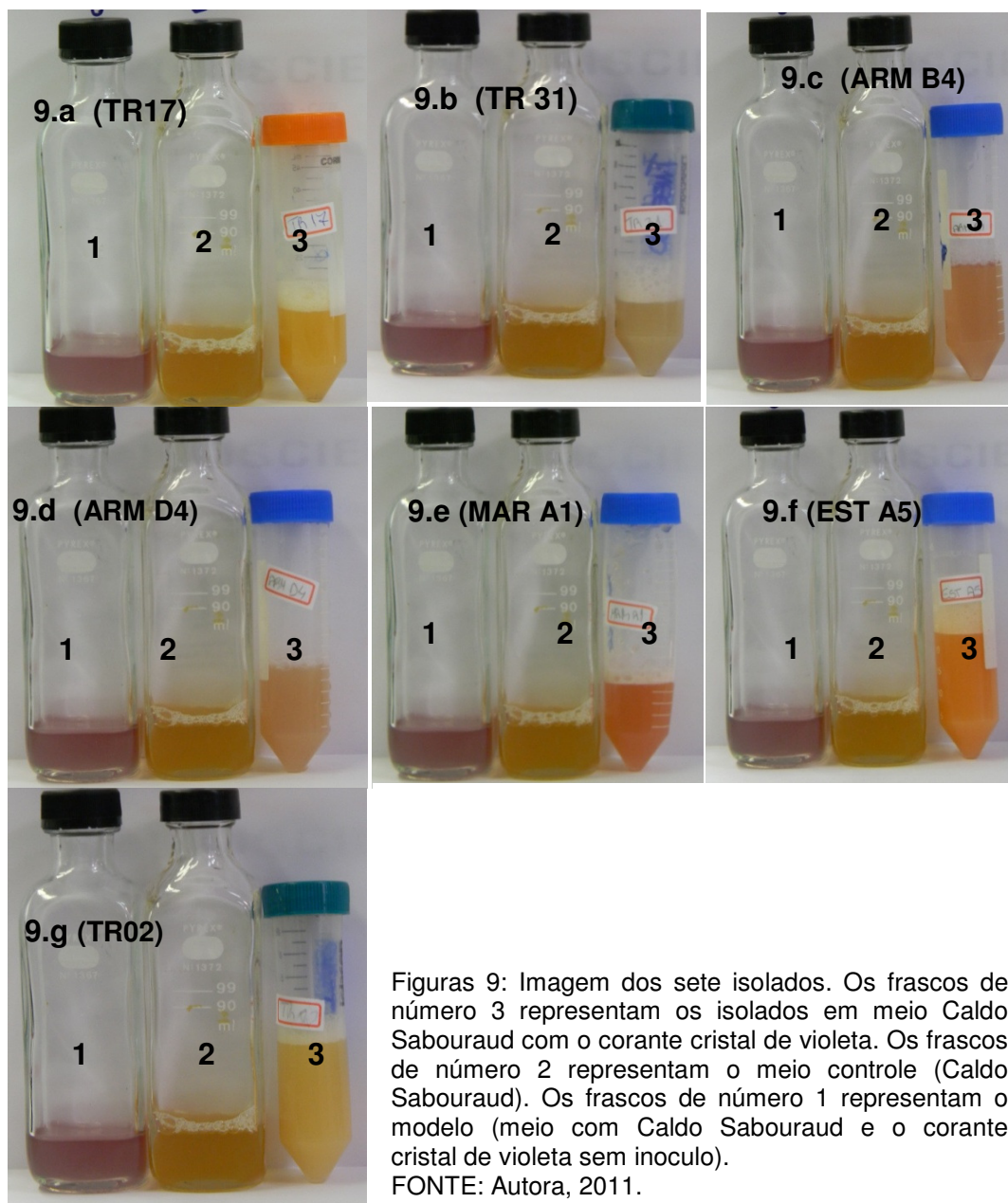
A bioadsorção ocorre através da retenção das moléculas do corante na parede celular do microrganismo vivo ou morto (MOU; LIM; SHEN, 2002). Bioadsorção é um termo utilizado para explicar os fenômenos de remoção de moléculas consideradas tóxicas de solução aquosa através da adsorção à parede do microrganismo e que venham a ter afinidade com organelas ou estruturas existentes dentro da célula (CORSO 1998). Leveduras são utilizadas para os processos bioadsortivos devido às características desejáveis, assim como, as altas resistências mecânicas e osmóticas (TRINDADE², 1986 *apud* RODRIGUES, 2010).

Com o resultado final do experimento, também se pôde calcular a taxa de descoloração, com sete dias de experimento: TR 31 (91,1%), TR 17 (90,9%), MAR A1 (82%), ARM B4 (85,1%), ARM D4 (93,8%); e com seis dias EST A5 (77,8%), TR 02 (92,4%). Nestes valores estão incluídos os valores da fotocatalise, porém, conforme observado na figura 8 a descoloração dos meios com cultivo foi superior ao do meio simples com corante.

Em síntese, todas as leveduras testadas em meio líquido obtiveram altas porcentagens de descoloração e, portanto, podem ser utilizadas biotecnologicamente para esta finalidade. Entretanto, é importante enfatizar a porcentagem da levedura TR02 que apresentou um dos resultados mais altos em relação às outras testadas, sendo que estava em experimento em 6 dias.

² TRINDADE, R.C. **Adsorção dos azo-corantes Crisoidona CI 11.270 e Amaranto CI 16185 por células de leveduras do gênero *Rhodotorula*: Influência de alguns componentes celulares e temperatura**. 1986. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas na área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1986.

Em relação aos resultados apresentados anteriormente por outros autores com fungos filamentosos e leveduras (GILL; ARORA; CHANDER, 2002; RAGHUKUMAR, 2000; CARVALHO, 2005; SARATALE *et al.*, 2009) a porcentagem de descoloração foi relativamente alta. No entanto, estes valores elevados de descoloração se devem à baixa concentração de corante diluído no meio (1µg/mL), enquanto que os outros estudos utilizam uma concentração de 50µg/mL e, conforme discutido anteriormente, quanto menos concentrado mais o cultivo consegue descolorir. Além dos valores numéricos pôde-se observar uma descoloração visível pelos isolados nos testes de descoloração com o corante cristal de violeta (9.a à 9.g).



Este trabalho apresentou resultados promissores em relação ao potencial de descoloração de leveduras da BHRT. Têm-se como perspectivas futuras continuar com os testes de descoloração de corantes utilizando novas metodologias e padronizando as já utilizadas, objetivando refinar os resultados.

5 CONCLUSÃO

Vários métodos vêm sendo utilizados no tratamento de efluentes com corantes. As técnicas físico-químicas são eficazes para a remoção da cor, mas elas usam mais energia e produtos químicos do que processos biológicos, podendo causar problemas de poluição secundária sob a forma de lama. Além disso, esses processos e técnicas envolvem procedimentos complicados e economicamente inviáveis (SARATALE *et. al*, 2009).

Partindo desse pressuposto, os processos biológicos tem atraído mais atenção e se mostrado com resultados promissores. Pesquisas envolvendo fungos na descoloração de corante de águas residuais tem aumentado intensamente e diferentes gêneros de fungos, inclusive leveduras têm sido investigadas. O presente trabalho estudou o potencial biotecnológico de descoloração de corantes de leveduras aquáticas da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí.

A metodologia empregada para os experimentos foi positiva, no entanto, por ser um projeto piloto, alguns pequenos detalhes ainda devem ser padronizados para o seu aprimoramento. A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir, que sete isolados apresentaram este potencial de descoloração do corante cristal de violeta na concentração utilizada. Apesar dos experimentos em meio líquido não terem sido repetidos, pôde-se observar altas taxas de descoloração deste corante. Em síntese, este trabalho tem como perspectiva continuar com os experimentos, sendo que alguns tópicos devem ser incluídos como perspectivas futuras:

- a) a realização de novos inóculo em meio Agar Sabouraud e Agar GYMP com corante (meio utilizado por SARATALE *et al.*, 2009), utilizando diferentes concentrações do corante e em diferentes faixas de pH e temperatura para verificar qual a condição ideal de cultivo.
- b) continuar com os experimentos com os corantes fucsina ácida, vermelho de metila e cristal de violeta.
- c) continuar com os experimento em meio líquido com as leveduras que apresentam potencial de descoloração, controlando diariamente

temperatura, pH e crescimento celular, fazendo com o meio tenha as condições ideais para o crescimento e verificando esse crescimento.

d) realizar triplicatas também no experimento em meio líquido. Além disso, será realizado um novo experimento com cada isolado em Caldo Sabouraud, porém, com acréscimo diário do corante com a mesma concentração utilizada para os outros experimentos. Segundo Saratale *et al.* (2009), utilizando esta metodologia poderia se avaliar qual isolado apresenta maior taxa de descoloração diária em relação ao contínuo acréscimo de corante. Espécies com esta característica apresentam grande potencial biotecnológico e importância comercial para a descoloração de corante.

e) para as leituras das absorbâncias retirar 3mL de cada cultivo conforme foi utilizado por Saratale *et al.* (2009). O presente estudo utilizou apenas 1,5mL.

f) realizar a centrifugação das alíquotas por 15 minutos, conforme Saratale *et al.* (2009), o presente trabalho centrifugou por 5 minutos.

g) fazer os testes de biossorção e biodegradação com os isolados com potencial para descobrir qual o princípio de descoloração que as leveduras estão utilizando.

h) realizar novas coletas em ambientes aquáticos que sofram com o descarte de efluentes têxteis para isolar possíveis leveduras que já estejam presentes no ambiente contaminado. Um bom exemplo de local para as coletas seria o Rio dos Sinos- RS, Brasil. Este local já sofreu com um impacto ambiental relacionado ao descarte de efluente contaminado com corantes. O princípio condiz com a utilização da microbiota de leveduras presentes no ambiente que já possuam a plasticidade em relação à toxicidade de corantes.

REFERÊNCIAS

ADEDAYO, O. *et al.* Decolourization and detoxification of methyl red by aerobic bacteria from a wastewater treatment plant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 545-550, 2004.

AZEVEDO, J.L. de; ESPOSITO, E. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

BEMVENUTI, C.E.; ROSA-FILHO, J. S. **Estrutura e dinâmica de macroinvertebrados bentônicos dos ambientes estuarinos do Rio Grande do Sul: um estudo de caso**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/brnd/round5/round5/guias/sismica/refere/Estu%E1rios%20Sul.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2010.

BUENO, L.C.P. **Isolamento e caracterização fisiológica de leveduras aquáticas da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, RS, Brasil**. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental e Costeira) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé, 2010.

BOGUSLAWSKA-WAS, E.; DABROWSKI, W. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v.203, n.5, p.451-458, 2001.

CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. **Recursos microbiológicos para biotecnologia**. Disponível em: <http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_recursos_biologicos.pdf>. Acesso em: 16 out. 2010.

CARVALHO, C. de. **Produção de ligninases por basidiomicetos através de fermentação em estado sólido, caracterização e aplicação das enzimas**. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2005.

CHEN, K.C. *et al.* Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 57-68, Feb. 2002.

COMITÊ DE GERENCIAMENTO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TRAMANDAÍ (Rio Grande do Sul) (Org.). **Plano da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí**. Osório, 2007.

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

DELLAMATRICE, P.M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuais de Americana, SP**. 137f. Tese (Doutorado em Ecologia de Agrossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

DE SOUZA, C.G.; PERALTA, R.M. 2003. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 43, n. 4, p. 278-286, 2003.

DONMEZ, G. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 30, n. 3, p. 363-366, Mar. 2002.

FORGIARINI, E. **Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima Horseradish peroxidase (HRP)**. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FUJIMOTO, N. S. V. V. M.; *et al.* **Rio Grande do Sul northern littoral: social-economic indicators and major environmental problems**. Disponível em: <ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/made/article/download/4632/6747>. Acesso em: 10 set. 2010.

GILL, P.K.; ARORA, D.S.; CHANDER, M. Biodecolourization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia* spp. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 28, n. 4, p. 201-203, Apr. 2002.

GUARATINI, C.I. E ZANONI, V.B. Corantes Têxteis. **Química Nova**, São Paulo, n. 23, p. 71-78. 2000.

GUPTA, A.K.; PAL, A.; SAHOO, C. Photocatalytic degradation of a mixture of Crystal Violet (Basic Violet 3) and Methyl Red dye in aqueous suspensions using Ag⁺ doped TiO₂. **Dyes and pigments**, London, v. 69, n. 3, p. 224-232, 2006.

HAGLER, A.N. *et al.* Yeast as an example of microbial diversity in Brazilian ecosystems. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 225-244, 1995.

HUNGER, K. **Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications.**

Disponível em, :

<http://uqu.edu.sa/files2/tiny_mce/plugins/filemanager/files/4300270/al./industrial%20dyes.pdf> . Acesso em: 18 abr. 2011.

IRGANG, B. E. **Macrófitas aquáticas da Planície Costeira do RS.** Porto Alegre : [s. n.], 1996.

KAMIDA, H.M. *et al.* Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 04, p. 629- 632, Feb. 2005.

KARAM, J.; NICEL, J.A. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 141-153, June. 1997.

KAPUSTA, S.C. **Estrutura e distribuição espacial da comunidade de meiofauna do complexo estuarino-lagunar Tramandaí-Armazém- RS:** Situação de Inverno e Verão. Instituto de Biociências. 106. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

KHEHRA, M.S. *et al.* Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. **Dyes and Pigments**, London, v. 67, n. 01, p. 55–61, Oct. 2005.

KIM, S.Y.; YOUNG AN, J.; KIM, B.W. The effects of reductant and carbon source on the microbial decolorization of azo dyes in an anaerobic sludge process. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 76, n.1, p. 256-263, Oct. 2008.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts, a taxonomic study.** 4th. New York : Elsevier, 1998.

LACERDA, C.A.M. **Avaliação da efetividade de remoção de cor de soluções de corantes e efluentes têxteis pelo tratamento fotocatalítico com óxidos de ferro recobertos com dióxido de titânio.** 114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

LIBKIND D. *et al.* *Sporidiobolus longiusculus* sp. nov. and *Sporobolomyces patagonicus* sp. nov., novel yeasts of the Sporidiobolales isolated from aquatic environments in Patagonia, Argentina. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** Reading, v. 55, n. 1, p. 503-509, Sept. 2005

LUCAS, M.S. *et al.*. Biodegradation of the diazo dye Reactive black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. **Enzyme and Microbial Technology.** New York, v. 39, n. 1, p. 51–55. Sept. 2006

MACHADO, N. A. F. **Análise multi-escalonada e diagnóstico ambiental aplicado ao litoral norte da planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil: utilização da morfometria, sedimentometria, geoquímica dos sedimentos, física e química da água das lagoas costeiras.** v.1. Dissertação (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

MARTINS, L.R. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação.** 208f. Tese (Mestrado em Química)- Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MAUTONE, J. N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil.** 110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MELO, D.L.F.M. **Potencial biotecnológico do umbu:** perspectivas para o semi-árido. 100 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente)- Núcleo de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2005.

MOHANA, S. *et al.* Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. **Bioresource Technology,** Essex, v. 99, n. 3, p. 562-569, Sept. 2008.

MORAES, L.A.R. **Aplicação da fotocatalise heterogênea para a degradação de corantes de uma indústria de cosméticos**. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MORI, M.; CASSELA, R. J. Estudo da sorção do corante catiônico cristal de violeta por espumas de poliuretano em meio aquoso contendo dodecilsulfato de sódio. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2039- 2045, Sept. 2009.

MOU, D.G.; LIM, K.K.; SHEN, H.P. Microbial agents for decolorization of dye wastewater. **Biotechnology Advances**. New York, v. 9, n. 4, p. 613-622, Sept. 2002.

NACHIYAR, C.V.; RAJKUMAR G.S. Degradation of a tannery and textile dye, Navitan Fast Blue S5R by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, Netherlands, v. 19, n. 6, p. 609-614, 2003.

NOVOTNY, C. *et al.* Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 113-122, Aug. 2001.

OLIVEIRA, L.H. dos S. *et al.* Descoloração de corantes de corantes sintéticos por basidiomicetos tropicais brasileiros. **Naturalia**, São Paulo, n. 33, p. 85-99, 2010.

PETERNEL, I.; KOPRIVANAC, N.; KUŠIĆ, H. UV-based processes for reactive azo dye mineralization. **Water Research**, New York, v. 40, n. 3, p. 525-532, Feb. 2006.

POZDNYAKOVA, N.N. ; RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; TURKOVSKAYA, O.V. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 30, n.1, p. 19-24, July. 2004.

RAGHUKUMAR, C. Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 10, p. 1222-1226, 2000.

RAMALHO, P.A. *et al.* Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, p. 848-854, July. 2002.

RAMALHO, P.A. *et al.* Characterization of Azo Reduction Activity in a Novel Ascomycete Yeast Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 4, p. 2279-2288, Apr. 2004.

RAMBO, Balduino. **A FISIONOMIA DO RIO GRANDE DO SUL**. 3. ed. São Leopoldo: Unisinos, 2000.

RODRIGUES, H.D.P.; **Potencial biossortivo e biodegradativo das células de “*Saccharomyces cerevisiae*” livres e imobilizadas em alginato de cálcio na remoção de corantes têxteis**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Programa de pós-graduação em ciências biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2010.

ROSA, C.A. *et al.* Yeast diversity in a mesotrophic lake on the karstic plateau of Lagoa Santa, MG-Brazil. **Hydrobiologia**, The Hang, v. 308, n. 2, p. 103-108, 1995.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. Yeasts and yeast-like organisms isolated from fish-pond waters. **Acta Microbiologica Polonica** , Warszawa, v. 44, n. 2, p. 181-189, 1995.

SANTOS, S.K. **Processo fotocatalítico acoplado à microfiltração para degradação de poluente orgânicos recalcitrantes**. 127f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Programa de Pós Graduação em Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

SARATALE, R.G. *et al.* Decolorization and biodegradation of textile dye Navy blue HER by *Trichosporon beigelii* NCIM-3326. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 166, n. 2, p. 1421-1428, July. 2009.

SAUER, T. **Degradação fotocatalítica de corante e efluente têxtil**. 124f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SCHWARZBOLD, A. **Influência da morfologia no balanço de substâncias e na distribuição de macrófitos aquáticos nas lagoas costeiras do Rio Grande do Sul**. 95f. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1982.

SCHWARZBOLD, A. Gênese e morfologia das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul - Brasil. **Amazoniana**, Manaus, v. 9, n. 1, p. 87-104, Dec. 1984.

SECRETARIA DE PLANEJAMENTO E MEIO AMBIENTE DE OSÓRIO, Rio Grande Do Sul (Org.). **Plano Ambiental Municipal**. Disponível em: <<http://www.osorio.rs.gov.br/sites/9100/9172/PDirAmbOsorio.PDF>>. Acesso em: 10 out. 2010.

SILVA, E.R. **Estudo da cinética e dos mecanismos de fototransformação do corante acridina laranja na sua interação com sistemas micro-organizados sob a ação da luz visível**. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SOARES, G. M. B. **Aplicação de Sistemas enzimáticos à degradação de corantes têxteis**. 173f. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil) – Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2000.

SOUZA, A.F.; ROSADO, F.G. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 121-139, Jan./Apr. 2009.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. Yeasts and yeast-like organisms isolated from fish-pond waters. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 44, n. 2, p. 181-189, 1995.

TOMMAZELI, L. J. **Contribuição ao estudo dos sistemas deposicionais Holocênicos e Nordeste da Província Costeira do Rio Grande do Sul com ênfase ao sistema eólico**. Tese (Doutorado em Geologia)- Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

TOMAZELLI, L. J.; VILLWOCK, J. A.. **Geologia costeira do Rio Grande do Sul**. Notas Técnicas, Porto Alegre, Centro de Estudos de Geologia Costeiras e Oceânicas/ UFRGS, n. 8, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

WOLLMANN, R. D. **Aspectos Ambientais de Conservação e Ocupação do Complexo estuarino Tramandaí, Aramazém/RS**. 87f. Dissertação de Mestrado em Gestão e Auditoria Ambiental. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria- Espanha. Fundação Universitária Íberoamericana, 2004.

WONG, P. K.; YUEN, P.Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS 13. **Water Research**, New York, n. 30, v. 7, p.1736-1744, July. 1996.

WOOLLETT, L. L.; HEDRICK, L. R.. Ecology of yeasts in polluted water. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 36 , n.1, p. 427-435, 1970.

YANG, Q. *et al.* Decolorization of an azo dye, *Reactive Black 5* and MnP production by yeast isolate: *Debaryomyces polymorphus* . **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 249-253, July. 2003.

ZHENG, Z. *et al.* Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. **Process Biochemistry**, London, v. 34, n. 1, p. 31-37, Jan. 1999.

APÊNDICE

Apêndice a: Tabela com os valores diários da absorvância

Amostra	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia	6° dia	7° dia
Corante	0,262	0,218	0,176	0,291	0,116	0,116
Branco	0,183	0,128	0,111	0,114	0,187	0,187
TR 31	0,296	0,073	0,073	0,132	0,023	0,023
TR 31	0,293	0,077	0,07	0,134	0,041	0,03
TR 31	0,295	0,076	0,069	0,132	0,051	0,017
Média	0,294	0,0753	0,0706	0,132	0,038	0,023
TR 17	0,225	0,266	0,686	0,195	0,048	0,016
TR 17	0,232	0,26	0,698	0,2	0,035	0,02
TR 17	0,238	0,262	0,69	0,182	0,032	0,036
Média	0,237	0,262	0,691	0,192	0,038	0,024
MAR A1	0,152	0,131	0,119	0,212	0,056	0,058
MAR A1	0,154	0,135	0,12	0,208	0,056	0,048
MAR A1	0,156	0,136	0,121	0,209	0,063	0,036
Média	0,154	0,134	0,12	0,209	0,058	0,047
ARM B4	0,179	0,195	0,115	0,218	0,087	0,021
ARM B4	0,167	0,151	0,111	0,217	0,119	0,039
ARM B4	0,169	0,141	0,11	0,217	0,09	0,057
Média	0,171	0,1623	0,112	0,217	0,098	0,039
ARM D4	0,176	0,186	0,154	0,252	0,087	0,018
ARM D4	0,175	0,178	0,149	0,247	0,089	0,014
ARM D4	0,176	0,174	0,154	0,245	0,029	0,017
Média	0,1756	0,179	0,152	0,248	0,068	0,016
TR 02	0,104	0,121	0,168	0,137	0,029	*
TR 02	0,103	0,121	0,168	0,11	0,013	*
TR 02	0,093	0,121	0,169	0,127	0,018	*
Média	0,1	0,121	0,1683	0,1246	0,02	*
EST A5	0,129	0,106	0,174	0,146	0,064	*
EST A5	0,125	0,114	0,173	0,128	0,053	*
EST A5	0,121	0,109	0,173	0,152	0,058	*
Média	0,125	0,109	0,173	0,142	0,058	*

Autora, 2011.