



**Estudos de descoloração de corantes para couro
pelo isolado nativo *Trametes villosa* SC10**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Santiago Ortiz-Monsalve

**PORTO ALEGRE
2015**

Estudos de descoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa* SC10

Santiago Ortiz-Monsalve

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química

Área de Concentração:
Pesquisa e Desenvolvimento de processos

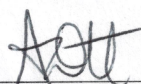
Orientadora:
Prof. Dra. Mariliz Gutterres Soares

Co-orientadora:
Prof. Dra. Patrícia Valente

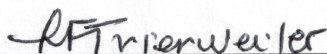
**PORTO ALEGRE
2015**

A Comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação **Estudos de descoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa* SC10**, elaborada por Santiago Ortiz-Monsalve, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

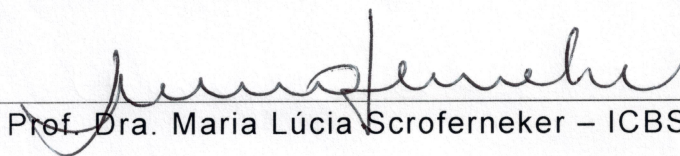
Comissão Examinadora:



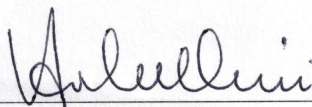
Prof. Dra. Aline Dettmer - UCS



Prof. Dra. Luciane Ferreira Trierweiler – DEQUI/UFRGS



Prof. Dra. Maria Lúcia Scoferneker – ICBS/UFRGS



Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini – UNISC

*A mis Padres.
Poco a poco van recogiendo
los frutos de su constancia.*

LOCAL DE TRABALHO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO), do Departamento de Engenharia Química, e no Laboratório de Micologia, do Departamento de Microbiologia, ambos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - Brasil.

O projeto foi desenvolvido graças ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Ministério das Relações Exteriores (MRE) por intermédio da Divisão de Temas Educacionais (DCE) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTO

São muitas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram na elaboração deste trabalho, desde as que apoiaram minha formação acadêmica até as que tiveram participação direta no projeto de pesquisa. Quero expressar toda minha gratidão a todas essas pessoas:

À professora Mariliz Gutterres, não só pela orientação acadêmica, mas também pela amizade, pela confiança depositada e por me oferecer a oportunidade de vir ao Brasil e trabalhar junto a ela no seu grupo de pesquisa LACOURO.

À professora Patrícia Valente, pela disponibilidade, pelo apoio acadêmico e por me receber no Laboratório de Micologia e no seu grupo de pesquisa.

À Juliana Dornelles, colega de pesquisa, pela grande ajuda na parte experimental. Sem ela o material apresentado aqui não seria possível.

À Carolina Scaraffuni, colega e grande amiga, pela amizade e pela *significativa* contribuição na parte estatística e experimental deste trabalho.

Ao Mauricio Ramirez, compatriota e amigo, pela amizade e pelo apoio na parte da identificação molecular.

Ao professor Valeriano Corbellini, pelo apoio na coleta, pela boa disposição e pelo interesse acadêmico.

À Lizaveta Romanov, pelo carinho, pela paciência e pelo apoio incondicional, especialmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, pelo suporte e apoio, pelo esforço, pelo carinho e pela formação. Sem vocês não teria chegado até aqui.

Aos meus amigos e familiares, obrigado pelo apoio. Que saudades!

Aos meus colegas do grupo de pesquisa e do programa de pós-graduação em Engenharia Química, pelos bons momentos compartilhados.

Aos meus professores e amigos Maria Yepes e Jersson Plácido, por me incentivar a seguir na mesma área de pesquisa, pela formação acadêmica e pelo apoio na distância.

SUMÁRIO

Local de trabalho	i
Agradecimento	iii
Conteúdo	v
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de equações	xiii
Lista de abreviaturas, nomenclatura e unidades	xiv
Resumo	xvii
Abstract.....	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos da pesquisa.....	5
1.2. Histórico da linha de pesquisa	6
1.3. Estrutura da dissertação	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. Transformação da pele em couro	10
2.2. Tingimento de couro.....	11
2.2.1. Generalidades da etapa de tingimento	11
2.2.2. Corantes.....	12
2.3. Efluentes de tingimento.....	15
2.4. Tratamento de efluentes	17
2.5. Composição da madeira: a lignina.....	19
2.6. Biodegradação da madeira: ligninólise	25
2.6.1. Fungos de podridão branca ou mole	26
2.6.2. Fungos de podridão parda ou castanha.....	27
2.7. Fungos de podridão branca	28
2.7.1. Mecanismos de biodegradação da lignina dos WRF.....	29
2.7.2. Metabolismo dos fungos de podridão branca: catabolismo da lignina	32
2.8. Sistema enzimático de degradação da lignina	33
3. ESTADO DA ARTE.....	34
3.1. Aplicações biotecnológicas dos fungos de podridão branca	35
3.1.1. Aplicações industriais dos fungos de podridão branca.....	35
3.1.2. Aplicações dos fungos de podridão branca em biorremediação.....	36

3.2. Os fungos de podridão branca no tratamento de corantes sintéticos.....	39
3.3. Mecanismos dos WRF na descoloração de corantes sintéticos.....	42
3.3.1. Biossorção de corantes por fungos	43
3.3.2. Bioacumulação fúngica de corantes	44
3.3.3. Biodegradação de corantes por fungos de podridão branca	45
3.3.4. Biodegradação vs. Biossorção	46
3.4. Antecedentes da biodegradação de corantes azoicos por WRF	47
3.4.1. Histórico da biodegradação de corantes azoicos por WRF	48
3.4.2. Atualidade da biodegradação de corantes por fungos WRF	50
3.4.3. Perspectiva, longe da real aplicação?	56
3.5. Fungos da podridão branca e a indústria de couro	56
3.6. <i>Trametes villosa</i> em processos de biorremediação	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1. Materiais	61
4.1.1. Produtos químicos	61
4.1.2. Corantes e testes espectrofotométricos	63
4.2. Coleta e isolamento de microrganismos.....	66
4.2.1. Localização e descrição da área de coleta	66
4.2.2. Coleta e armazenamento de amostras	67
4.2.3. Isolamento de cepas fúngicas	68
4.2.4. Conservação e reativação dos isolados.....	68
4.3. Ensaio em meio sólido	69
4.3.1. Meio de cultura sólido e preparação do inóculo.....	69
4.3.2. Triagem da produção de enzimas ligninolíticas	70
4.3.3. Triagem de descoloração de corantes para couro em meio sólido.....	71
4.4. Ensaio em meio líquido	71
4.4.1. Preparação do inóculo.....	72
4.4.2. Meio de cultura líquido.....	72
4.4.3. Triagem de descoloração de corantes para couro em meio líquido.....	72
4.5. Avaliação monovariável do efeito das condições de operação no processo de biotransformação de corantes para couro em meio líquido	73
4.5.1. Avaliação do efeito da concentração inicial de corante	74
4.5.2. Avaliação do efeito do pH.....	74
4.5.3. Avaliação do efeito da agitação.....	74

4.5.4. Avaliação do efeito da temperatura.....	74
4.6. Métodos Analíticos	75
4.6.1. Método de medição da atividade enzimática	75
4.6.2. Método de medição do consumo de glicose.....	78
4.6.3. Método de medição da produção de biomassa	79
4.6.4. Método de medição da descoloração	80
4.7. Planejamento experimental para otimização das variáveis de operação.....	80
4.7.1. Planejamento experimental	81
4.7.2. Ajuste do modelo estatístico.....	84
4.7.3. Estudos de descoloração com as condições de operação otimizadas	84
4.8. Identificação molecular dos isolados fúngicos	84
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
5.1. Coleta e isolamento de fungos	87
5.2. Ensaio de descoloração em meio sólido	89
5.2.1. Triagem de produção de enzimas ligninolíticas	90
5.2.2. Triagem de descoloração de corantes para couro	93
5.3. Ensaio em meio líquido	95
5.3.1. Experimentos de descoloração em meio líquido	95
5.3.2. Avaliação do efeito da concentração inicial de corante	97
5.3.3. Avaliação do efeito do pH.....	100
5.3.4. Avaliação do efeito da agitação.....	102
5.3.5. Avaliação do efeito da temperatura.....	104
5.3.6. Análise da produção de enzimas ligninolíticas	106
5.3.7. Análise do metabolismo do isolado <i>Trametes</i> sp. SC10	111
5.3.8. Mecanismo de biossorção	113
5.4. Planejamento experimental para otimização das variáveis de operação.....	114
5.4.1. Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional	114
5.4.2. Metodologia de Superfície de Resposta aplicada à descoloração do corante Vermelho 357 com o isolado <i>Trametes</i> sp. SC10.....	119
5.4.3. Estudos de descoloração com as variáveis otimizadas.....	122
5.5. Identificação molecular do isolado <i>Trametes</i> sp. SC10	126
6. CONCLUSÕES	127
7. REFERÊNCIAS	129

LISTA DE FIGURAS

2. Revisão bibliográfica

2.1. Ilustração esquemática da arquitetura molecular do tecido de madeira	19
2.2. Estrutura química da celulose.....	20
2.3. Estrutura química dos monolignóis, precursores da lignina.....	22
2.4. Estrutura química das unidades aromáticas da lignina.....	22
2.5. Estrutura química das principais ligações entre monômeros de lignina	24
2.6. Estrutura química da lignina segundo o modelo de Adler.....	25
2.7. Ciclo global do carbono (compostos lignocelulósicos).....	29
2.8. Tipos de ataque dos WRF à lignina.....	30

3. Estado da arte

3.1. Estrutura química de alguns compostos xenobióticos degradados por WRF	37
3.2. Modelo da estrutura química da lignina.....	40
3.3. Estrutura química de corantes azoicos usados industrialmente.....	41
3.4. Espécies de WRF que se destacam na biodegradação de corantes azoicos.....	49

4. Materiais e Métodos

4.1. Estrutura química dos corantes para couro estudados no trabalho	65
4.2. Mapa de localização do cinturão verde de Santa Cruz do Sul, RS	66
4.3. Mapa de localização da área de coleta	67

5. Resultados e Discussão

5.1. Amostras de basidiocarpos dos fungos coletados	87
5.2. Basidiocarpo do fungo coletado SC10	88
5.3. Isolados puros crescendo no meio MEA-BC.....	88
5.4. Características morfológicas do Isolado SC10.....	89
5.5. Fotografias da triagem em meio sólido para produção de enzimas do LDS.....	91
5.6. Fotografia da triagem em meio sólido para descoloração de corantes para couro	94
5.7. Descoloração de corantes para couro pelo isolado <i>Trametes</i> sp. SC10 em meio líquido	95
5.8. Fotografia da triagem em meio líquido para descoloração de corantes para couro pelo isolado <i>Trametes</i> sp. SC10.....	96
5.9. Frascos Erlenmeyer contendo o meio extrato de malte líquido (MEB) com o corante <i>Acid Red 357</i> em diferentes concentrações	97

5.10. Cinética de descoloração do corante Vermelho 357 pelo isolado <i>Trametes</i> sp. SC10 em diferentes concentrações de corante	98
5.11. Cinética de descoloração do corante Vermelho 357 pelo isolado <i>Trametes</i> sp. SC10 em diferentes valores de pH.....	100
5.12. Efeito da agitação na capacidade de descoloração de <i>Trametes</i> sp. SC10	103
5.13. Diferenças morfológicas e de descoloração causadas pelo efeito da agitação em <i>Trametes</i> sp. SC10	102
5.14. Efeito da temperatura na capacidade de descoloração de <i>Trametes</i> sp. SC10	103
5.15. Relação entre descoloração e a atividade da enzima lacase pelo Isolado <i>Trametes</i> sp. SC10	106
5.16. Relação entre descoloração e a atividade da enzima MnP pelo Isolado <i>Trametes</i> sp. SC10.....	107
5.17. Análise do metabolismo na descoloração do corante Vermelho 357 pelo isolado SC10.....	111
5.18. Avaliação qualitativa da biossorção do corante Vermelho 357 pela biomassa do isolado <i>Trametes</i> sp. SC10	112
5.19. Biomassa do isolado <i>Trametes</i> sp. SC10 após teste com metanol	113
5.20. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos dos fatores estudados no CCD sobre a variável de resposta, remoção de corante Vermelho 357.....	117
5.21. Superfície de resposta do efeito da Agt. e da T na resposta Desc. (%)	120
5.22. Superfície de resposta do efeito da Agt. e da [C] na resposta Desc. (%)	121
5.23. Comparação da relação entre descoloração e a atividade da enzima lacase pelo isolado <i>Trametes</i> sp. SC10 (condições de operação com e sem otimizar).....	124
5.24. DNA genômico extraído de duas cepas do isolado <i>Trametes</i> sp. SC	125
5.25. Resultados dos segmentos amplificados	125

LISTA DE TABELAS

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Principais grupos cromóforos de corantes.	13
2.2. Principais características dos corantes usados no tingimento de couro	14
2.3. Funções da lignina em plantas	21
2.4. Fungos degradadores da lignina: características químicas e anatômicas	31

3. Estado da arte

3.1. Características e vantagens dos WRF e do seu LDS ao ser aplicado em processos de biorremediação de compostos xenobióticos.....	37
3.2. Compostos xenobióticos degradados pelo LDS de WRF	38
3.3. Aplicação de fungos na remoção de corantes industriais por processos de biossorção e bioacumulação.....	44
3.4. Comparação entre os mecanismos de transformação de corantes por WRF	47
3.5. Pesquisas sobre biodegradação de corantes envolvendo o uso de WRF publicadas entre 1990-1998	53
3.6. Pesquisas sobre biodegradação de corantes envolvendo o uso de WRF publicados entre 2005-2015	54
3.7. Pesquisas sobre biodegradação de corantes envolvendo o uso de WRF em biorreatores e ou/ imobilização de células.....	55
3.8. Pesquisas sobre biodegradação efluentes reais envolvendo o uso de WRF	57

4. Materiais e Métodos

4.1. Estrutura molecular e características dos substratos para enzimas ligninolíticas	62
4.2. Características físico-químicas dos corantes para couro usados no trabalho.	64
4.3. Composição do meio sólido usado na triagem em meio sólido.....	70
4.4. Mistura de reação para medição da atividade Lac.....	76
4.5. Mistura de reação para medição da atividade LiP	77
4.6. Mistura de reação para medição da atividade MnP	78
4.7. Resumo dos procedimentos analíticos empregados	80
4.8. Matriz genérica para o planejamento CCD	82
4.9. Valores reais das variáveis do CCD e seus respectivos níveis codificados.....	82
4.10. Planejamento delineamento composto central rotacional CCD	83
4.11. Primers para PCR que usados na amplificação das regiões 18S e ITS	85

5. Resultados e Discussão

- 5.1. Resultados de descoloração pelo isolado *Trametes* sp. SC10 observados para os experimentos do planejamento experimental CCD 116
- 5.2. ANOVA do planejamento Delineamento Composto Central Rotacional 117

LISTA DE EQUAÇÕES

4. Materiais e Métodos

4.1. Descoloração.....	73
4.2. Atividade enzimática	76
4.3. Produção de Biomassa	79
4.4. Modelo estatístico gerado pelo planejamento experimental CCD	81
4.5. Hipóteses nula.....	83
4.6. Hipóteses alternativa.....	83

5. Resultados e Discussão

5.1. Modelo de descoloração, Desc. (%).	118
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

NOMENCLATURA

AB161	Corante Azul 161 ou <i>Acid Blue 161</i>
AB210	Corante Preto 210 ou <i>Acid Black 210</i>
AB414	Corante Marrom 414 ou <i>Acid Brow 414</i>
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Ácido sulfônico) sal diamônio
ANOVA	Análise de variância, do inglês " <i>Analysis of Variance</i> "
AR357	Corante Vermelho 357 ou <i>Acid Red 357</i>
CCD	Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional, do inglês " <i>Central Composite Rotational</i> "
CM	Cloreto de Manganês II, $MnCl_2$
DMP	Xilenol, 2,6-dimetóxfenol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GUA	Guaicol, 2-metóxfenol
ITS	Espaçador Transcrito Interno, do inglês " <i>Internal Transcribed Spacer</i> "
Lac	Enzima Lacase
LDS	Sistema enzimático ligninolítico, do inglês " <i>lignin degradation system</i> "
LiP	Enzima Lignina Peroxidase
MEA	Meio comercial Ágar Extrato de Malte, do inglês " <i>Malt Extract Agar</i> ".
MEB	Meio comercial Caldo Extrato de Malte, do inglês " <i>Malt Extract Broth</i> "
MnP	Enzima Peroxidase dependente de Manganês
PCR	Reação de polimerização em cadeia, do inglês " <i>Polymerase Chain Reaction</i> "
PDA	Meio comercial Ágar Batata Dextrose, do inglês " <i>Potato Dextrose Agar</i> "

RSM	Metodologia de superfície de resposta, do inglês “ <i>Response Surface Methodology</i> ”
SC10	Isolado de <i>Trametes</i> sp., identificado como <i>Trametes villosa</i>
SYR	Siringaldazina , 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-benzaldeído azina
VA	Álcool veratrílico, 3,4-dimetóxi-benzil álcool
WRF	Fungos de podridão branca, do inglês “ <i>white-rot fungi</i> ”

SÍMBOLOS E UNIDADES

Símbolo	Definição	Unidade
ABS.	Absorbância, ABS_{λ}	I/I_0
$ABS_{\lambda_{max}}$	Absorbância no λ_{max} ABS_{λ}	(%)
AE.	Atividade enzimática.	UL^{-1}
agt.	Agitação orbital	rpm
ϵ	Coefficiente de extinção molar	$mM^{-1} cm^{-1}$
λ	Comprimento de onda	nm
λ_{max}	Comprimento de onda no UV/Vis com máxima ABS.	nm
[C]	Concentração	MgL^{-1} ; mM; M; N, (%w/v)
Descol.	Descoloração, remoção de corante.	(%)
pH	Logaritmo decimal do inverso da atividade de ions hidrogênio numa solução.	
T	Temperatura	$^{\circ}C$
t	Tempo	min; h; dia
vol.	Volume	μL , mL, L

RESUMO

O couro é um produto que tem uma crescente demanda mundial. O Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo, sendo um dos principais produtores e exportadores de couro a nível mundial. Assim, esse setor é um dos motores da economia do país. No estado do Rio Grande do Sul, essa indústria tem particular importância no desenvolvimento socioeconômico da região. No processo produtivo, a etapa de tingimento é importante para o acabamento do produto, empregando-se uma variedade de corantes para conferir cor uniforme e tonalidade de interesse aos artigos. No entanto, apenas uma porcentagem do corante fixa-se no couro, e uma quantidade residual fica no efluente. Nos ecossistemas, os corantes podem virar uma ameaça para o meio ambiente e a saúde humana. Os tratamentos físicos e químicos usuais desses efluentes são muitas vezes caros e complexos e têm limitações para o tratamento de certos compostos que, algumas vezes, não são totalmente removidos. Isso pode gerar problemas ambientais posteriores. No presente estudo, foi avaliado o potencial de fungos de podridão branca coletados na cidade de Santa Cruz do Sul, RS, para descolorir corantes para couro. O isolado SC10, caracterizado morfológicamente dentro do gênero *Trametes*, demonstrou a sua capacidade para produzir enzimas ligninolíticas extracelulares e para descolorir quatro corantes em meio sólido. Numa avaliação secundária em meio de cultura líquido, o isolado removeu $96,07 \pm 0,56\%$, $90,96 \pm 0,49\%$, $83,90 \pm 0,57\%$ e $95,88 \pm 0,61\%$ dos corantes Azul 161, Marrom 414, Preto 210 e Vermelho 357, respectivamente. Ensaio adicionais com o corante Vermelho 357, realizados para elucidar os mecanismos de descoloração, mostraram níveis notáveis de lacase durante o tratamento ($2327,4 \pm 144,0 \text{ UL}^{-1}$), o que sugere o envolvimento dessa enzima na remoção do corante. Contudo, o mecanismo de biossorção também esteve associado à descoloração. Avaliações do efeito das condições operacionais mediante métodos monovariáveis demonstraram que os melhores rendimentos de descoloração obtiveram-se com maior agitação, 150-200 rpm, menor concentração de corante, 100-300 mg L⁻¹, e na faixa de temperatura entre 25 a 30 °C. O pH ideal esteve na faixa de 4,5 a 5,5, entretanto, um pH alcalino não influenciou nos rendimentos de descoloração. O uso de um planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional e a aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta, confirmaram os efeitos significativos da temperatura, da agitação e da concentração inicial de corante. A aplicação do ponto ótimo (25 °C, 100 mgL⁻¹ de corante, pH 4,5 e 200 rpm) permitiu atingir $96,58 \pm 0,61\%$ de descoloração e $2549,63 \pm 61,49 \text{ UL}^{-1}$ de atividade lacase. Finalmente, o isolado SC10 foi identificado como *Trametes villosa*, mediante uma análise molecular da região ITS1-5.8S-ITS2. Esse fungo é considerado um bom candidato para o tratamento de águas residuais poluídas com corantes e banhos de tingimento da indústria coureira.

ABSTRACT

Leather is a product with growing global demand. Brazil has the largest herd in the world and is one of the leading manufacturers and exporters of leather in the world. So this sector is an economic engine for this country. In State of Rio Grande do Sul, this industry has particular importance in the socioeconomic development of the region. Dyeing is an important step in leather manufacture process, in which different classes of dyes are used to provide a uniform color and a variety of hues in the product. However, many dyes suffer from incomplete exhaustion and a portion does not get fixed to the leather and is discharged with the effluent, which can become a threat to the environment and human health. Dye-containing wastewater is regularly treated by chemical and physical-chemical treatment processes but, due to the low biodegradability of dyes, these systems are usually complex, increase costs and/or present limited applicability. Sometimes, the dyes are not totally removed or degraded, which can lead to further environmental problems. Hence in the present study, an attempt has been made to assess the potential of native white-rot fungi, collected in Santa Cruz do Sul – RS, to decolorize tannery dyes. An isolate, strain SC10, was identified as a member of genus *Trametes* based on the morphological characteristics. In a first screening, this strain showed their ability to produce extracellular ligninolytic enzymes and decolorize four leather dyes in solid medium. In a secondary screening in liquid culture, the isolated removed $96.07 \pm 0.56\%$, $90.96 \pm 0.49\%$, $83.90 \pm 0.57\%$ and $95.88 \pm 0.61\%$ of Acid Blue 161, Acid Brown 414, Acid Black 210 and Acid Red 357, respectively. Additional tests with Acid Red 357, conducted in order to elucidate the mechanism involved in the dye decolorization process, showed remarkable levels of laccase activity ($2327.4 \pm 144.0 \text{ UL}^{-1}$), suggesting the involvement of this enzyme on dye removal. However, the mechanism of biosorption was also associated with the decolorization process. Assessments of the effects of operating conditions, by single-variable method, indicated that the higher decolorization was reached with initial dye concentration at 100-300 mgL^{-1} , pH at 4.0-5.0, temperature at 25-30 °C and agitation speed at 150-200 rpm. These, except initial pH, were all found to be important from dye removal. Actually, alkaline pH values did not affect the decolorization. Additionally, these operational factors were studied and optimized by using a Central Composite Design (CCD) and Response Surface Methodology (RSM). The maximum decolorization of $96,58 \pm 0,61\%$ and laccase activity of $2549,63 \pm 61,49 \text{ UL}^{-1}$ were obtained at optimum conditions: concentrations initial of dye 100 mgL^{-1} , pH 4,5, temperature 25 °C and agitation 200 rpm. Further, the SC10 strain was identified as *Trametes villosa* based on ITS2-ITS1-5.8S rDNA gene sequence analysis. This fungus is considered a good candidate for the treatment of dye polluted wastewater from leather industry.

1

INTRODUÇÃO

Novas estratégias de sistemas biológicos estão ganhando importância no tratamento de efluentes contendo corantes sintéticos. Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que uma grande variedade de diferentes tipos de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e algas, tem a capacidade de degradar uma ampla gama de corantes industriais presentes nos efluentes (Ali, 2010; dos Santos et al., 2007; Fu; Viraraghavan, 2001; Saratale et al., 2011). A pesquisa biotecnológica tem se concentrado em um tipo de micro-organismo bastante avaliado: os fungos de podridão branca, que provaram o seu potencial para degradar vários contaminantes recalcitrantes, incluindo diferentes tipos de corantes azoicos, através de suas enzimas ligninolíticas oxidativas e não específicas pelo substrato (Baccar et al., 2011; Kiiskinen et al., 2004).

Essas enzimas produzidas por diversos tipos de micro-organismos, especialmente os WRF, têm atraído a atenção dos pesquisadores por suas características especiais, como a baixa especificidade pelo substrato, o fato de não requererem a adição ou a síntese de cofatores custosos e por serem extracelulares, estáveis e induzíveis (Enayatizamir et al., 2011; Park et al., 2007).

A capacidade de biotransformação de corantes industriais por WRF, como descoloração, biodegradação enzimática e mineralização, está relacionada com a produção desse sistema de enzimas ligninolíticas. No entanto, os mecanismos de biossorção e bioacumulação também são importantes na biotransformação (Kaushik; Malik, 2015). A pouca especificidade do sistema enzimático extracelular e a similaridade estrutural da lignina com a de algumas classes de corantes sintéticos permite o uso dos WRF e suas enzimas extracelulares para degradar a complexa estrutura aromática dos corantes industriais (Ali, 2010; Rodríguez-Couto, 2015; Wesenberg, 2003). Nas pesquisas disponíveis na literatura envolvendo o uso de WRF no tratamento de efluentes com corantes industriais, exploram-se quatro metodologias diferentes, entre as quais está uso do micro-organismo vivo em crescimento (livre ou encapsulado), o uso de células microbianas mortas, o uso de extratos enzimáticos produzidos pelos micro-organismos ou o uso das enzimas purificadas (Fu; Viraraghavan, 2001).

Uma das principais indústrias que demanda o uso de corantes sintéticos é a indústria de couro. Trata-se de uma das indústrias mais antigas do mundo, reconhecida como tal desde o período entre 1795-1750 a.C., quando foi definido oficialmente o salário dos curtidores no código de Hammurabi (Covington, 2009). Essa indústria milenar, que possui, certamente, mais de 5000 anos de história, tem destaque na economia global e, até agora, no século XXI, o couro é um produto que tem uma crescente demanda mundial. A indústria de couro tem significativa importância na economia brasileira devido ao fato de que o país possui o maior rebanho comercial bovino do mundo, estimado em 217,55 milhões de cabeças, 18,29% do valor mundial, sendo um dos principais produtores e exportadores de couro a nível global (ABQTIC, 2014; FAO, 2013).

Segundo a Secretaria Brasileira de Comércio Exterior (SECEX), a produção anual brasileira é de 44,5 milhões de couros, movimentando US\$ 3,5 bilhões, com 310 plantas curtidoras, 2.800 indústrias de componentes para couro e calçados e 120 fábricas de máquinas e equipamentos, empregando diretamente mais de 42.000 pessoas. Para o Rio Grande do Sul, estado que tem destaque tradicional na produção de couro, esse setor tem particular importância histórica no desenvolvimento socioeconômico da região (ABQTIC, 2014; CICB, 2013).

Do total de couros produzidos no Brasil em 2013, 7,6% correspondeu a couros *crust* (semi-acabados) e 40,1% a couros acabados (ABQTIC, 2014). Esse tipo de couro é submetido aos processos de tingimento, etapa importante da cadeia produtiva na qual é conferida a cor e a tonalidade de interesse aos produtos. Essa etapa é realizada em meio líquido, envolvendo grandes quantidades de água e diferentes tipos de corantes orgânicos sintéticos, entre os que se destacam os corantes ácidos devido ao seu método de fixação, principalmente no caso de tingimento de couro curtido ao cromo. Entre eles, os corantes que possuem grupos cromóforos azo são os mais usados, já que atribuem maiores uniformidade e estabilidade à cor do produto final (Covington, 2009; Heidermann, 1993).

Algumas vezes, visando conferir as características desejadas ao produto, os corantes são usados em excesso, para, assim, garantir uma maior fixação à superfície do couro. Os corantes têm diferentes taxas de exaustão e métodos de fixação. Os problemas de difusão e afinidade dos corantes à superfície do couro são responsáveis por apenas uma porcentagem do corante se fixar no produto, ficando uma quantidade remanescente no efluente (Kanth et al., 2008; Püntener, 2000).

Quando esses efluentes são enviados aos ecossistemas aquáticos sem o devido tratamento, os corantes em pequenas concentrações podem interferir em processos de fotossíntese, afetar a difusão de gases e reduzir-se a outros compostos aromáticos que podem virar uma ameaça para o meio ambiente e a saúde humana, além do efeito visual desagradável que produzem nas águas residuais (Rodríguez-Couto, 2013; Rodríguez-Couto, 2015; Taskin; Erdal, 2010).

Na indústria, existem vários métodos convencionais e avançados para a remoção de corantes das águas residuais. Estes incluem diversos processos físicos e químicos como redução química, precipitação, coagulação e floculação, decantação, adsorção, intercâmbio iônico, eletrodialise, osmose inversa, extração com solventes e separação por membranas (Espantaleón et al., 2003; Khayet et al., 2011; Martínez-Huitle; Brillas, 2009; Prato-Garcia et al., 2013; Rosales et al., 2011). Estes processos são muitas vezes caros e complexos, exigindo uma grande quantidade de recursos, como materiais químicos, água e energia, e têm limitações para o tratamento de certos compostos que algumas vezes não são totalmente removidos, o que pode gerar problemas ambientais posteriores (Baccar et al., 2011; Martínez-Huitle; Brillas, 2009). Assim, o uso de WRF no tratamento de efluentes com corantes industriais se converte em uma alternativa promissora para substituir e/ou complementar os métodos convencionais e avançados. No entanto, a maioria das pesquisas desenvolvidas para o tratamento de corantes usando WRF está focada em corantes e efluentes da indústria têxtil. Sabendo que os corantes para couro são estruturalmente diferentes dos corantes têxteis, uma vez que são sintetizados para tingimento de diferentes tipos de texturas (fibras de colágeno e algodão), pesquisar e avaliar a capacidade desses fungos para degradar corantes para couro, também é uma alternativa interessante.

Neste trabalho foi realizada uma coleta de vários fungos de podridão branca, que foram isolados e avaliados mediante uma triagem primária segundo a sua capacidade de produzir enzimas ligninolíticas e degradar corantes para couro em meio sólido. Um dos isolados destacou-se sobre os demais, pelo que foi avaliado mediante uma triagem secundária, segundo a sua capacidade de remover os corantes para couro em meio líquido. Vários experimentos adicionais, usando um dos corantes, foram realizados para analisar os mecanismos envolvidos no processo de descoloração. Entre eles, incluem-se um estudo monovariável para avaliar o efeito das condições de operação e um teste de otimização mediante um planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. Finalmente, a identificação molecular mediante a análise das regiões ITS e 18S, permitiu saber a espécie do fungo.

1.1. Objetivos da pesquisa

Este trabalho de dissertação de mestrado tem como objetivo principal encontrar espécies nativas de micro-organismos, especialmente fungos de podridão branca, com capacidade de descolorar corantes para couro e, assim, apresentar uma proposta alternativa para o tratamento de efluentes da etapa de acabamento molhado produzidos em curtumes. Os objetivos específicos são:

- Coletar e isolar basidiomicetos nativos com capacidade de produzir enzimas ligninolíticas, avaliada mediante uma triagem em meio sólido usando compostos indicadores da atividade enzimática;

- Avaliar o potencial dos isolados com a melhor capacidade de produzirem enzimas ligninolíticas na triagem inicial, para descolorir diferentes corantes para couro, tanto em meio sólido quanto líquido;

- Estudar e elucidar, mediante o uso de métodos analíticos, os mecanismos envolvidos no processo de descoloração, usando-se um dos corantes e o isolado com os melhores rendimentos de descoloração;

- Investigar e discutir, mediante o uso de metodologia monovariável, o efeito de diferentes variáveis operacionais, como temperatura, agitação, pH e concentração inicial de corante, no processo de descoloração;

- Otimizar as variáveis operacionais por meio da execução de um planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (CCD, do inglês "*Central Composite Rotational*") e a aplicação da metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês "*Response Surface Methodology*"), usando o corante e o isolado com os melhores rendimentos de descoloração;

- Identificar molecularmente o isolado com os melhores rendimentos de descoloração mediante uma análise das regiões 18S e ITS.

1.2. Histórico da linha de pesquisa

O Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO), é um grupo atuante no setor coureiro, desenvolvendo pesquisas que englobam a otimização do processo industrial, o tratamento de resíduos e a minimização do impacto ambiental. O grupo de tem firmado sua posição como núcleo de pesquisa em couros do Brasil, o que lhe concede um reconhecimento local e internacional. O LACOURO tem uma forte linha de pesquisa relacionada às questões ambientais da indústria de couro.

Embora este trabalho seja o primeiro dentro do grupo a estudar o uso de micro-organismos no tratamento de corantes, vários trabalhos prévios forneceram fundamentos teóricos à pesquisa. Nesses trabalhos foram estudadas estratégias biotecnológicas aplicadas à produção limpa e ao tratamento de efluentes e resíduos (entre eles, efluentes de tingimento com corantes). Por outro lado, trabalhos teóricos e práticos sobre o reuso de água, substâncias restritas na produção de couro e estações de tratamento, também contribuíram ao estudo.

No contexto da aplicação de processos biotecnológicos para a produção limpa, podem ser destacados os trabalhos de Souza (2010) e Andrioli (2012), que testaram a aplicação de enzimas para substituir o uso de produtos químicos agressivos ao meio ambiente nas operações de depilação e caleiro. Os autores Dettmer et al. (2012) estudaram a aplicação de enzimas de *B. subtilis* para essas mesmas finalidades. Outros trabalhos avaliaram a capacidade de variadas espécies de fungos para produzir substâncias com interesse industrial, como corantes (Fuck, 2014) e fungicidas (Fontoura, 2014).

Na parte de tratamento biológico, podem-se destacar os trabalhos de Agustine (2014), que avaliou o potencial de produzir biogás com alto teor de metano a partir de ensaios de biodegradação com micro-organismos isolados de lodos de aterro, e o trabalho de Quadros (2015), ainda em andamento, que estuda o tratamento do chorume gerado nos curtumes.

Na parte de tratamento de corantes para couro e efluentes com corantes, destacam-se os trabalhos de Piccin et al., (2012), Piccin (2013) e Scaraffuni (2015), que avaliaram o tratamento de corantes e efluentes de tingimento por processos de adsorção usando resíduos de couro curtido ao cromo e couro vegetal. Os autores estudaram a descoloração mediante processos de adsorção dos corantes para couro *Acid Red 357* e *Acid Black 210*, que também são avaliados nesta pesquisa.

No tratamento de efluentes, Andrioli e Gutterres (2006) estudaram a clarificação através da coagulação/floculação utilizando taninos vegetais como agente coagulante/floculante. Mella (2013) fez uma avaliação da remoção de Cr(III) de banhos residuais de curtimento através das técnicas de precipitação química e eletrocoagulação.

Estudos teóricos nesse contexto também foram importantes, como o de Cooper (2011), que descreveu as principais operações unitárias aplicadas no tratamento de efluentes de curtumes no estado do Rio Grande do Sul ou o trabalho teórico-prático de Gutterres et al. (2015), que também contribuiu na descrição dos tratamentos usados no estado, além da caracterização dos efluentes.

Em relação ao reuso de águas, Gutterres e Aquim (2013), esclareceram que a implementação destas técnicas requer o estabelecimento de guias, critérios, padrões e procedimentos para regular essa prática. Testes bem sucedidos de reuso foram feitos com águas de banhos do processamento do couro nas etapas de ribeira e curtimento (Gutterres et al., 2008; Gutterres et al., 2010).

Finalmente, os levantamentos teóricos sobre propostas de tecnologias limpas e as que estão sendo empregadas em curtumes do Rio Grande do Sul (Aquim et al., 2010; Gutterres, 2004), e o trabalho que descreveu as substâncias de uso restrito em couro por questões ambientais (Fuck; Gutterres, 2008), também contribuíram significativamente no desenvolvimento da pesquisa.

1.3. Estrutura da dissertação

Esta dissertação de mestrado está estruturada em capítulos, conforme:

Capítulo I – Introdução: neste capítulo se faz uma breve introdução sobre o trabalho, estabelecem-se os objetivos, apresenta-se o histórico da linha de pesquisa e a estrutura do trabalho.

Capítulo II – Revisão bibliográfica: neste capítulo é fornecida uma base teórica dos temas abordados no trabalho de pesquisa.

Capítulo III – Estado da Arte: neste capítulo se faz uma revisão das pesquisas disponíveis na literatura sobre o tratamento de corantes industriais por fungos de podridão branca.

Capítulo IV – Materiais e Metodologia: neste capítulo descreve-se a metodologia seguida no estudo para a obtenção dos resultados.

Capítulo V – Resultados e discussão: neste capítulo apresentam-se e discutem-se os principais resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa. O capítulo está estruturado em cinco seções diferentes: coleta e isolamento dos micro-organismos, triagem em meio sólido, estudos em meio líquido, otimização do processo e identificação molecular do isolado com os melhores resultados.

Capítulo VI – Conclusões: neste capítulo são apresentadas as conclusões e as considerações finais para trabalhos futuros.

2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O objetivo deste capítulo é fornecer uma base teórica dos temas abordados no trabalho de pesquisa. Inicialmente é apresentando o processo de produção de couro, dando principal importância à etapa de acabamento molhado, aos corantes usados, ao efluente produzido e às técnicas físico-químicas convencionais e avançadas usadas para o tratamento destes efluentes. Em seguida, é fornecida uma visão geral das características químicas, moleculares e enzimáticas associadas ao processo de degradação da madeira. Faz-se uma abordagem sobre a composição da madeira, destacando-se a lignina e seu processo de biodegradação, apresentando os micro-organismos envolvidos e dando especial ênfase aos fungos de podridão branca e seu sistema enzimático com capacidade de biotransformar a lignina.

2.1. Transformação da pele em couro

O processo de produção de couro, de forma geral, está baseado na transformação de uma pele animal, um recurso natural renovável, em artigos manufaturados de primeira necessidade, bens duráveis e de lenta degradação. Entre esses produtos, encontram-se peças de vestuário, calçado, estofamento de veículos, etc. A pele, verde ou salgada, é transformada em couro através de uma série de operações unitárias que visam à limpeza, a estabilização e as qualidades de acabamento do produto. O processamento divide-se em três fases principais:

- Ribeira: é composta por operações em meio aquoso, nas quais as peles são lavadas e preparadas para o curtimento. Na lavagem, é feita a limpeza da pele, removendo-se grande parte das impurezas, dos produtos químicos e, em geral, do material não colagenoso. Na preparação da pele, são usadas operações mecânicas para que a matriz de fibras colagênicas reaja adequadamente com os produtos químicos das etapas seguintes (curtimento e acabamento). As principais operações desta etapa são: remolho, depilação e caleiro, descarnar e divisão, desengalgar, purga e píquel (Covington, 2009; Dettmer, 2012).

- Curtimento: nesta fase, as peles são tratadas com agente de curtimento que reage com a proteína da pele, deslocando a água intercelular e combinando-se com as fibras de colágeno. O curtente estabiliza o material proteico, produzindo um material resistente ao calor, à hidrólise e à degradação microbiana. Os sais de cromo são os curtentes mais usados (curtimento mineral), embora os taninos vegetais e sintéticos (curtimento orgânico) também sejam usados (Nazer et al., 2006).

- Acabamento: esta parte do processo visa melhorar ou conferir as características definitivas do couro, como cor, firmeza, maciez e toque, atendendo às especificações do produto final, como resistência físico-mecânica, físico-química e microbiológica. Consiste em operações de acabamento molhado (inclui desacidulação, recurtimento, tingimento e engraxe), pré-acabamento (como o amaciamento) e acabamento (como aplicação de produtos poliméricos formadores de filme sobre o couro) (Covington, 2009; Dettmer, 2012).

2.2. Tingimento de couro

O tingimento tem o objetivo de conferir uma determinada coloração ao couro. Esta etapa do acabamento molhado é importante no processo de fabricação, já que a cor é uma das propriedades essenciais para que um consumidor escolha e avalie o produto. Quase todos os couros são tingidos, com exceção de couros com curtimento vegetal ou alguns que são produzidos para ter uma aparência natural.

2.2.1. Generalidades da etapa de tingimento

O tingimento é realizado no couro já curtido e consiste na fixação de moléculas de corantes orgânicos solúveis à rede de fibras da pele por atrações eletrostáticas, com o objetivo de conferir uma cor uniforme em toda a espessura e comprimento do produto. Assim, nivelam-se e corrigem-se defeitos no lado da flor (parte externa), que afetam a qualidade do couro (Heidermann, 1993).

O couro é um produto natural com uma estrutura tridimensional complexa, e tanto no interior quanto na superfície das fibras, há variações de espessura e densidade, além de outros fatores como a distribuição irregular das gorduras, os defeitos de fabricação, como sulcos e dobras, e as imperfeições naturais da pele, como cicatrizes, doenças e rugas. Essa natureza heterogênea da matéria-prima faz do couro um substrato difícil de tingir. Obter a intensidade e tonalidade desejadas num produto tão heterogêneo pode ser uma tarefa complicada (Kanth et al., 2008). As mudanças na matriz dependem tanto da espécie, da raça, da idade e do estado nutricional do animal, quanto do tipo de curtimento e dos produtos usados nas etapas anteriores ao tingimento (Püntener, 2000). Portanto, para atingir o objetivo de um tingimento uniforme e garantir o consumo máximo de corantes, é necessário ter uma compreensão completa dos parâmetros que interferem no tingimento, como propriedades da pele curtida, natureza química dos corantes e agentes auxiliares, afinidades relativas do corante e do substrato e os parâmetros do processo (volume de banho, pH, temperatura, produtos auxiliares e tipo de aplicação e fixação).

Esta etapa pode ser realizada de diversas formas, mas o mais comum em curtumes é encontrar o tingimento sendo realizado em fulões com corantes fornecidos em pó pelos fabricantes (Scaraffuni, 2015). A escolha do tipo de corante também é essencial para obter a tonalidade desejada e o consumo máximo do corante, evitando cargas residuais nos efluentes (Kanth et al., 2008).

2.2.2. Corantes

Os corantes são, geralmente, moléculas orgânicas sintetizadas de natureza aromática ou heterocíclica. São substâncias solúveis em meio ácido, neutro ou básico, possuindo uma estrutura molecular não saturada, ou seja, são eletricamente instáveis. Os corantes têm a capacidade de conferir sua própria cor ao material sobre o qual se fixam.

Num curtume, os tipos de corantes usados dependem da gama de artigos produzidos, que variam com as tendências da moda. Um curtume pode utilizar entre 50 e 100 diferentes tipos de corantes (Selvi et al., 2013).

Os corantes são classificados de duas maneiras diferentes: de acordo com os grupos funcionais da sua estrutura química, ou conforme a sua forma de aplicação. A classificação segundo a estrutura química depende principalmente do grupo cromóforo, encarregado de dar a cor característica de cada corante. Os principais grupos cromóforos, em ordem de importância, são: azo, carbonila, ftalocianina, enxofre, etileno, nitro e nitroso (Christie, 2001; Hunger, 2003). Na prática, a classificação dos corantes segundo o método de aplicação é, sem dúvida, muito mais útil do que a classificação química. Segundo a aplicação, os corantes podem ser classificados em corantes ácidos, de mordente, metalizados, diretos, reativos, de cuba, dispersos e básicos (Christie, 2001; Hunger, 2003).

Para a classificação e nomenclatura dos corantes, com um enfoque mais comercial e industrial, a referência global mais importante é o Índice Internacional de Corantes (C.I, do inglês "*Colour Index International*"), um banco de dados de corantes e pigmentos da SDS (do inglês: "*Society of Dyers and Colourists - UK*") e da AATCC (do inglês: "*American Association of Textile Chemists and Colorists*") (Christie, 2001; Covington, 2009; Hunger, 2003).

No entanto, o Índice Internacional de Corantes, é praticamente uma lista de corantes da indústria têxtil, aparecendo apenas um capítulo com corantes para couro, classificados em corantes ácidos, de mordente, metalizados e diretos. Além disso, vários corantes para couro não podem ser considerados no C.I devido à incompatibilidade com os parâmetros de classificação (Covington, 2009; Püntener, 2000). Os corantes para couro são estruturalmente diferentes dos corantes têxteis, uma vez que eles são sintetizados para tingimento de diferentes tipos de texturas (fibras de colágeno e algodão). Contudo, na indústria coureira é popular o uso de corantes para lã e algodão (Püntener, 2000). Entre os corantes desenvolvidos exclusivamente para tingir couro, os mais usados são os corantes ácidos, principalmente para tingimento de couro curtido ao cromo. Eles são utilizados para o tingimento em profundidade e têm uma ampla gama de cores, podendo oferecer tonalidades vivas, profundas e brilhantes. Por terem caráter aniônico, têm alta afinidade com couros com carga catiônica e devem ser aplicados em meios ácidos devido à presença do grupo sulfonato (Covington, 2009).

A estrutura dos principais grupos funcionais cromóforos dos corantes e algumas características são apresentadas na Tabela 2.1 e na Tabela 2.2 são apresentadas algumas características dos corantes para couro.

Tabela 2.1. Principais grupos cromóforos de corantes

Tipo de cromógeno	Estrutura		Características
Azo	N=N		Principal classe de corantes usados em tingimento de couro. 90% de corantes para couro é deste tipo
Carbonila	C=O		Estes compostos possuem um grupo carbonilo. Os mais comuns são alizarina, antraquinonas e índigos
Ftalocianina	C=NH		Estes corantes são formados por um anel heterocíclico aromático que confere uma estrutura bastante estável
Enxofre	C=S		Estes produtos são obtidos a partir da fusão de grupos fenóis e enxofre
Etilenos	C=C		Neste caso, os corantes possuem ligações duplas unindo os anéis aromáticos
Nitro e Nitroso	NO ₂	N=O	Ao invés de grupos azos, estes corantes possuem grupos aminos ligando os anéis aromáticos

Fonte: Adaptado de Covington (2009) e Heidermann (1993).

Tabela 2.2. Principais características dos corantes usados no tingimento de couro

Tipo de Corante	Estrutura Molecular	Carga	Modo de fixação	Estabilidade à Luz	Grupo funcional	Cor	Tipo de tingimento
Ácidos	Moléculas relativamente pequenas. Geralmente hidrofílicos	Aniônico (Alta afinidade por peles com carga catiônica)	Fixa-se por acidificação devido à presença de grupos sulfonato	Alta	Antraquinônico, trimetilmetano, azo, nitro e nitroso	Ampla gama de cores, oferecendo tonalidades vivas, profundas e brilhantes	Tingimento em profundidade
Diretos	Moléculas maiores em comparação com os corantes ácidos e básicos	Aniônico	Fixam-se ao couro diretamente sem necessidade de auxiliares	Baixa	Azo e ftalocianinas	Usado geralmente para conferir cores escuras	Tingimento superficial
Metalizados	Alto peso molecular. Moléculas orgânicas complexadas com metais em proporção 1:1 ou 1:2.	Carga aniônica baixa	Reação entre o íon metálico e grupos carboxila do colágeno. São considerados os corantes mais "rápidos"	Alta	Azo	Tons pálidos e pastel	Tingimento em profundidade e superficial
Reativos*	Alto peso molecular	Carga aniônica baixa	Produção do grupo vinil-sulfonato <i>in situ</i> . Possuem um grupo funcional que liga covalentemente às fibras do couro	Alta	Azo, antraquinônicos, ftalocianina	Gama limitada de cores: tons pálidos	Tingimento em profundidade
Básicos	Moléculas relativamente pequenas	Catiônicos com alguns locais aniônicos. Carga global positiva	Reação eletrostática entre grupos amino catiônicos do corante e grupos carboxílicos aniônicos do colágeno	Muito Baixa	Azo, trimetilmetano e antraquinônico	Tonalidades vivas e brilhantes	Tingimento em profundidade

* Corantes pertencentes a outra classe também podem ser considerados como reativos.

Fonte: a informação na tabela é uma revisão dos trabalhos de Covington (2009), Heidermann (1993) e Hunger (2003).

Por outro lado, de acordo com a classificação de corantes pelo grupo funcional, os que têm o cromóforo azo, chamados de azoicos, são os mais usados na indústria de couro. Estima-se que entre 90 e 95% dos couros produzidos em todo mundo são tingidos com esses corantes. Esse também é o tipo de corante mais usado na indústria coureira do Brasil (Fuck; Gutterres, 2008). Os corantes azoicos caracterizam-se pela presença de grupos funcionais tipo azo (-N=N-), que podem estar em diferentes proporções (monoazo, diazo, triazo, poliazo), ligados geralmente a radicais fenil e naftil, que, por sua vez, estão ligados em diferentes combinações a grupos funcionais, como amino (NH₂), cloro (Cl), hidroxilo (OH), metilo (CH₃), nitro (NO₂), ácido sulfônico e sais de sódio (SO₃Na). Esses grupos funcionais ligam-se covalentemente à superfície do couro, conferindo alta estabilidade e resistência a agentes oxidantes, que são as propriedades mais importantes dos corantes (dos Santos et al., 2007; Rodríguez-Couto, 2015).

2.3. Efluentes de tingimento

O mercado internacional oferece mais de 10.000 diferentes corantes comerciais. A quantidade exata de corantes sintéticos produzidos no mundo é desconhecida, embora estimativas indiquem que a produção supera as 800.000 toneladas por ano (Martínez-Huitle; Brillas, 2009; Rodríguez-Couto, 2015). Uma parte desses corantes é usada no tingimento de couro. Os diversos tipos de corantes têm diferentes taxas de exaustão, o que pode trazer problemas de obtenção de tonalidade e nivelamento do couro. A principal razão para tal comportamento é que, algumas vezes, a afinidade entre o substrato (couro) e os corantes não é muito boa. Embora a utilização de agentes auxiliares no tingimento pode melhorar a fixação do corante à superfície do produto, uma quantidade de corante não se fixa, ficando remanescente no efluente (Kanth et al., 2008). A quantidade de corante que não se fixa no couro também é desconhecida, já que isso depende de vários fatores como o tipo de corante, as características da pele curtida, as afinidades relativas do corante e do substrato e os parâmetros do processo.

A maioria das regulamentações dos governos sobre a quantidade de corante que pode entrar nas estações de tratamento através dos efluentes, estabelece que esse valor não possa ultrapassar 5% (m/v). Para vários autores, esses valores podem ser maiores. A maioria dos pesquisadores concorda que uma quantidade razoável do corante que não se fixa ao couro varia entre 1 e 10% (Martínez-Huitle; Brillas, 2009). Scaraffuni (2014) caracterizou diferentes efluentes de tingimento de couro, e observou que a concentração do corante *Acid Red 357* remanente no efluente esteve entre 75 e 150 mgL⁻¹. Destaca-se que os corantes, mesmo em baixas concentrações (menos de 1 mgL⁻¹), já contribuem significativamente para a elevação da cor e o aumento da toxicidade dos efluentes (Piccin, 2013). Devido às aplicações em escala industrial, essas concentrações podem ser muito maiores.

Várias citações na literatura fazem referência aos efeitos negativos causados pelos corantes, especialmente os azoicos, quando são descarregados nas águas residuais sem um tratamento adequado. Entre esses efeitos destacam-se o passivo ambiental e os problemas que podem ser causados à saúde humana.

Do ponto de vista ambiental, os principais problemas estão relacionados à descarga de efluentes coloridos nos corpos de águas doces, como rios e lagos, impedindo a penetração da luz solar em camadas mais profundas, o que diminui a atividade fotossintética, e dificultando a difusão de gases, especialmente o oxigênio, gerando condições anaeróbicas que afetam a fauna e flora destes ambientes. Por outro lado, a presença de corantes nos corpos de água afeta o pH, aumenta a DBO (Demanda biológica de oxigênio), a DQO (Demanda química de oxigênio) e a toxicidade (Rodríguez-Couto, 2013; Rodríguez-Couto, 2015; Taskin; Erdal, 2010).

Sobre os problemas causados à saúde humana, vários autores fazem referência à possibilidade de que as ligações azo dos corantes azoicos possam reduzir-se a aminas aromáticas. Esses compostos têm efeitos altamente tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos nos animais e nos seres humanos (Baccar et al., 2011; Rodríguez-Couto, 2015). Esse tema causou uma grande comoção nos últimos anos.

É por isso que, a fim de controlar a produção e comercialização de produtos químicos com corantes, quase todas as nações aplicaram severas leis para estes produtos. Todos os novos corantes devem passar por testes ecológicos e toxicológicos. Os princípios de avaliação de risco de novos corantes são estabelecidos no Decreto 2002/61/CEE da Comissão da União Europeia, e incluem: identificação do perigo, avaliação dose-resposta, avaliação da exposição no meio ambiente e caracterização do risco (Püntener, 2000). De acordo com este decreto, couros tingidos e materiais têxteis não devem conter nenhuma das 24 aminas aromáticas restritas no mercado (Fuck; Gutterres, 2008). Finalmente, vários autores destacam o caráter recalcitrante dos corantes, especialmente os corantes azoicos, devido a que são desenhados para serem resistentes à luz e aos agentes oxidantes, portanto, são difíceis de degradar uma vez solubilizados em sistemas aquáticos (Baccar et al., 2011; Park et al., 2007). Desta forma, a presença de corantes, mesmo em baixa concentração, justifica a necessidade de tratamentos convencionais ou avançados, visando degradar os corantes e/ou descolorir os efluentes. Por outro lado, é importante mencionar que o efluente da etapa de tingimento, geralmente, é misturado com o de outras etapas do acabamento molhado de couro. Esses efluentes contêm, além de misturas de diferentes corantes sintéticos, óleos, recurtentes, surfactantes, ácidos e bases, que aumentam a toxicidade do efluente. O reuso direto destas águas de tingimento também não é possível na fabricação do couro, pois a presença dos corantes causaria um tingimento indesejável no produto (Piccin, 2013).

2.4. Tratamento de Efluentes

De forma geral, no Brasil, os efluentes de curtume são tratados em ETEs (Estações de Tratamento de Efluentes) que, geralmente, compreendem as fases de pré-tratamento, separação físico-mecânica, tratamentos físico-químicos, e tratamento biológico. Na remoção de corantes nos efluentes do acabamento, destacam-se os processos físicos e químicos como coagulação, floculação e decantação.

Esses métodos, apesar de serem eficientes para remover a carga orgânica, podem ser incapazes de remover algumas substâncias com maior capacidade recalcitrante, especialmente surfactantes e corantes (Gutterres, et al, 2008; Gutterres et al, 2015; Piccin, 2013). Entre os tratamentos biológicos, o mais usado é o de lodos ativados. Ele é aplicado depois dos tratamentos físicos e químicos e consiste em um método de tratamento aeróbio no qual é usado um consórcio microbiano que realiza a biodegradação dos poluentes mediante processos enzimáticos. O problema deste método é que muitos dessas substâncias, como compostos fenólicos, complexos metálicos, aminas e grupos azo, podem ser tóxicos para os micro-organismos presentes nas plantas de tratamento e, além disso, podem ser formados outros derivados que continuam sendo tóxicos para os ecossistemas (Park et al, 2007; Piccin, 2013).

A adoção de novas tecnologias "limpas" não é instantânea e, apesar das restrições, são preferíveis as tecnologias mais rentáveis. No entanto, muitos pesquisadores se preocupam cada vez mais em criar ou melhorar técnicas avançadas na remoção de corantes em efluentes de curtumes. Alguns exemplos são os processos de filtração por membranas (Brites-Alves; de Pinho, 2000), ozonização (Preethi et al., 2009; Srinivasan et al., 2009), métodos eletroquímicos (Rosales et al., 2011), fotocatalise (Paschoal et al., 2009), adsorção (Piccin, et al., 2012), entre outros. Entretanto, esses processos são muitas vezes caros e complexos, exigindo uma grande quantidade de recursos (materiais químicos, água, energia, etc.), e têm limitações para o tratamento de certos compostos que, algumas vezes, não são totalmente removidos, o que pode gerar problemas ambientais posteriores (Baccar et al., 2011; Martínez-Huitle; Brillas, 2009)

Por isso, a busca de alternativas de tratamento é necessária para encontrar soluções aos problemas ambientais causados por corantes industriais, entre eles os corantes para couro. Como se mencionou antes, os fungos de podridão branca têm um importante potencial para degradar vários tipos de corantes pela ação das enzimas com capacidade de degradar a lignina que está presente na madeira. A seguir se apresenta revisão teórica desse processo.

2.5. Composição da madeira: a lignina

As propriedades físicas, químicas e mecânicas da madeira fizeram deste material uma das principais matérias-primas no mundo, usada em quase todos os campos da atividade humana desde a antiguidade.

O termo madeira faz referência ao xilema secundário que se obtém a partir das plantas vasculares, encontrado em gimnospermas, madeiras brandas e angiospermas, madeiras duras (Fujita; Harada, 2001). A madeira está constituída por um tecido fibroso de células com parede celular que se caracterizam por serem estruturas bastante complexas e semirrígidas, compostas por três substâncias poliméricas naturais: celulose, hemicelulose e lignina. A Figura 2.1 proporciona uma representação comum da organização da ultraestrutura da parede celular das células da madeira, formada pela lamela média (uma camada fina que une as células em conjunto para formar um tecido), a parede primária (a primeira camada depositada pela célula viva, onde as fibrilas estão orientadas aleatoriamente dentro de uma matriz que consiste em substâncias peptídicas e xiloglucano) e a parede secundária (onde as microfibrilas de celulose estão organizadas paralelamente em lamelas, formando as camadas S1, S2 e S3) (Fengel; Wegener, 1989; Kirk; Cullen, 1998).

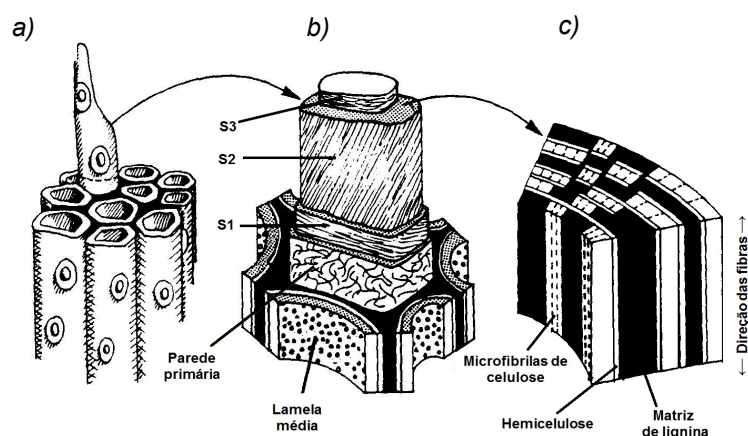


Figura 2.1. Ilustração esquemática da arquitetura molecular do tecido de madeira: a) Esquema da relação de células contíguas; b) Vista em corte das camadas da parede celular; c) Esquema da relação lignina-hemicelulose-celulose na parede secundária. O diâmetro de cada uma das células é de aproximadamente 25 μm . S1-S3 são as camadas da parede celular secundária

Fonte: adaptado de Kirk e Cullen (1998).

- A celulose: trata-se do componente principal da madeira, encarregada de determinar a morfologia básica das paredes celulares. Compreende entre 40-50% do peso da madeira e constitui-se de unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), formando longas cadeias lineares que unem-se entre si por pontes de hidrogênio e forças de Vander Waals, constituindo microfibrilas de celulose (Fengel; Wegener, 1984; Fujita; Harada, 2001; Kirk; Cullen, 1998). A estrutura da celulose é bastante complexa. O monômero base é muito simples (Fig. 2.2), no entanto, cada molécula de celulose possui um número indefinido de unidades de celobiose (composto por duas moléculas de glicose). Cada microfibrila de celulose contém cerca de 40 moléculas de celulose individuais. Assim, a celulose forma uma estrutura complexa e altamente ordenada com natureza cristalina. As microfibrilas estão dispostas em lamelas que estão no plano da parede da célula. A maior quantidade de celulose concentra-se fundamentalmente na camada S2 da parede secundária (Kirk; Cullen, 1998).

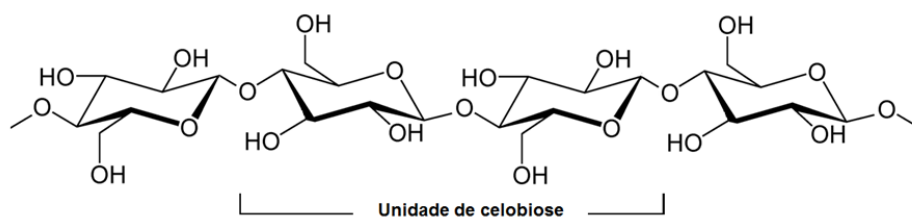


Figura 2.2. Estrutura química da celulose
Fonte: adaptado de Fengel e Wegener (1989).

- As hemiceluloses ou polioses constituem entre 25 a 30% do peso da madeira. Tal como a celulose, as hemiceluloses são polímeros lineares de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) ou raramente β (1 \rightarrow 3) (Kirk; Cullen, 1998). As polioses diferem estruturalmente da celulose na medida em que têm menor peso molecular, cadeias muito mais curtas e possuem ramificações diferentes tais como açúcares, ácidos de açúcar e ésteres de acetila, que se unem lateralmente à cadeia principal, tornando a estrutura não cristalina (Fengel; Wegener, 1989; Kirk; Cullen, 1998). Entre os açúcares que compõem as hemiceluloses encontram-se hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose) e pentoses (D-xilose e L-arabinose) (Betts et al., 1991; Fengel; Wegener, 1989).

- A lignina é uma complexa macromolécula derivada de unidades fenilpropanóides (C₆C₃) com alto peso molecular, encarregada de dar rigidez e suporte à parede celular das células que formam o tecido fibroso da madeira. Encontra-se em todas as plantas vasculares, *Pteridófitas* e as *Espermatófitas*, constituindo uma das mais abundantes substâncias orgânicas do planeta (Dean; Eriksson, 1992; Fengel; Wegener, 1989; Ralph et al., 2004). Além das funções de proteção, a lignina ajuda em outras funções básicas das plantas superiores que são apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Funções da lignina em plantas

Função	Referência
Rigidez e suporte às células da parede celular	Dean e Eriksson (1992); Fengel e Wegener (1989); Higuchi (1997)
Agente de ligação entre as células da madeira	Betts et al. (1991)
Resistência ao estresse mecânico: proteção a impactos, compressões e deformações	Betts et al. (1991); Boerjan et al. (2003); Dean e Eriksson (1992); Higuchi (1997)
Resistência a estresses bioquímicos e patógenos	Betts et al. (1991); Dean e Eriksson (1992); Higuchi (1997)
Transporte interno de água, nutrientes e metabólitos	Betts et al. (1991); Boerjan et al. (2003); Higuchi (1997)

Ao contrário de outros macropolímeros, como amido ou celulose, que são lineares e com uma unidade monomérica que se repete regularmente, a lignina tem uma estrutura tridimensional aleatória e não apresenta uma unidade de repetição típica (Betts et al., 1991).

O processo de lignificação consta de uma etapa enzimática e uma química. A biossíntese se produz a partir da fenilalanina, seguindo a via bioquímica dos ácidos cinâmicos: o processo começa com a síntese enzimática dos precursores da lignina, os monolignóis (Fig. 2.3): álcool *p*-cumarílico (4-hidróxicinâmico), álcool coniferílico (4-hidróxi-3-metóxicinâmico) e álcool sinapílico (4-hidróxi-3,5-dimetóxicinâmico), que são desidrogenados por lacases e/ou peroxidases, formando os radicais livres fenoxílicos 4-hidróxifenilo (unidade de lignina H, *p*-hidróxifenila), guaiacila (unidade de lignina G) e siringila (unidade de lignina S) (Fig. 2.4) (Boerjan et al., 2003; Ralph et al., 2004).

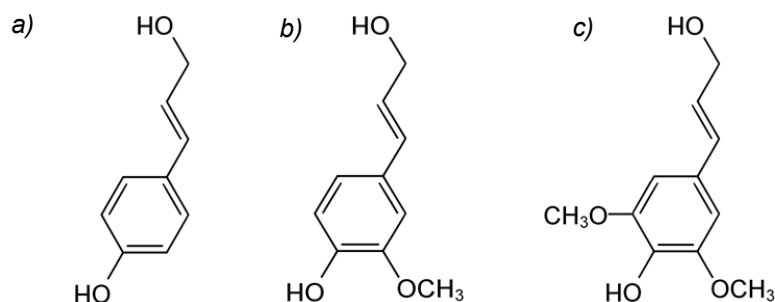


Figura 2.3. Estrutura química dos monolignóis, precursores da lignina: a) Álcool p-cumarílico; b) Álcool coniferílico; c) Álcool sinapílico
Fonte: adaptado de Higuchi (1997) e Ralph et al. (2001).

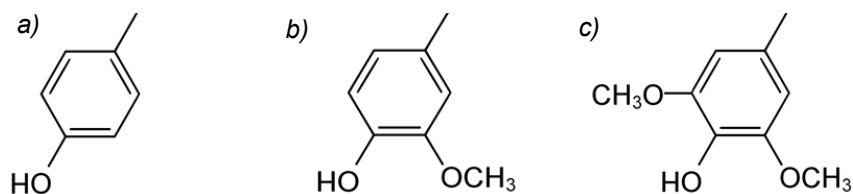


Figura 2.4. Estrutura química das unidades aromáticas da lignina: a) Unidade de lignina (H): p-hidroxifenila; b) Unidade lignina (G): Guaiacila; c) Unidade de lignina (S): Siringila
Fonte: adaptado de Ralph et al. (2001).

Após o mecanismo enzimático, ocorre um processo de reação química chamado de “acoplamento aleatório”, onde as unidades aromáticas da lignina reagem “aleatoriamente” entre si, formando uma variedade de compostos ressonantes. O processo não é estatisticamente aleatório, uma vez que os processos químicos que resultam em mais do que um produto estão influenciados pela natureza dos reagentes, pelo acoplamento da matriz e pelas condições físicas do solvente (temperatura, pressão, etc.), mas é totalmente “combinatório”, ou seja, todos os modos de acoplamento possíveis estão disponíveis, mas não são igualmente prováveis (Arora; Sharma, 2010; Boerjan et al., 2003; Ralph et al., 2004). Assim, a irregularidade da macromolécula de lignina radica na expressão diferencial das enzimas que intervêm na via dos ácidos cinâmicos e das reações químicas aleatórias. Independentemente do processo de lignificação, a composição da lignina varia com o tipo de planta, tipo de células e lugar na célula onde são sintetizados (parede ou lamela média) (Boerjan et al., 2003).

A lignina pode ser classificada segundo as unidades aromáticas que compõem o macropolímero. Assim, embora existam exceções, as gimnospermas (madeiras moles) estão formadas principalmente por unidades de lignina G, enquanto as angiospermas (madeiras duras) sintetizam-se a partir dos álcoois coniferílico e sinapílico, produzindo unidades de lignina tipo G e S respectivamente. A lignina das gramíneas está formada por unidades G-S-H. (Boerjan et al., 2003).

Por outro lado, além do tipo de unidades aromáticas, o tipo de ligações entre os monômeros de lignina também muda consideravelmente. Essas ligações são muito estáveis e não hidrolisáveis. Destacam-se as ligações tipo éter entre um átomo de carbono da cadeia lateral de propano de um monômero e um átomo de carbono do anel de benzeno de outra unidade fenilpropanóide (ligações aril-alquil-éter ou β -O-4).

As ligações carbono-carbono que ocorrem principalmente entre os núcleos aromáticos e as cadeias laterais são menos frequentes (Arora; Sharma, 2010; Betts et al., 1991; Boerjan et al., 2003). Esse tipo de união entre os monômeros de lignina atribui as características de recalcitrância à macroestrutura da molécula, sendo alguns mais rígidos que outros. Por exemplo, a ligação β -O-4 é o mais facilmente clivada quimicamente, fornecendo uma base para processos industriais como polpação e branqueamento químico.

As outras ligações como fenilcoumaran (β -5), bifenilo (5-5), bifenil-éter (5-O-4), são mais resistentes à degradação química (Boerjan et al., 2003). As principais ligações entre as unidades monoméricas da lignina são mostradas na Figura 2.5.

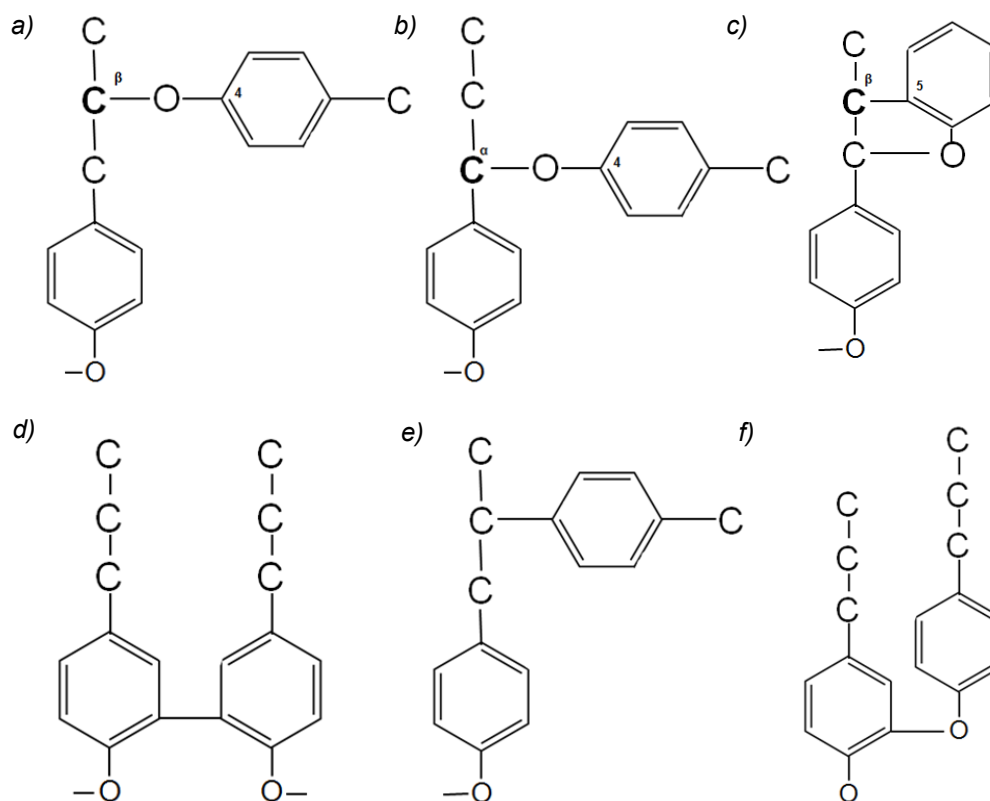


Figura 2.5. Estrutura química das principais ligações entre monômeros de lignina: a) Ligação β -O-4 aril-álquil-éter; b) Ligação α -O-4: aril-aril-éter; c) Ligação β -5: fenilcoumaran; d) Ligação 5-5':bifenilo; e) Ligação 1.2: diarilpropano; f) Ligação 5-O-4: bifenil-éter
 Fonte: adaptado de Betts et al. (1991) e Boerjan et al. (2003).

Todas essas características fazem com que a lignina seja um composto bastante complexo, com alto peso molecular, heterogêneo e recalcitrante. Até agora não se conhece com exatidão a ultraestrutura exata da lignina, existindo unicamente modelos estruturais. Um dos mais divulgados e aceitos é o modelo de Adler (1977), mostrado na Figura 2.6.

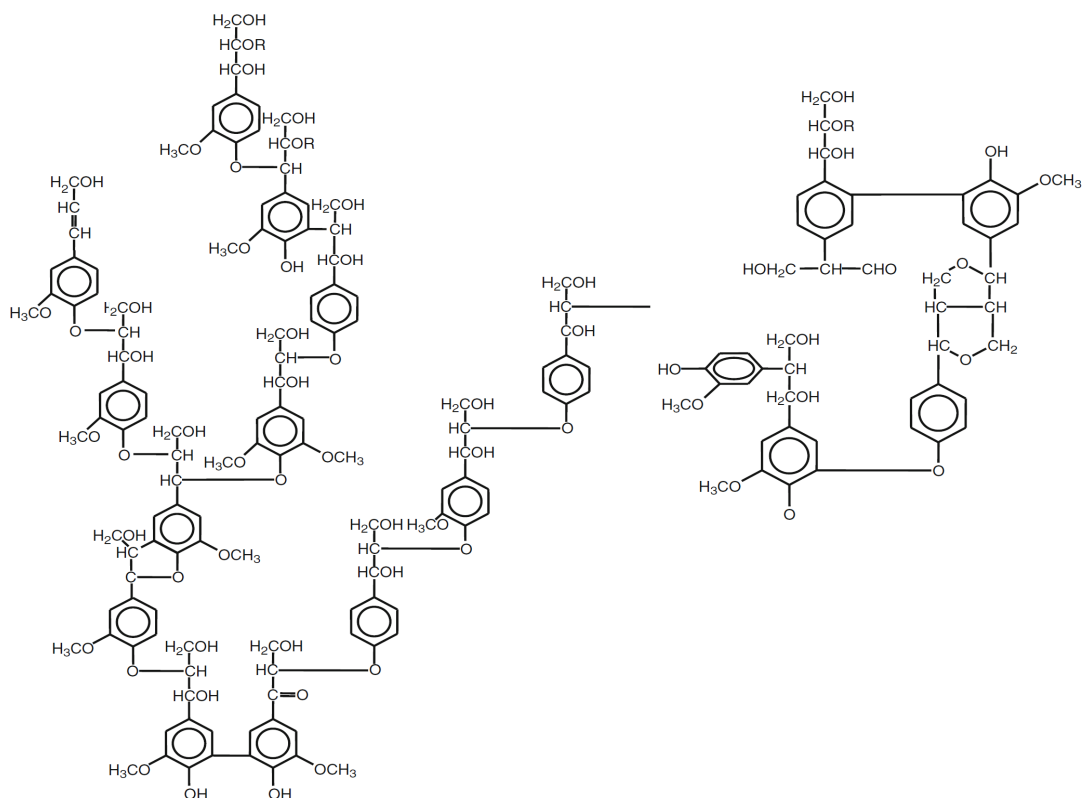


Figura 2.6. Estrutura química da lignina segundo o modelo de Adler (1977)

Fonte: adaptado de Arora e Sharma (2010).

2.6. Biodegradação da madeira: ligninólise

A decomposição da madeira está associada ao processo de nutrição de vários tipos de micro-organismos, entre os que se destacam as bactérias (*actinomicetos*) e os fungos (*ascomicetos* e *basidiomicetos*). A forma como estes micro-organismos alcançam os nutrientes depende da anatomia, da composição química das suas paredes celulares, além da classe de lignina das paredes celulares dos diferentes tipos de madeira (Blanchette, 1995; Eriksson et al., 1990; Hatakka, 2005).

Desde o ponto de vista químico e morfológico, cada tipo de micro-organismo causa diferentes formas de degradação, mas destacam-se os fungos como os principais “consumidores” da madeira. Sua organização estrutural em forma de hifas está relacionada com a eficiência destas espécies para penetrar e degradar a madeira (Arora; Sharma, 2010).

Os fungos que biodegradam a madeira são classificados em três categorias principais segundo o modo de decomposição e a cor que deixam na madeira apodrecida: fungos da podridão branda/mole, fungos da podridão marrom/castanha e fungos da podridão branca (Arora; Sharma, 2010; Blanchette, 1995; Eriksson, 2010).

2.6.1. Fungos de podridão branda ou mole

Os principais fungos que causam a podridão branda ou mole da madeira, conhecidos como SFR (do inglês “*soft-rot fungi*”), pertencem aos filos *Ascomycota* e *Deuteromycota* (fungos imperfeitos), entre eles as espécies *Cadophora malorum*, *Daldinia concentrica*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium chrysogenum* (Blanchette et al., 2004; Hamed, 2013; Nilsson; Daniel, 1989; Rodriguez et al., 1996). Na natureza é comum achar estes fungos deteriorando a madeira que se encontra perto do solo e em meios aquáticos. A madeira em decomposição adquire uma aparência marrom e o tecido parece mais macio e fragmentado. Estes fungos podem tolerar diferentes condições de temperatura, de umidade e de pH, e são particularmente ativos em condições que desestimulam a atividade dos fungos da podridão marrom e fungos da podridão branca (Hamed, 2013; Rodriguez et al., 1996).

Os SFR têm preferência por degradar celulose e hemicelulose, mas não tem o potencial oxidativo suficiente para atacar a lignina guaiacila (G), bastante recalcitrante, só conseguindo oxidar e mineralizar a unidade de lignina siringila (S) (Arora; Sharma, 2010; Hamed, 2013; Nilsson; Daniel, 1989). Para atacar a madeira, os SFR produzem cavidades na parede secundária da célula seguindo a orientação microfibrilar da celulose (tipo de ataque 1) e outros causam erosão das camadas da parede celular ao redor das hifas que estão crescendo no lúmen da célula (tipo de ataque 2). A lamela media permanece intacta (Blanchette et al., 2004; Hamed, 2013).

2.6.2. Fungos de podridão parda ou castanha

Conhecidos como BRF, em inglês “*brown-rot fungi*”, são fungos que fazem parte da classe *Basidiomycota*. Entre os basidiomicetos que degradam a madeira, podem-se encontrar dois grandes grupos: os fungos da podridão parda ou castanha e os fungos da podridão branca. Estes dois grupos estão bastante relacionados taxonomicamente, podendo até pertencer ao mesmo gênero. Os BRF degradam preferentemente os polissacarídeos da madeira (celulose e hemicelulose), mas também modificam a lignina de forma limitada (Blanchette, 1995; Eriksson et al., 1990; Hatakka, 2005). A madeira degradada pelos BRF caracteriza-se por ser despedaçada em pedaços cúbicos frágeis que resultam da fragmentação no sentido transversal das fibras. Ao descompor e remover a celulose e hemicelulose, os BRF deixam um pó castanho escuro que indica a lignina que foi modificada, mas não degradada (Blanchette, 1995; Hatakka, 2005).

Análises bioquímicas dos resíduos de lignina deixados pelos BRF mostram que o conteúdo de compostos metoxila é consideravelmente menor, mas novos grupos hidroxifenólicos são formados a partir da demetilação de grupos metoxila. Assim, são gerados novos resíduos de lignina com menor peso molecular, mas a lignina não é despolimerizada (Blanchette, 1995; Jin et al., 1990).

O ataque de decomposição começa quando as hifas dos fungos penetram entre as células através dos poros existentes nas paredes celulares da madeira. A penetração inicia no lúmen da célula, onde as hifas estão em estreito contato com a camada S3 da madeira, e termina na camada S2 da parede celular, tendo preferência pelas camadas que têm menos conteúdo de lignina (Eriksson et al., 1990; Hatakka, 2005). Algumas das espécies mais estudadas dentro do grupo dos BRF são *Gloeophyllum trabeum*, *Coniophora puteana*, *Serpula lacrymans*, *Meruliporia incrassata* e *Postia placenta* (Blanchette, 1995; Hatakka, 2005).

O outro grande grupo dos basidiomicetos que degradam a madeira são os fungos de podridão branca. Devido à importância destes fungos na degradação da lignina e no ciclo bioquímico do carbono, serão abordados na próxima seção.

2.7. Fungos de podridão branca

Os fungos de podridão branca, chamados de WRF (do inglês “*white-rot fungi*”), são o maior e mais efetivo grupo de organismos que degradam compostos lignocelulósicos. Eles caracterizam-se pela aparência esbranquiçada que deixam na madeira que está sendo descomposta. Até agora, estes são os únicos organismos reportados com capacidade de despolimerizar e mineralizar completamente a lignina em CO₂ e H₂O: ligninólise (Boyle et al., 1992; Kirk; Cullen, 1998).

A degradação tem o objetivo de alcançar os polissacarídeos da madeira (celulose e hemicelulose), principal fonte de energia. A madeira contém entre 20-30% de lignina, o que faz que este macropolímero seja a substância aromática mais abundante na terra, e provavelmente a mais recalcitrante (Hammel, 1997; Kirk; Farrell, 1987; Tuomela, 2000). Por isso, a degradação e reciclagem da lignina é um evento essencial para o ciclo do carbono nos ecossistemas terrestres (Fig. 2.7). A participação dos WRF na decomposição e ciclos biogeoquímicos da biomassa lignocelulósica é essencial para o saudável funcionamento dos ecossistemas (Blanchette, 1995; Hammel, 1997; Tuomela, 2000).

Os fungos de podridão branca são um grupo de micro-organismos bastante heterogêneo. Eles têm a capacidade de degradar todos os componentes da madeira, mas diferentes espécies variam consideravelmente na forma, ordem e taxa em que atacam estes componentes. A proporção de lignina/celulose/hemicelulose na madeira que está sendo deteriorada por um mesmo fungo pode variar enormemente até dentro do mesmo substrato. (Blanchette, 1995; Eriksson et al., 1990). Geralmente, estes fungos são achados degradando a madeira de árvores de madeira branca (gimnospermas), com menor conteúdo de lignina e maior de celulose e hemicelulose, mas também podem degradar a madeira dura (angiospermas), com maiores porcentagens de lignina. Geralmente na natureza, eles têm preferência pelas unidades de lignina siringila (S), que são menos resistentes do que as unidades de lignina guaiacila (G) (Blanchette, 1995; Eriksson et al., 1990, 2010; Hatakka, 2005).

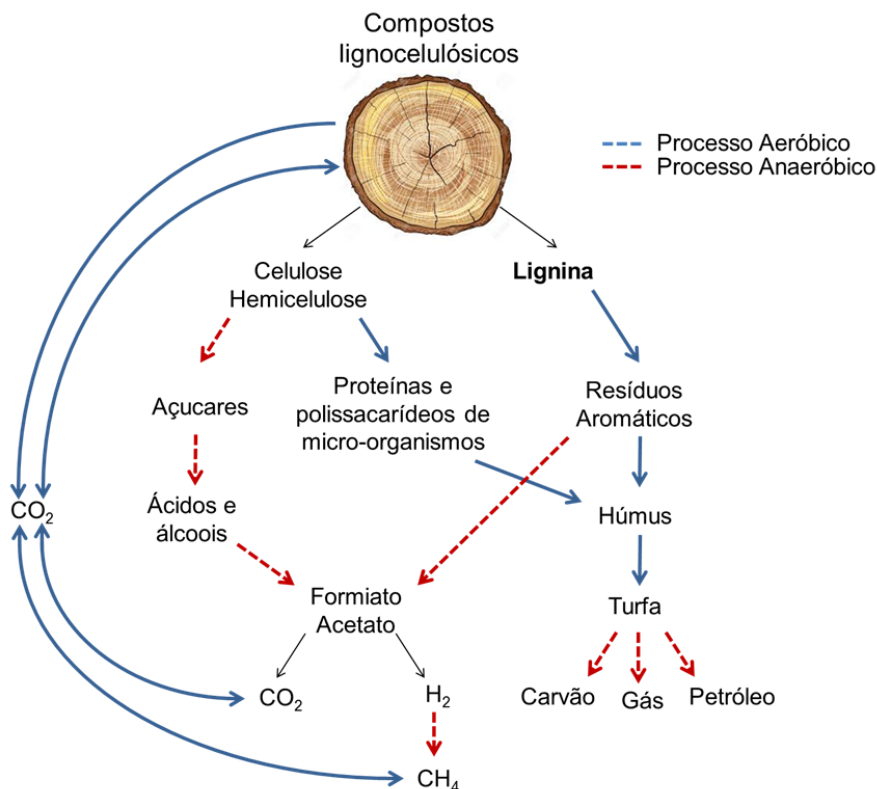


Figura 2.7. Ciclo global do carbono (compostos lignocelulósicos)
 Fonte: adaptado de Tuomela (2000).

2.7.1. Mecanismos de biodegradação da lignina dos fungos da podridão branca

As diferenças macroscópicas e microscópicas que adquire a madeira degradada devem-se aos diferentes mecanismos que estes fungos utilizam para degradar a lignina:

- *Mecanismo não seletivo ou simultâneo*: Este é o mecanismo mais comum dos WRF para atacar a madeira. As hifas fúngicas penetram no lúmen e atravessam entre uma célula e outra através de perfurações naturais na estrutura da parede celular. Uma vez colonizado o lúmen das células, os fungos produzem a erosão ou escamação da parede celular e são removidos todos seus componentes ao mesmo tempo e na mesma proporção em que se encontram na célula. O tipo de madeira que está sendo deteriorado tem bastante influência na ordem em que a lignina, celulose e hemiceluloses são degradadas (Blanchette, 1995; Eriksson et al., 1990, 2010; Hatakka, 2005).

O mecanismo consiste na produção de enzimas e metabólitos extracelulares nas hifas que estão na parede celular, em direção lúmen-lamela média. Assim, formam-se áreas com buracos cheios de micélio que se tornam progressivamente maiores até que a parede da célula é destruída completamente (Fig. 2.8a). Algumas das espécies mais estudadas que causam a degradação não seletiva na podridão branca da madeira são *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Phellinus pini* (Blanchette, 1995; Eriksson et al., 1990; Eriksson, 2010).

- *Mecanismo seletivo*: este outro mecanismo de degradação é menos comum, mas mais interessante por suas possíveis aplicações biotecnológicas. Trata-se de um mecanismo seletivo onde são degradadas a lignina e as hemiceluloses, mas não se degrada a celulose das camadas da parede celular (Fig. 2.8b). Neste caso, a lignina é degradada na parede celular e na parede secundária das células, mas não existem zonas de lise ou erosões, portanto a natureza cristalina da celulose não é destruída. Algumas espécies que degradam seletivamente a lignina na podridão branca da madeira são: *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus ostreatus* e *Phellinus pini* (Blanchette, 1995; Eriksson, 2010; Hatakka, 2005).

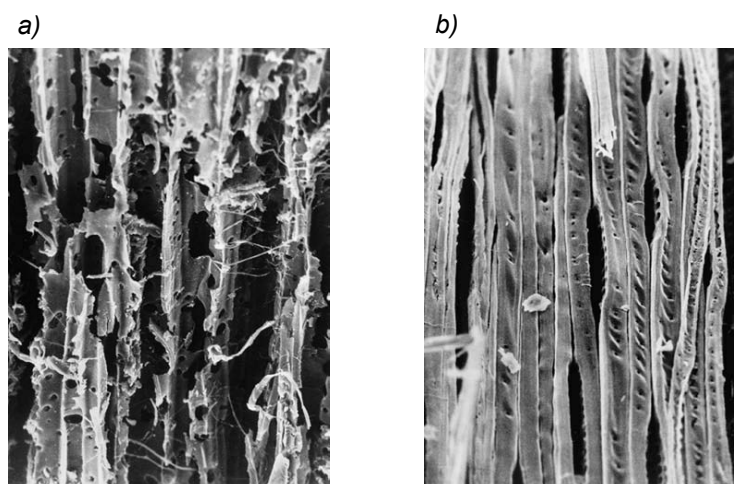


Figura 2.8. Tipos de ataque dos WRF à lignina: a) Ataque simultâneo em todos os componentes de madeira por *Phanerochaete chrysosporium*; b) Ataque seletivo para lignina por *Phellinus pinho*

Fonte: adaptado de Eriksson (2010).

Apesar de alguns fungos da podridão branca degradarem seletivamente a lignina ou simultaneamente todos os componentes da madeira, existem vários exemplos onde um fungo produz os dois tipos de ataque no mesmo substrato. Entre estas espécies estão *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma tsugae*, *Heterobasidion annosum*, entre outros (Blanchette, 1995; Eriksson, 2010).

Na Tabela 2.4 apresenta-se um resumo comparativo das principais características químicas e anatômicas dos fungos causadores da degradação da madeira em relação à lignina.

Tabela 2.4. Fungos degradadores da lignina: características químicas e anatômicas

Característica	Fungos de podridão branca (WRF)		Fungos de podridão pardo-castanha (BRF)	Fungos de podridão branda-mole (SFR)
Classificação	<i>Basidiomicetos</i>		<i>Basidiomicetos</i>	<i>Ascomicetos ou Deuteromicetos</i>
Aspecto e consistência da madeira em decaimento	Aparência esbranquiçada, de cor mais clara do que a madeira sólida, úmida, macia e esponjosa. Perda de resistência após a deterioração avançada		Aparência seca, quebradiça. Formação de um pó castanho. Perda drástica de força na fase inicial de decomposição	Cor marrom e consistência quebradiça em ambientes secos e macia em ambientes úmidos
Mecanismo de ataque	Degradação simultânea	Deslignificação seletiva	Modificação	Degradação limitada
Tipos de madeira	Madeiras duras (angiospermas), raras vezes madeiras macias	Madeiras macias e duras	Madeiras macias (gimnospermas). raras vezes madeiras duras	Geralmente madeiras duras. Encontram-se em ambientes aquáticos e resíduos vegetais
Constituintes degradados da parede celular	Celulose, hemicelulose e lignina	Ataque inicial seletivo para hemiceluloses e lignina	Celulose, hemiceluloses. A lignina é ligeiramente modificada	Celulose e hemicelulose, lignina ligeiramente alterada
Forma de ataque	Parede celular atacada progressivamente a partir do lúmen. Sulcos de erosão associado às hifas	Degradação da lignina na lamela média e na parede secundária.	Degradação por difusão (longe das hifas).	Cavidades cilíndricas na parede (tipo 1). Erosões (tipo 2)
Micro-organismos causadores Gênero (e.g.)	<i>Trametes, Irpex e Phanerochaete</i>	<i>Ganoderma, Pleurotus e Phlebia</i>	<i>Coniophora, Postia, Poria, Polyporus</i>	<i>Chaetomium, Paecilomyces, Fusarium</i>

Fonte: adaptado de Martínez et al. (2005) e Tuomela (2000).

2.7.2. Metabolismo dos fungos de podridão branca: catabolismo da lignina

Embora a lignina seja um material rico em carbono e uma potencial fonte de energia para o metabolismo dos micro-organismos, até agora não foi possível demonstrar que possa servir como a única fonte de carbono e energia para qualquer micro-organismo conhecido. Para que a biodegradação da lignina tenha lugar, os fungos de podridão branca requerem outra fonte alternativa de carbono, mais facilmente utilizável e que favoreça o ótimo crescimento do micro-organismo (Eriksson, 2010; Kirk; Farrell, 1987).

Nos últimos 30 anos, vários micro-organismos têm sido amplamente estudados para tentar entender o sistema bioquímico envolvido na biodegradação da lignina dos WRF. Entre eles, duas espécies destacam-se pela quantidade de pesquisas dedicadas a entender seu metabolismo. Eles são *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* e, até agora, são os modelos seguidos para explicar o mecanismo, fisiologia, enzimologia e biologia molecular do sistema ligninolítico dos WRF (Eriksson, 2010; Hattori; Shimada, 2001; Tuomela, 2000). Nestes fungos e na maioria dos WRF, a degradação da lignina se inicia apenas durante o metabolismo secundário e é desencadeado principalmente pela ausência de alguns nutrientes como carbono, nitrogênio ou enxofre (Eriksson, 2010; Kirk; Farrell, 1987; Tuomela, 2000). No entanto, há também exemplos de outros WRF que não são tão fortemente regulados pela privação de nitrogênio. Para *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, um elevado teor de nitrogênio reprime a degradação da lignina (^{14}C -lignina \rightarrow $^{14}\text{CO}_2$), enquanto outros WRF podem ser encontrados crescendo na madeira em ambientes ricos em nitrogênio (Eriksson, 2010). Assim, a capacidade dos fungos da podridão branca para degradar a lignina é dependente da produção de um complexo sistema enzimático extracelular ligninolítico, produzido no metabolismo secundário, denominado LDS (do inglês "*Lignine Degradation System*"). A seguir, apresenta-se uma revisão deste sistema enzimático de degradação da lignina, destacando-se cada uma das enzimas envolvidas no processo de degradação.

2.8. Sistema enzimático de degradação da lignina

Devido à natureza heterogênea da lignina e a sua intrincada estrutura aromática e de alto peso molecular, o sistema enzimático dos WRF para degradar este macropolímero também é bastante complexo (Tuomela, 2000). O sistema enzimático tem as seguintes características:

- Enzimas extracelulares: o grande tamanho do macropolímero faz com que seja impossível degradá-lo intracelularmente, por isto o sistema enzimático deve ser extracelular.

- Enzimas não específicas: a irregularidade estereoquímica da estrutura da lignina faz com que as enzimas não possam ser específicas para um substrato típico, já que este muda constantemente.

- Enzimas com alto potencial oxidativo: como se mencionou antes, as unidades de lignina estão unidas por ligações carbono-carbono e tipo éter bastante estáveis. O mecanismo para romper estas ligações deve ser altamente oxidativo e não hidrolítico (Kirk; Cullen, 1998; Kirk; Farrell, 1987).

O sistema está formado principalmente pelas enzimas lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP) e peroxidase dependente de manganês (MnP), que são as mais estudadas e caracterizadas, embora tenha-se evidência da participação de outras enzimas como aril álcool oxidase e peroxidase versátil. A produção destas enzimas não é homogênea, e diferentes fungos de podridão branca podem produzir uma ou mais destas enzimas (Arora; Sharma, 2010; Hatakka, 1994).

Com base nos padrões de produção destas enzimas ligninolíticas, os WRF podem-se agrupar nas seguintes categorias: WRF produtores de MnP, LiP e Lac, WRF produtores de Lac e MnP, WRF produtores de LiP e MnP e WRF produtores de Lac (Hatakka, 1994; Nerud; Mišurcová, 1996). Um dos passos chave na degradação da lignina, além do ataque inicial por agentes enzimáticos extracelulares, é a liberação de compostos de baixo peso molecular que atuam como mediadores enzimáticos (e.g. álcool veratrílico) e a participação de espécies ativas de oxigênio (e.g. H_2O_2 , radical O_2^- e radical hidroxilo OH^-), que atacam o substrato (Kirk; Cullen, 1998; Kirk; Farrell, 1987).

3

ESTADO DA ARTE: ANTECEDENTES DA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS POR FUNGOS DE PODRIDÃO BRANCA

Neste capítulo faz-se uma revisão das pesquisas disponíveis na literatura sobre o tratamento de efluentes com corantes industriais e outros compostos xenobióticos mediante o uso de fungos de podridão branca. Mencionam-se alguns conceitos teóricos sobre os mecanismos envolvidos e fatores que podem afetar o processo de biorremediação.

3.1. Aplicações biotecnológicas dos fungos de podridão branca

Os fungos de podridão branca e suas enzimas ligninolíticas têm um importante potencial em diversas aplicações biotecnológicas que se estendem desde a produção de produtos alimentícios até processos de biodegradação de complexos compostos xenobióticos.

3.1.1. Aplicações industriais dos fungos de podridão branca

Entre as principais aplicações industriais dos fungos de podridão branca podem-se destacar:

- Produção de cogumelos: vários fungos de podridão branca são usados como cogumelos comestíveis. Eles têm importância comercial devido ao seu alto valor nutricional e por crescerem em meios de baixo custo, como resíduos lignocelulósicos. Assim, favorecem os ecossistemas diminuindo o impacto ambiental destes resíduos. Entre eles encontram-se as espécies *Lentinula edodes*, conhecidos como “Shiitake”, e *Pleurotus ostreatus*, conhecido como o “shimeji-preto” ou “cogumelo ostra” (Cohen et al., 2002; Ward et al., 2003).

- Biopolpação e biobranqueamento: a celulose é o principal polímero na produção de papel. Durante a polpação, as matérias-primas (substratos lenhosos) são reduzidas ao estado fibroso, utilizando métodos mecânicos e químicos. Depois, segue o branqueamento, que envolve o consumo de grandes quantidades de produtos químicos poluentes. O uso de WRF para o tratamento de aparas de madeira antes da formação da pasta fibrosa é chamado de biopolpação. As enzimas Lac e MnP são usadas no processo para deteriorar a lignina. Isto melhora a resistência do papel, economiza energia elétrica, e reduz a toxicidade dos efluentes. O biobranqueamento consiste na degradação enzimática (Lac) da lignina residual da pasta fibrosa resultante da polpação. O fungo mais estudado para esta aplicação é o *Trametes versicolor*. A técnica de biobranqueamento (branqueamento enzimático) demonstrou a viabilidade de substituir reagentes como cloro, reduzindo assim a carga de poluição cloro-orgânica (Akhtar et al., 2000; Arora; Sharma, 2010; Kirk et al., 1992; Ward et al., 2003).

- Melhoramento de resíduos agrícolas para a alimentação animal: a lignina presente na forragem usada na alimentação de ruminantes é degradada lentamente, afetando a dieta destes animais. A bio-deslignificação dos compostos lignocelulósicos agrícolas melhora a digestibilidade dos alimentos e seu valor nutricional (Arora; Sharma, 2010; Cohen et al., 2002; Ward et al., 2003).

- Outras aplicações: além das mencionadas, existem outras diversas aplicações industriais, agrícolas e medicinais que ainda estão sendo desenvolvidas. Destaca-se na indústria de alimentos a remoção de compostos fenólicos do vinho, na medicina o uso de enzimas lacases extraídas de WRF como biosensores e marcadores enzimáticos para ensaios imunológicos e na indústria química na produção de desinfetantes a base de iodo, síntese de flavonoides, corantes têxteis, pigmentos cosméticos, aldeídos aromáticos, pesticidas, e compostos heterocíclicos (Arora; Sharma, 2010; Eriksson, 2010).

3.1.2. Aplicações dos fungos de podridão branca em biorremediação

A identificação e isolamento das enzimas modificadoras da lignina LiP (Tien; Kirk, 1983) e MnP (Kuwahara et al., 1984) a partir do fungo de podridão branca *Phanerochaete chrysosporium* e o posterior descobrimento do potencial deste fungo e suas enzimas para degradar compostos xenobióticos ainda na década de 80 (Bumpus et al., 1985), incentivaram centenas de pesquisas que, desde então, demonstraram a capacidade dos WRF para degradar uma ampla gama de poluentes ambientais, altamente tóxicos e recalcitrantes (Fig. 3.1) (Barr; Aust, 1994; Hattori; Shimada, 2001). A própria natureza não específica dos mecanismos utilizados por estes fungos para degradar a heterogênea estrutura da lignina é o que lhes permite mineralizar os poluentes até dióxido de carbono e água, ou diminuir suas concentrações até valores consideravelmente menores (Barr; Aust, 1994). Na Tabela 3.1 são apresentadas algumas características dos WRF, do seu sistema enzimático LDS e suas vantagens na biorremediação, que devem ser levadas em conta para o tratamento de diversos poluentes ambientais.

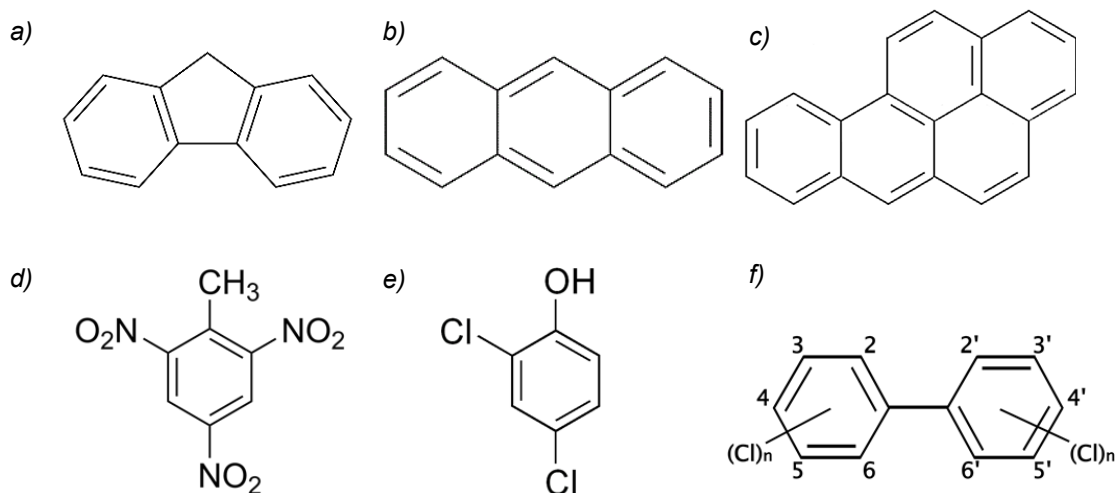


Figura 3.1. Estrutura química de alguns compostos xenobióticos degradados por WRF:
 a) Fluoreno; b) Antraceno; c) Benzopireno; d) TNT; e) 2,4-diclorofenol; f) Bifenilos policlorados
 Fonte: adaptado de Faull (2004) e Sutherland (2004).

Tabela 3.1. Características e vantagens dos WRF e do seu LDS ao ser aplicado em processos de biorremediação de compostos xenobióticos

Características	Vantagem	Referência
Sistema enzimático não específico	A natureza heterogênea da lignina faz com que o LDS dos WRF seja não específico, o que permite degradar poluentes com estruturas similares	Barr e Aust (1994); Bumpus et al. (1985)
Sistema enzimático extracelular	A natureza extracelular do LDS evita que o micro-organismo deva incorporar os poluentes tóxicos no interior da célula, além de que permite degradar compostos com pouca solubilidade	Barr e Aust, (1994); Reddy (1995)
Enzimas não induzíveis	A produção do LDS não é induzida pela lignina e, portanto, nem pelos compostos xenobióticos similares. Isso permite a degradação dos poluentes em baixas concentrações e evita fases de adaptação	Barr e Aust, (1994); Reddy (1995)
Sistema enzimático associado ao metabolismo secundário	Como a produção do LDS está associada ao metabolismo secundário, estes fungos podem crescer em meios de cultura de baixo custo, já que não são exigentes metabolicamente	Barr e Aust (1994); Reddy (1995)
Fungos ubíquos	Desenvolver-se em ambientes naturais ubíquos, permite-lhes crescer em meios econômicos e adaptar-se facilmente aos poluentes	Barr e Aust (1994)
Crescimento em forma de hifas	O crescimento apical em forma de hifas permite-lhes a colonização de diferentes tipos de ambientes, incluindo o solo e meios sólidos e líquidos	Reddy (1995)

Entre os principais WRF usados na biodegradação de poluentes ambientais, destacam-se *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Bjerkandera adusta*. Algumas das pesquisas desenvolvidas com estes fungos degradando compostos xenobióticos são organizadas resumidamente na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Compostos xenobióticos degradados pelo LDS de fungos de podridão branca

Composto Xenobióticos		Espécie de WRF	Referência
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)	Naftaleno	<i>P. chrysosporium</i>	Anastasi et al. (2008)
	Benzopireno	<i>T. versicolor</i>	Collins et al. (1996)
		<i>P. chrysosporium</i>	Barr e Aust (1994); Bumpus et al. (1985)
		<i>P. ostreatus</i>	Wolter et al. (1997)
	Antraceno	<i>P. chrysosporium</i>	Barr e Aust (1994)
		<i>T. versicolor</i>	Collins et al. (1996)
		<i>P. ostreatus</i>	Bezalel et al. (1996)
	Fluoreno	<i>P. chrysosporium</i>	Bogan et al. (1996)
<i>P. ostreatus</i>		Bezalel et al. (1996)	
Explosivos	TNT	<i>P. chrysosporium</i>	Barr e Aust (1994); Esteve-Núñez et al. (2001)
		<i>B. adusta</i>	Eilers et al. (1999)
		<i>T. versicolor</i> e <i>P. ostreatus</i>	Scheibner et al. (1997)
	RDX: Ciclotrimetileno-trinitramina	<i>P. chrysosporium</i>	Barr e Aust (1994)
Organoclorados (inseticidas e pesticidas)	DDT	<i>P. chrysosporium</i> e <i>P. ostreatus</i>	Bumpus e Aust (1987) Bumpus et al. (1985)
	Atrazina	<i>P. pulmonarius</i>	Masaphy et al. (1996)
Polímeros	PVC	<i>P. chrysosporium</i> , <i>Pleurotus</i> sp. e <i>T. versicolor</i>	Kirbas et al. (1999)
	PVA	<i>P. cinnabarinus</i>	Larking et al. (1999)
Clorofenóis	2,4-Diclorofenol	<i>P. chrysosporium</i>	Valli e Gold (1991)
	2,4,5-Triclorofenol		Joshi e Gold (1993)
Bifenilas policloradas (PCBs)	Tetraclorobifenilo	<i>P. chrysosporium</i>	Bumpus et al. (1985)
	2-3-Diclorobifenilo	<i>T. versicolor</i>	Beaudette et al. (1998)

3.2. Os fungos de podridão branca no tratamento de corantes sintéticos

Além dos compostos xenobióticos que são degradados pelos fungos de podridão branca, uma vasta gama de corantes de diversas classes também é removida de efluentes industriais por estes basidiomicetos.

Nos últimos 30 anos, uma vez conhecida a capacidade dos WRF para biodegradar efluentes com corantes industriais, intensificou-se o número de pesquisas nesta área e melhoraram-se os diferentes métodos analíticos e processos associados a este tipo de tratamento, procurando substituir e/ou complementar os processos de tratamento usados industrialmente (Seção 2.4). Os resultados promissores alcançados em diferentes pesquisas fizeram dos fungos de podridão branca os micro-organismos mais reconhecidos e eficientes no tratamento de corantes sintéticos (Ali, 2010; Fu; Viraraghavan, 2001; Rodríguez-Couto, 2015; Wesenberg, 2003).

Esta capacidade de remoção, como ocorre com os poluentes relatados na Seção 3.1.2, está relacionada com a produção do sistema de enzimas associado à degradação da lignina (não específico e extracelular) e a outros mecanismos associados à morfologia das células (Rodríguez-Couto, 2015; Wesenberg, 2003). A similaridade estrutural da lignina e dos corantes permite o uso dos WRF e suas enzimas extracelulares para degradar sua complexa estrutura aromática (Ali, 2010; Rodríguez-Couto, 2015).

Na Figura 3.2 é apresentado um modelo simples da estrutura polimérica da lignina, indicando partes estruturais que podem ser encontradas em vários corantes sintéticos. Algumas destas partes são possíveis alvos de ataque e mineralização das enzimas ligninolíticas Lac, LiP e MnP. Estes focos também podem ser encontrados nas estruturas moleculares da maioria dos corantes industriais, particularmente os azoicos, os mais usados no tingimento de couro. Na Figura 3.3 são apresentadas as estruturas de vários corantes industriais onde é possível localizar também estas partes do esqueleto molecular e visualizar as semelhanças estruturais.

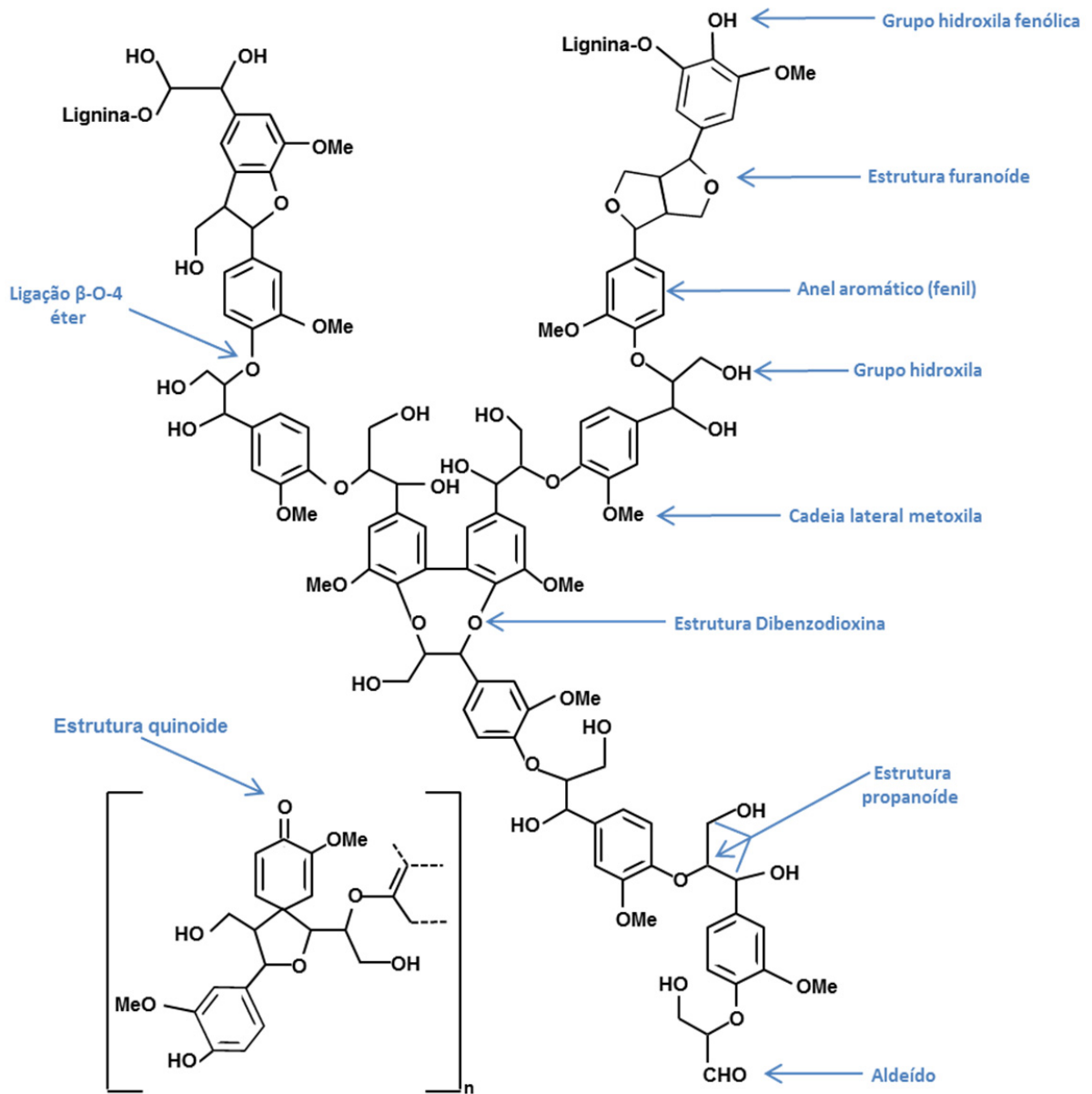


Figura 3.2. Modelo da estrutura química da lignina. Destacam-se partes da estrutura que possuem similaridade com corantes sintéticos
Fonte: adaptado de Kaushik e Malik (2015).

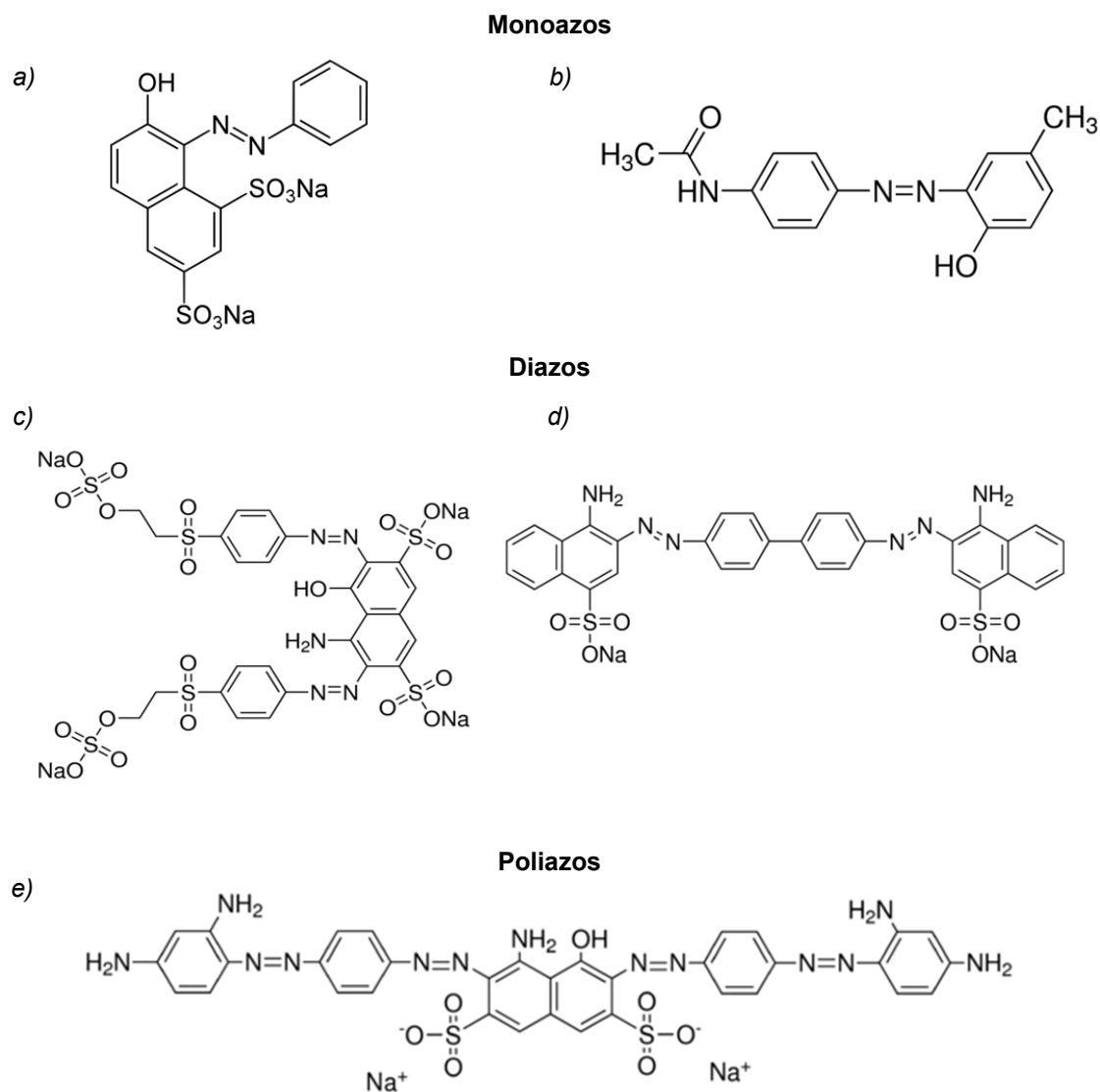


Figura 3.3. Estrutura química de corantes azoicos usados industrialmente: a) *Orange G*, b) *Disperse Yellow 3*, c) *Reactive Black 5*, d) *Congo Red* e e) *Direct Red 80*

Fonte: Adaptado de Rodríguez-Couto, 2015.

Além das vantagens dos WRF no tratamento de compostos xenobióticos que também são aplicáveis na remoção de corantes (ver Tab. 3.1), existem outras que favorecem o uso destes fungos sobre outros micro-organismos:

- As enzimas ligninolíticas são secretadas extracelularmente e se ligam de forma não específica ao substrato, conseguindo assim degradar uma ampla variedade de corantes, além de complexas misturas entre eles, o que é frequente na indústria têxtil e coureira (Kaushik; Malik, 2009).

- Para todas as enzimas ligninolíticas já foi relatada a capacidade de degradar corantes sintéticos: Lac (Abadulla et al., 2000), LiP (Chivukula et al., 1995) e MnP (Heinfling et al., 1998), implicando que para o uso de certa espécie de WRF no tratamento de corantes não seja necessária a produção de todas estas enzimas (Wesenberg, 2003).

- Os fungos de podridão branca apresentam outros mecanismos além da biodegradação enzimática que também são potencialmente eficientes no tratamento de corantes. Estes são a bioacumulação e a bioissorção, e serão abordados na próxima seção (Ali, 2010; Fu; Viraraghavan, 2001; Kaushik; Malik, 2009).

- Os WRF podem se usar de diferentes formas no tratamento de corantes. Entre elas encontram-se a aplicação do micro-organismo vivo (livre ou encapsulado) e o uso de células mortas (Fu; Viraraghavan, 2001; Rodríguez-Couto, 2009), o uso de extratos enzimáticos de uma ou mais enzimas (Niebisch et al., 2010), a aplicação de consórcios com outros fungos ou bactérias (Anastasi et al., 2008) e o tratamento combinado com processos físico-químicos (Palma et al., 2011).

3.3. Mecanismos dos fungos de podridão branca na descoloração de corantes sintéticos

Existem três mecanismos principais envolvidos no processo de remoção de corantes usando WRF: bioissorção, bioacumulação e biodegradação. A bioissorção é um processo independente de energia que envolve a ligação das moléculas de corante à biomassa fúngica, que pode estar viva ou morta. A biodegradação é um processo metabolicamente dependente de energia, onde as moléculas de corante são mineralizadas ou degradadas a compostos mais simples através da ação enzimática. A bioacumulação, que também é um processo metabolicamente dependente de energia, é um processo onde as células em crescimento ativo acumulam as moléculas de corantes dentro do seu citoplasma (Kaushik; Malik, 2015).

3.3.1. *Biossorção de corantes por fungos*

A biossorção faz referência a um processo de adsorção de um composto em meio aquoso que ocorre na superfície de um biomaterial. Este processo envolve a fase sólida ou bioadsorvente (biomassa fúngica), e a fase líquida (efluente ou meio aquoso) que contém o adsorbato (corante) a ser biossorvido (Aksu, 2005; Ali, 2010; Das et al., 2008).

O mecanismo consiste em ligações moleculares entre vários grupos funcionais que se encontram na parede da célula fúngica como grupos amino, carboxílico, tiol e fosfato e moléculas de corante, além de interações eletrostáticas, intercâmbio iônico, complexação, quelação e microprecipitação (Aksu, 2005; Fu; Viraraghavan, 2001; Kaushik; Malik, 2009).

A biossorção de moléculas de corante na superfície das células fúngicas é um processo relativamente rápido e em algumas ocasiões pode levar até poucas horas. Devido ao fato deste processo não estar associado ao metabolismo celular, ele é independente de energia e, portanto, podem ser usadas células vivas ou mortas (Aksu, 2005; Ali, 2010; Kaushik; Malik, 2009, 2015).

A adsorção do corante na superfície das células fúngicas obedece a uma distribuição termodinamicamente definida das fases sólida e líquida em equilíbrio. Esta distribuição é expressa como a quantidade de substância adsorvida por unidade de peso de adsorvente. O equilíbrio de biossorção do sistema é definido pelas isotermas de adsorção. Elas descrevem a interação do adsorbato em solução com o adsorvente a uma temperatura constante. As isotermas mais usadas para descrever a remoção de corante através da biomassa fúngica são as de Langmuir e Freundlich (Aksu, 2005; Das et al., 2008; Fu; Viraraghavan, 2001; Kaushik; Malik, 2009).

O processo de biossorção de corante é afetado por vários parâmetros operacionais, tais como pH, temperatura, agitação, concentração inicial e tipo de corante. Portanto, para obter uma remoção eficiente, é necessário otimizar vários parâmetros do processo (Das et al., 2008; Fu; Viraraghavan, 2001; Kaushik; Malik, 2015).

3.3.2. Bioacumulação fúngica de corantes

O termo bioacumulação no processo de remoção fúngica de corantes faz referência ao acúmulo do corante na biomassa viva. É definido como uma forma especial de bioadsorção, onde existe uma acumulação do poluente na célula em crescimento ativo. Este processo é mediado pela bioadsorção inicial na parede celular do micro-organismo, que é independente do metabolismo, seguido da posterior acumulação do corante no citoplasma da célula (absorção), dependente do metabolismo (Kaushik; Malik, 2015; Wang; Hu, 2008; Xin et al., 2010).

A maioria das pesquisas que envolvem os processos de bioadsorção e/ou bioacumulação são desenvolvidas com fungos diferentes aos WRF, não porque eles não sejam eficientes para este tipo de mecanismo, mas por eles serem mais chamativos no tratamento mediante a biodegradação enzimática. Alguns trabalhos mencionam este mecanismo em WRF (Aksu; Karabayır, 2008; Bayramoğlu; Arıca, 2007; Kaushik; Malik, 2010). Na Tabela 3.3 são apresentados alguns avanços e pesquisas onde são usados fungos no processo de remoção de corantes por bioadsorção e/ou bioacumulação.

Tabela 3.3. Aplicação de fungos na remoção de corantes industriais por processos de bioadsorção e bioacumulação

Espécie	Corante	Mecanismo	Referência
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Acid Brilliant Red B</i>	Bioacumulação	Xin et al. (2012)
<i>P. oxalicum</i>	<i>Reactive Blue 21</i>	Bioacumulação	Xin et al. (2010)
<i>A. niger</i>	<i>Direct Blue 199</i>	Bioadsorção	Xiong et al. (2010)
	<i>Reactive Black 5</i>	Bioacumulação	Taskin e Erdal (2010)
<i>A. filliculoides</i>	<i>Basic Orange</i>	Bioadsorção	Tan et al. (2010)
<i>A. lentulus</i>	<i>Acid Navy Blue</i>	Bioadsorção	Kaushik e Malik (2010)
<i>R. arrhizus</i>	<i>Yellow RL</i>	Bioadsorção	Aksu e Balibek (2010)
<i>A. bisporus</i>	<i>Reactive Red 2</i>	Bioadsorção	Akar e Divriklioglu (2010)
<i>T. versicolor</i>	<i>Gryfalan Black RL</i>	Bioadsorção	Aksu e Karabayır (2008)
	<i>Direct Blue 1 e Direct Red 128</i>	Bioadsorção	Bayramoğlu e Arıca (2007)
<i>R. stolonifer</i>	<i>Bromophenol Blue</i>	Bioadsorção	Zeroual et al. (2006)

3.3.3. *Biodegradação de corantes por fungos de podridão branca*

A biodegradação pode ser definida como a decomposição ou desagregação biológica de um composto químico, que ocorre pela ação de um sistema enzimático constituído por diferentes enzimas e compostos mediadores. A biodegradação pode ser completa ou parcial. O processo onde ocorre a degradação total das moléculas orgânicas até água, dióxido de carbono e/ou qualquer outro produto inorgânico é conhecido como mineralização. No processo de biodegradação parcial, os compostos químicos não são totalmente degradados, sendo fragmentados até moléculas menores e mais simples, chamadas de produtos de degradação (Kaushik; Malik, 2009, 2015). No caso dos fungos de podridão branca, quando é usado o sistema enzimático de degradação da lignina na remoção de corantes, está se referindo a um processo de biodegradação (ver Seção 3.2). Normalmente, os WRF além de biodegradar os corantes até moléculas menos recalcitrantes e de menor peso molecular, conseguem o desaparecimento da cor. A biodescoloração, outro termo de interesse nesta linha de pesquisa, ocorre quando o centro cromóforo do corante é clivado pela ação das enzimas ligninolíticas (Ali, 2010; Kaushik; Malik, 2009)

Com o objetivo de diferenciar entre os diferentes mecanismos que ocorrem no tratamento de corantes por WRF (biossorção, biodegradação ou bioacumulação), é necessário determinar a presença de atividade enzimática no tratamento. Como se mencionou antes, a maioria de pesquisas que envolvem WRF degradando corantes tem se focado no mecanismo de biodegradação, apesar disso, em adição à biodegradabilidade, os mecanismos de biossorção e bioacumulação também podem ser desenvolvidos concomitantemente na descoloração de corantes por fungos vivos. Várias pesquisas têm relatado que ocorre uma etapa de desaparecimento rápido (horas) da cor residual (biossorção), seguido da remoção gradual da cor associada à biomassa fúngica em longos períodos de tempo (semanas ou dias) até alcançar o equilíbrio (biodegradação) (Ali, 2010; Fu; Viraraghavan, 2001; Kaushik; Malik, 2009).

3.3.4. Biodegradação vs. Biossorção

Com o objetivo de otimizar os processos de remoção da cor mediante o uso de WRF para o tratamento de corantes, é necessário saber qual mecanismo é o mais apropriado nas diferentes condições de operação que dependem do meio de cultura, pH, temperatura, concentração inicial e tipo de corante, presença de oxigênio, agitação, pré-tratamentos, entre outros (Das et al., 2008; Fu; Viraraghavan, 2001). Essa comparação pode ser realizada conhecendo as vantagens e desvantagens de cada mecanismo:

- A biossorção, por exemplo, tem certas vantagens sobre processos de biodegradação, já que podem ser usados biossorventes de baixo custo como resíduos de biomassa fúngica de processos de fermentação industrial (Das et al., 2008; Fu; Viraraghavan, 2001; Kaushik; Malik, 2015). O biossorvente, por outro lado, pode ser eluído e regenerado, retirando o corante da biomassa por médio de produtos químicos como alcaloides, agentes quelantes, metanol, etanol e alguns surfactantes não iônicos tais como Tween 80. Além disso, para processos de biossorção podem ser usadas células fúngicas mortas, o que economiza custos na manutenção de linhagens, necessária em processos de biodegradação. Em comparação às células vivas, as células mortas podem ser utilizadas e armazenadas por longos períodos de tempo sem afetar a sua capacidade de biossorção, a sua operação é fácil e a regeneração é simples (Fu; Viraraghavan, 2001; Kaushik; Malik, 2015). Por outro lado, a biodegradação tem uma vantagem chave sobre a biossorção. Na biodegradação, o corante é degradado parcialmente ou mineralizado, enquanto na biossorção o corante não é destruído, permanecendo retido, quase intacto, no interior da biomassa microbiana para a sua posterior eliminação. Isso representa um grande obstáculo, já que pode não ser uma abordagem prática para o tratamento de grandes volumes de efluentes industriais (Ali, 2010; Das et al., 2008). A Tabela 3.4. resume as principais diferenças entre os três principais mecanismos envolvidos no processo de remoção de corantes usando fungos de podridão branca.

Tabela 3.4. Comparação entre os mecanismos de transformação de corantes por WRF (biossorção, bioacumulação e biodegradação)

	Biossorção	Bioacumulação	Biodegradação
Energia	Processo passivo	Processo ativo	Processo ativo
Biomassa	Células mortas ou vivas	Células vivas	Células vivas
Reação com as moléculas de corante	União à superfície celular	União inicial à superfície celular, seguido da incorporação ao citoplasma da célula	As moléculas de corante são biodegradadas enzimaticamente
Princípio do mecanismo	Adsorção	Absorção	Adsorção inicial seguida de biodegradação extracelular
Reversibilidade	Processo reversível	Processo parcialmente reversível	Processo irreversível
Tempo	Processo rápido de uma etapa	Processo de duas etapas	Processo longo
Nutrientes, metabolismo e crescimento celular	Não precisa de nutrientes	Nutrientes e manutenção necessária	Nutrientes e manutenção necessária
Metabolismo e crescimento celular	Processo não depende de metabolismo. Para o caso de células vivas pode haver crescimento celular	Processo dependente do metabolismo onde existe crescimento celular	Processo dependente do metabolismo, existe crescimento celular

Fonte: adaptado de Chojnacka (2010) e Kaushik e Malik (2015).

3.4. Antecedentes da biodegradação de corantes azoicos por fungos de podridão branca

Como se mencionou na Seção 2.2.2, os corantes azoicos são o tipo de corante mais usado na indústria têxtil e coureira e, portanto, o mais produzido e distribuído comercialmente. Existem várias razões para a popularidade dos corantes azoicos, entre as que se destacam a disponibilidade de tons (quase todas as cores no espectro), a facilidade de fixação a uma variedade de fibras naturais e sintéticas e a resistência à degradação. Sendo, todavia, essa vantagem industrial de resistência à biodegradação o que produz o impacto ambiental negativo associado ao uso destes corantes (Bumpus, 2003).

O aumento do rigor das legislações ambientais em relação à remoção de corantes azoicos dos efluentes industriais, ligado à preocupação global provocada pelo alto uso destes corantes e à produção de grandes volumes de efluentes, incentivou um amplo número de pesquisas procurando uma solução desse problema. Na próxima seção faz-se uma revisão da literatura na qual se destaca o uso de fungos de podridão branca no tratamento de corantes azoicos.

3.4.1. *Histórico da biodegradação de corantes azoicos por fungos de podridão branca*

Os primeiros ensaios de biodegradação de corantes foram realizados por Glenn e Gold (1983), que testaram a descoloração de corantes poliméricos sulfonados para fazer uma triagem da atividade ligninolítica em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* (Wesenberg, 2003).

Posteriormente, os resultados do trabalho de Bumpus et al. (1985), que mostraram as notáveis habilidades de degradação de compostos xenobióticos pelo mesmo WRF, levaram Cripps et al. (1990) a estudar a capacidade do fungo para degradar corantes azoicos. Eles mostraram como os corantes *Orange II*, *Tropaeolin O*, e *Azure 2* foram extensivamente descoloridos pelo WRF crescendo em um meio de cultura com limitação de nutrientes (nitrogênio), com o objetivo de promover a expressão do sistema de enzimas ligninolíticas. A descoloração esteve associada à produção da enzima LiP (Cripps et al., 1990). Esse trabalho foi reportado como o primeiro em biodegradar corantes azoicos envolvendo fungos de podridão branca (Bumpus, 2003; Reddy; Mathew, 2001; Rodríguez-Couto, 2015; Wesenberg, 2003). Poucos anos depois, Spadaro et al. (1992) mostraram como sete corantes azoicos (*Disperse Yellow 3*, *Disperse Orange 3*, *Solvent Yellow*, etc.) foram descoloridos e degradados por *P. chrysosporium* em um meio de cultura com limitação de nitrogênio. Os autores observaram como carbonos radio-marcados do anel aromático foram mineralizados até CO₂ (Spadaro et al., 1992). Desde então, *P. chrysosporium* converteu-se em objeto de intensa pesquisa, procurando biodegradar diferentes corantes azoicos e outros compostos recalcitrantes (Rodríguez-Couto, 2015).

Vários outros trabalhos reportaram a capacidade de *P. chrysosporium* para biodegradar outros corantes azoicos (Chagas; Durrant, 2001; Pasti-Grigsby et al., 1992; Swamy; Ramsay, 1999; Young; Yu, 1997).

Por outro lado, os resultados promissores obtidos com *P. chrysosporium* aceleraram a busca de outras espécies de WRF com capacidade de degradar corantes azoicos. Entre os principais WRF que conseguiram degradar amplamente corantes azoicos, além de *P. chrysosporium*, destacam-se *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta* e *Ganoderma* sp. (Bumpus, 2003; Rodríguez-Couto, 2015) (Fig. 3.4).



Figura 3.4. Espécies de WRF que se destacam na biodegradação de corantes azoicos: a) *Trametes versicolor*; b) *Bjerkandera adusta*; c) *Pleurotus ostreatus*; d) *Ganoderma* sp.
Fonte: Desjardin et al., 2015.

Vários autores já publicaram extensas e importantes revisões sobre o uso de fungos na remoção de corantes industriais (Bumpus, 2003; Fu; Viraraghavan, 2001; Knapp et al., 2001; Wesenberg, 2003). Nessas revisões é possível achar várias pesquisas onde são usados fungos de podridão branca na biodegradação de corantes azoicos. Na Tabela 3.5 são mostrados alguns destes primeiros trabalhos (publicados desde 1990 até 1998), que aportaram bastante ao desenvolvimento desta linha de pesquisa.

3.4.2. Atualidade da biodegradação de corantes por fungos de podridão branca

Para fazer uma abordagem mais prática e eficaz, nesta seção serão consideradas as pesquisas mais recentes envolvendo WRF no tratamento de corantes azoicos em trabalhos publicados desde 2005 até 2015 (Tab. 3.6). Nesta última década, um vasto número de pesquisas também se focou em isolar e testar novas espécies de WRF capazes de biodegradar corantes azoicos com importância industrial, otimizar as condições de operação, usar enzimas purificadas produzidas pelos WRF diretamente no tratamento, desenvolver ferramentas analíticas para estudar os mecanismos de ação abrangidos na degradação e entender a participação direta de cada enzima no processo (Ali, 2010; Kaushik; Malik, 2009, 2015):

- Ma et al. (2014) conseguiram degradar eficientemente o corante azoico *Reactive Orange 16* em um efluente simulado da indústria têxtil, usando enzimas puras extraídas de um fungo do gênero *Ganoderma*. Os autores reportaram que a enzima lacase foi a responsável pela degradação.

- Senthilkumar et al. (2014) simularam um efluente da indústria têxtil contendo o corante azoico *Amido Black 10B*, conseguindo valores de descoloração de até 98% após 3 dias de tratamento pela ação do LDS do fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Eles avaliaram como os nutrientes, as diferentes condições de operação e a adição de indutores enzimáticos melhoraram o processo de descoloração.

- Gomi et al. (2011) examinaram a degradação do corante azoico *Amaranth* por meio do fungo *Bjerkandera adusta*. Usando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), análises de absorvância e espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS), identificaram os produtos de degradação, sugerindo que não se formaram aminas aromáticas. A enzima MnP esteve associada à biodegradação.

- Levin et al. (2010) mostraram como as enzimas de vários WRF (*T. trogii*, *T. villosa* e *T. versicolor*) conseguiram degradar o corante azoico *Xylidine*. Eles analisaram como diferentes fontes de nitrogênio e vitaminas afetaram a atividade enzimática. As enzimas Lac e MnP foram produzidas pelos três fungos.

- Zhao e Hardin (2007) conseguiram biodegradar vários corantes azoicos como *Orange II*, *Acid Orange 8* e *Food Yellow 3* usando cepas de *P. ostreatus*. A enzima LiP esteve envolvida no processo de degradação.

Várias outras pesquisas direcionaram-se ao desenvolvimento de biorreatores que poderiam ampliar e escalonar os processos de biodegradação, uma área pouco explorada nos primeiros dez anos de pesquisa (Bumpus, 2003), e desenvolver o uso de técnicas de imobilização de células com o objetivo de aumentar o nível de atividade e a resistência a estresses ambientais, tais como o pH, a temperatura e a exposição a concentrações químicas tóxicas (Ali, 2010; Kaushik; Malik, 2009, 2015; Rodríguez-Couto, 2009, 2015):

- Enayatizmir et al. (2011) conseguiram a biodegradação *in vivo* do corante diazoico *Reactive Black 5* pelo fungo de podridão branca *P. chrysosporium* imobilizado em peneiras de náilon e em cascas de girassol, usando biorreatores em escala de laboratório. Os autores atingiram valores de descoloração de 90,3%. A enzima MnP foi a responsável da degradação. Em 2009, os mesmos autores estudaram a produção de lacase para descolorir o mesmo corante com o WRF *T. pubescens* imobilizado em peneiras de aço inoxidável em um reator de leito fixo. Os mecanismos de biossorção e biodegradação enzimática (Lac) estiveram associados à descoloração. O valor máximo de descoloração foi de 74% (Enayatizmir, et al., 2009).

- Novotný et al. (2011) propuseram o uso de um biorreator com um consórcio de bactérias e WRF para a degradação de diferentes corantes industriais, entre eles o azoico *Reactive Orange 16*. O processo consistiu em duas etapas: no primeiro passo usou-se um filtro biológico com o fungo *Irpeux lacteus* para descoloração do corante, seguido do uso de um biorreator com bactérias para a remoção aeróbica do carbono orgânico residual. As enzimas Lac e MnP foram responsáveis da degradação.

- Diorio et al. (2008) mostraram como o fungo *Trametes versicolor* degradou eficientemente o corante *Malachite Green* em um biorreator de duas fases pelo efeito das enzimas Lac e MnP. A descoloração total atingiu valores de 82% após cinco ciclos consecutivos.

- Li e Jia (2008) usaram um biorreator de leito fixo (PBR: *Packed Bed Reactor*) para degradar o corante azoico *Congo Red*. O processo também se baseou em duas etapas. Na primeira etapa usaram o fungo *Schizophyllum* sp. para biodegradar o corante e na segunda usaram casca de arroz como biossorvente. Os autores notaram que a biodegradação foi causada pelo efeito da enzima MnP produzida pelo fungo. Eles usaram a técnica de planejamento composto central (CCD: *central composite design*) para otimizar o efeito das condições de operação.

- Gao et al. (2008) desenvolveram um método de tratamento para a degradação do corante *Reactive Brilliant Red*, utilizando o WRF *Phanerochaete chrysosporium* imobilizado em dois diferentes suportes: transportadores reticulados e espuma de poliuretano (PUF, do inglês "*Polyurethane Foam*"). Os autores conseguiram valores de descoloração de 93.5% graças à enzima MnP.

Na Tabela 3.7 são mostradas as principais pesquisas sobre biodegradação de corantes azoicos envolvendo o uso de WRF em biorreatores e/ou com a técnica de imobilização de células.

Tabela 3.5. Pesquisas sobre biodegradação de corantes envolvendo o uso de WRF publicadas entre 1990-1998

Espécie fúngica	Corante - Concentração (mgL ⁻¹)	% Remoção	Tempo (dias)	Mecanismo enzimático	Observação	Referência
<i>P. chrysosporium</i>	<i>Orange II</i> - 100	100	5	LiP	Primeiro trabalho em degradar corantes azoicos com WRF	Cripps et al. (1990)
	<i>Tropaeolin O</i> - 100	97		-		
	<i>Congo Red</i> - 100	96				
	<i>Disperse Yellow 3</i> - (-)	42	12	-	Comportamento da estrutura do corante degradado usando átomos de carbono radio-marcados	Spadaro et al. (1992).
	<i>Disperse Orange 3</i> - (-)	42,5				
	<i>Solvent Yellow 14</i> - (-)	23,1				
	<i>Methyl Orange 52</i> - 150	92	15	LiP e MnP	Sugeriram que as enzimas peroxidases estiveram envolvidas na degradação do corante	Pasti-Grigsby et al. (1992).
	<i>Ethyl Orange</i> - 300	94				
	<i>Acid Orange 12</i> - 150	98				
	<i>New Coccine (Ponceau 4R)</i> - 50	98,0	8	MnP	Estudaram também o fungo <i>P. sajor-caju</i> , degradando os dois corantes pela ação da lacase	Chagas e Durrant (2001).
<i>Amaranth</i> - 50	95					
	<i>Acid Black 24</i> - 50	98	9	LiP	Estudaram a degradação com o fungo <i>T. versicolor</i> e com a enzima pura, conseguindo só 25% de descoloração	Young e Yu (1997).
<i>T. versicolor</i>	<i>Brilliant Yellow</i> - (-)	98	-	Biossorção e LiP	Avaliaram a capacidade de 7 WRF para descolorir 14 corantes diferentes	Knapp et al. (1995).
	<i>Reactive Red 4</i> - (-)	100				
		<i>Reactive Violet 5</i> - 200	95	6	Peroxidases	Examinaram também a eficiência de descoloração com o extrato enzimático. Não relataram biossorção no micélio
<i>P. ostreatus</i>	<i>Methyl Orange</i>	96	5 min.	Peroxidases	Estudaram a descoloração com o extrato enzimático	Shin e Kim (1998).
	<i>Brilliant Yellow</i> - (-)	53	-	Biossorção e LiP	-	Knapp et al. (1995).
	<i>Reactive Red 4</i> - (-)	73				
<i>B. adusta</i>	<i>Reactive Violet 5</i>	95	6	Peroxidases	-	Heinfling et al. (1997).
	<i>Reactive Black 5</i>	87	20 min.	MnP	Estudaram a descoloração com o extrato enzimático	Heinfling et al. (1998).

Tabela 3.6. Pesquisas sobre biodegradação de corantes envolvendo o uso de WRF publicados entre 2005-2015

Espécie fúngica	Corante - concentração (mgL ⁻¹)	% Remoção	Tempo (dias)	Mecanismo enzimático	Observação	Referência
<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Reactive Orange</i> 16 - 100	95,1	4	Lac	Testaram as células fúngicas e seu extrato enzimático	Ma et al. (2014)
	Efluente textil simulado com <i>Reactive Orange</i> 16 – (-)	89,5	10			
<i>P. chrysosporium</i>	Efluente textil simulado com <i>Amido Black</i> 10B – (-)	98	3	Lac e MnP	O aumento da concentração de corante no efluente suprimiu a capacidade de descoloração	Senthilkumar et al. (2014)
<i>B. adusta</i>	<i>Amaranth</i> - 94	98	10	MnP	Testaram as técnicas HPLC e ESI-TOFM para encontrar os produtos de degradação	Gomi et al. (2011)
<i>T. trogii</i>	<i>Xilidine</i> – (-)	94	1	Lac e MnP	Analisaram como diferentes fontes de aminoácidos, nitrogênio e vitaminas afetaram a atividade enzimática	Levin et al. (2010)
<i>T. versicolor</i>	<i>Acid Red</i> 66 - 100	88,6	7	Peroxidases	Os efeitos das variáveis independentes, tais como fonte de carbono, nitrogênio, pH e temperatura na biodescoloração foram avaliados	Sukumar et al. (2009)
<i>T. maxima</i>	<i>Acid Red</i> 44 – (-)	98	24	Lac	Realizaram uma triagem em meio sólido e outra em meio líquido para avaliar o potencial de cepas nativas	Hernández-Luna et al. (2008)
<i>T. trogii</i>	<i>Reactive Black</i> 5 - 100	98	3	Lac, MnP e biossorção	Triagem em meio sólido/líquido. Descoloração com cultivos em bateladas repetidas	Park et al. (2007)
	<i>Reactive Orange</i> 16 - 100					
	<i>Acid Black</i> 52 -100					
<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Amaranth</i> - 100	96	8 horas	Enzimas ligninolíticas	Testaram um fungo nativo e otimizaram as variáveis operacionais usando o método de matriz ortogonal. Testaram também um efluente real	Revankar e Lele (2007)
<i>T. trogii</i>	<i>Neolane blue</i>	91,5	4	Lac	Isolaram e identificaram um WRF nativo. Usando a enzima bruta obtiveram degradar os corantes	Zouari-Mechichi et al. (2006)
	<i>Neolane pink</i>	63,6				
	<i>Neolane yellow</i>	100*(induzida)				

Tabela 3.7. Pesquisas sobre biodegradação de corantes envolvendo o uso de WRF em biorreatores e ou/ imobilização de células

Espécie fúngica	Corante - concentração (mgL ⁻¹)	% Remoção	Tempo (horas)	Mecanismo enzimático	Biorreator	Suporte celular	Referência
<i>P. chrysosporium</i>	<i>Reactive Black 5</i> - 100	90,3	72	MnP	Escala de laboratório	Casca de girassol	Enayatizamir et al. (2011)
<i>I. lacteus</i>	<i>Reactive Orange 16</i> - 150	89,2	72	Lac e MnP	Duas fases	Espuma de poliuretano (PUF)	Novotný et al. (2011)
<i>T. pubescens</i>	<i>Reactive Black 5</i> - 34	74	24	Lac e Biossorção	Leito fixo	Peneiras de aço inoxidável	Enayatizamir et al. (2009)
<i>T. versicolor</i>	<i>Malachite green</i> - 100	50	1	MnP e Lac	Duas fases	-	Diorio et al. (2008)
<i>Schizophyllum</i> sp.	<i>Congo Red</i> - 142,63	89,71	41	MnP	Leito fixo	-	Li e Jia (2008)
<i>P. chrysosporium</i>	K-2BP	95	72	MnP	Escala de laboratório	Espuma de poliuretano (PUF)	Gao et al. (2008)
<i>I. lacteus</i>	<i>Reactive Orange 16</i>	80	24	MnP e Lac	Reator pressurizado	Espuma de poliuretano (PUF)	Svobodová et al. (2007)
<i>T. versicolor</i>	<i>Grey lanaset G</i> - 150	>80	18 - 120	MnP e Lac	Leito fluidizado	-	Blánquez et al. (2007)
<i>T. versicolor</i>	<i>Grey lanaset G</i> - 150	>90	144	Lac	Leito pulso-fluidizado (PBF)	-	Romero et al. (2006)
<i>T. hirsuta</i>	<i>Methyl Orange</i> - 60	81,4	72	Lac	Leito expandido	Casca de laranja	Rodríguez-Couto et al. (2006)
<i>P. chrysosporium</i>	<i>Direct Blue 15</i> - 40	95	72	MnP	Leito fixo	Pedra pomes-ZrOCl ₂	Pazarlioglu et al. (2005)
<i>I. lacteus</i>	<i>Remazol Brilliant Blue R</i> - 150	85,8	144	Lac e MnP	Leito fixo	Espuma de poliuretano (PUF)	Novotný et al. (2004)
		100				Madeira de Pinho	

3.4.3. *Perspectiva, longe da real aplicação?*

Muitas das publicações demonstraram o importante potencial dos WRF para degradar os corantes individuais em solução aquosa ou efluentes preparados artificialmente. Esses resultados promissores apontam para os WRF como uma alternativa de biorremediação destes corantes e outros compostos xenobióticos. Contudo, as características das águas residuais industriais tais como pH bastante alcalino, altas concentrações de corante, condições não estéreis, misturas com outros corantes e compostos recalcitrantes (como surfactantes, pigmentos e aditivos), elevadas temperaturas e grandes volumes de efluente, fazem que a real aplicação a escala industrial deste tipo de tratamento seja ainda um desafio (Ali, 2010; Rodriguez-Couto, 2013; Wesenberg, 2003). Relativamente poucos trabalhos testaram a descoloração/degradação de efluentes reais. Vários trabalhos desenvolvidos onde foram usados WRF no tratamento de efluentes reais são mostrados na Tabela 3.8.

3.5. **Fungos da podridão branca e a indústria de couro**

A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura, nos quais se usam WRF no tratamento de corantes e efluentes industriais, corresponde à área têxtil. No entanto, a vantagem do LDS dos WRF em não ser específico pelo substrato, permite que os corantes desenhados especificamente para couro e outros compostos xenobióticos produzidos na indústria coureira também sejam alvo de biodegradação dos WRF. Na continuação é apresentada uma revisão de trabalhos onde foram usados WRF no tratamento de corantes para couro e efluentes:

- Rodriguez-Couto et al. (2004) analisaram a produção da enzima Lac pelo fungo *T. hirsuta* usando um biorreator de imersão com peneiras de aço inoxidável como imobilizador celular, com o objetivo de degradar corantes para couro. O extrato bruto conseguiu 16,2% e 40% de descoloração em 2 horas para os corantes *Luganil Green* e *Sella Solid Red* respectivamente.

Tabela 3.8. Pesquisas sobre biodegradação efluentes reais envolvendo o uso de WRF

Espécie fúngica	Fonte do Efluente	Biorreator-Escala	Operação	Observação	Referência
<i>G. lucidum</i>	Fábrica têxtil	Reator sequencial em batelada	Diluição de concentração e ajuste de pH	81,4% de descoloração e 90,3% de redução de DQO (sob condições otimizadas)	Selvakumar et al. (2013)
<i>T. pubescens</i>	Fábrica têxtil	Biorreator de leito móvel - Laboratório	Células fúngicas imobilizadas em PUF. Adição de nutrientes e ajuste de pH	Processo combinado ao tratamento de lodos ativados. Mais de 60% de descoloração, redução de DQO e toxicidade do efluente	Anastasi et al. (2012)
<i>Bjerkandera</i> sp.	Fábrica têxtil	Laboratório	Condições estéreis/não estéreis. Adição de nutrientes	65% de descoloração em 8 dias. 58% de redução da toxicidade para condições estéreis e 40% para condições não estéreis	Osorio-Echavarría et al. (2011)
<i>B. adusta</i>	Fábrica têxtil após tratamento secundário	Laboratório	Adição de nutrientes	Compararam o processo com o tratamento terciário (ozonização) em um efluente, após do tratamento secundário. Conseguiram 40% em 24 h, menos que com o tratamento convencional	Anastasi et al. (2011)
<i>P. chrysosporium</i>	Fábrica têxtil	Laboratório	Adição de nutrientes. Efluente puro (sem diluir)	35% de descoloração sem adição de nutrientes e 84% com adição. Processo de 6 dias de operação	Sangeeta et al. (2011)
<i>B. adusta</i>	Fábrica de tingimento têxtil	Reator de leito fixo - Laboratório	Condições não estéreis. Sem adição de nutrientes	Reduziram o DQO e a toxicidade do efluente	Anastasi et al. (2010)
<i>T. versicolor</i>	5 Fábricas têxtis diferentes	Laboratório	Condições não estéreis e adição de nutrientes	84% de descoloração em 3 dias por ação da enzima MnP	Asgher et al. (2009)
<i>T. versicolor</i>	Fábrica têxtil	Reator Air-lift - Escala piloto (10 L)	Condições não estéreis e adição de nutrientes	Tratamento contínuo. 40 a 60% de descoloração em 15 dias de operação	Blánquez et al. (2008)

- Gómez-Bertel et al. (2008) estudaram a descoloração de um efluente de curtume mediante o uso de células do fungo *P. chrysosporium* imobilizadas em PUF em escala de laboratório. Além de atingir 67% de descoloração do efluente em 10 dias, conseguiram diminuir 97% do Cromo total, 97% de Cr(III), 85% de Cr(VI) e 12% de DQO. Os mecanismos de bio sorção e degradação enzimática foram determinantes no tratamento.

- Anastasi et al. (2010) estudaram a descoloração de um efluente de tingimento de uma fábrica de couro contendo os corantes *Acid Black 194*, *Acid Black 210* e *Acid Yellow 194* por cepas dos fungos de podridão branca *B. Adusta* e *P. ostreatus*. Os autores usaram um biorreator de leito fixo sem adição de nutrientes e em condições não estéreis. Os fungos atingiram 88% e 81% de descoloração respectivamente.

- Bacchar et al. (2011) avaliaram o potencial de três WRF (*T. versicolor*, *G. lucidum* e *I. lacteus*) para degradar o corante comercial para couro *Black Dycem* em uma triagem primária (meio sólido) e secundária (meio líquido). A cepa de *T. versicolor* mostrou a maior capacidade de descoloração. O experimento foi escalonado em um biorreator *air-lift* em lotes individuais e em bateladas com reutilização de biomassa. O fungo atingiu valores de descoloração entre 86% a 89%. Os mecanismos envolvidos no tratamento foram atividade enzimática Lac e bio sorção.

- Pazarbasi et al. (2012) estudaram a descoloração do corante para couro *Acid Blue 7* com *T. trogii*. Os autores avaliaram e otimizaram as condições de operação e atingiram 99,9% de descoloração sob agitação e 63,5% em condições estáticas. A descoloração esteve associada com a atividade lacase. Além disso, foi avaliado o tratamento de uma mistura de *Acid Blue 7* com outros corantes para couro (*Acid Black 210*, *Acid Green 20*, *Acid Yellow 36* e *Acid Black 24*) e a descoloração de um efluente de curtume contendo *Acid Blue 7*. Alcançou-se 88% e 48% de descoloração respectivamente.

3.6. *Trametes villosa* em processos de biorremediação

Trametes villosa é um fungo de podridão branca que pertence ao gênero *Trametes* e a família *Polyporaceae* (Ko; Jung, 1999). Foi descrito pela primeira vez por Olof Swartz em 1788 com o nome de *Boletus villosus*. Recebeu seu nome atual de Kreisel (1971), mas também é conhecido como *Polyporus pinsitus* ou *Coriolus pinsitus* (Kreisel, 1971). Embora o gênero *Trametes* seja um dos grupos de fungos mais estudados para aplicações biotecnológicas e biodegradação de corantes industriais e outros produtos xenobióticos, a espécie *Trametes villosa* não tem sido tão amplamente estudada como outras espécies entre as que se destacam *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *T. pubescens* e *T. trogii*, abordados em vários trabalhos mencionados nesta revisão.

Böttcher et al. (1988) foram os primeiros autores em reportar a atividade enzimática ligninolítica em *T. villosa* (Böttcher et al., 1988) e mais tarde, Hüttermann et al. (1989) reportaram a produção da enzima lacase (Kuhad; Singh, 2007) e De Jong et al. (1992) destacaram a produção da enzima peroxidase dependente de manganês (De Jong et al., 1992). Yaver et al. (1996) foram os primeiros a purificar e clonar diferentes isoenzimas de lacase produzidas por esta espécie (Yaver; Golightly, 1996; Yaver et al., 1996).

Vários autores já comprovaram o potencial de *T. villosa* para biodegradar diferentes compostos xenobióticos como o pesticida de alto espectro Cyprodini® (Kang et al., 2002), compostos fenólicos como Bisfenol A (Fukuda et al., 2001; Uchida et al., 2001), compostos organoclorados tais como pentaclorofenol e hexaclorobenzeno (Machado et al., 2005; Matheus et al., 2000), efluentes do processo de branqueamento de papel (Minussi et al., 2007) e corantes industriais (Basto et al., 2007; Hernández-Luna et al., 2008; Levin et al., 2010; Zille et al., 2005).

4

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo descreve-se a metodologia seguida no estudo, que considerou o caminho desde a coleta e isolamento de fungos de podridão branca até a posterior identificação molecular do isolado que apresentou os melhores resultados. Os ensaios de descoloração foram divididos em duas etapas: a primeira teve como objetivo selecionar, mediante uma triagem em meio sólido, isolados com capacidade de produzir enzimas ligninolíticas e remover os corantes para couro. A segunda etapa considerou ensaios de descoloração em meio de cultura líquido. Vários experimentos adicionais foram realizados para analisar os mecanismos envolvidos no processo. Entre eles encontram-se estudos para avaliar o efeito das variáveis de operação e testes de otimização mediante um planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (CCD) e Metodologia de Superfície de Resposta (RSM).

4.1. Materiais

Os produtos usados nos experimentos foram reagentes de grau analítico, a menos que esteja especificado o contrário. O material foi dividido em produtos químicos, que incluem reagentes usados como indicadores de atividade enzimática, antibióticos e materiais usados na preparação de meios de cultura, e em corantes, que incluem os corantes para couro que se pretendia degradar e os experimentos preliminares realizados com eles:

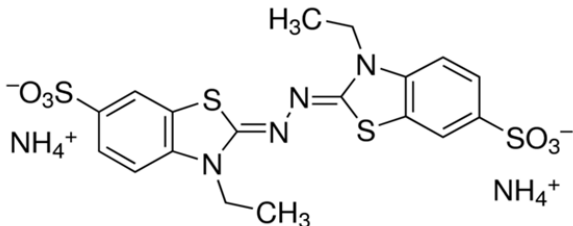
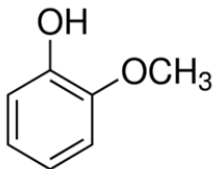
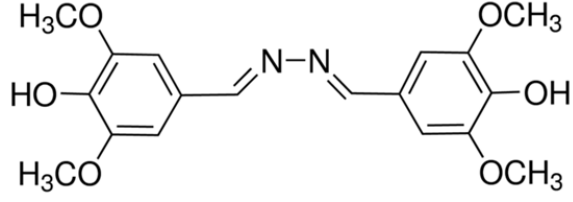
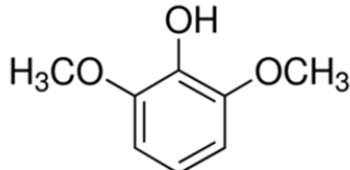
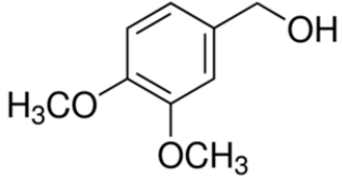
4.1.1. Produtos químicos

- Os compostos usados como indicadores da atividade enzimática e/ou como quantificadores da produção de enzima extracelular foram: ABTS (ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) sal diamônio, guaiacol (GUA: 2-metóxfenol), siringaldazina (SYR: 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-benzaldeído azina), cloreto de manganês (CM: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$), xilenol (DMP: 2,6-dimetóxfenol) e álcool veratrílico (VA, 3,4-dimetóxi-benzil álcool), fornecidos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO-USA) ou Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). A estrutura química e algumas características desses produtos, informadas pelo fornecedor, são apresentadas na Tabela 4.1.

- Os antibióticos Cloranfenicol® e Cloridrato de Tetraciclina foram adquiridos na Teuto-Pfizer (Anápolis, GO-Brasil) e o fungicida Benomyl® foi fornecido por Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA).

- Os produtos usados na preparação dos meios de cultura para o crescimento dos micro-organismos como glicose, ágar, extrato de levedura, peptona micológica, Meio comercial Ágar Batata Dextrose (PDA), Meio comercial Ágar Extrato de Malte (MEA) e Meio comercial Caldo Extrato de Malte (MEB) foram adquiridos de Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) ou Himedia Laboratories (Mumbai, Índia).

Tabela 4.1. Estrutura molecular e características dos substratos para enzimas ligninolíticas

Substrato	Estrutura Molecular	Características
ABTS	 <p>2,2' – Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio</p>	<p>CAS^a 30931-67-0</p> <p>Fórmula C₁₈H₂₄N₆O₆S₄</p> <p>Massa molar 548,68 g mol⁻¹</p>
GUA	 <p>2-metóxfenol</p>	<p>CAS 90-05-1</p> <p>Fórmula (CH₃O)C₆H₄OH</p> <p>Massa molar 124,14 g mol⁻¹</p>
SYR	 <p>4-hidróxi-3,5-dimetóxi-benzaldeído azina</p>	<p>CAS 14414-32-5</p> <p>Fórmula [HOC₆H₂(OCH₃)₂CH=N]₂</p> <p>Massa molar 548,68 g mol⁻¹</p>
DMP	 <p>2,6-dimetóxfenol</p>	<p>CAS 91-10-1</p> <p>Fórmula (CH₃O)₂C₆H₃OH</p> <p>Massa molar 154,16 g mol⁻¹</p>
VA	 <p>3,4-dimetóxi-benzil álcool</p>	<p>CAS 93-03-8</p> <p>Fórmula (CH₃O)₂C₆H₃CH₂OH</p> <p>Massa molar 168,19 g mol⁻¹</p>

^a Número CAS (CAS, do inglês “*Chemical Abstracts Service*”).

4.1.2. Corantes e testes espectrofotométricos

Foi analisada a descoloração de quatro corantes comerciais usados no tingimento de couro: *Acid Blue* 161, *Acid Brown* 414, *Acid Black* 210 e *Acid Red* 357, que serão chamados de Azul 161 (AB161), Marrom 414 (AB414), Preto 210 (AB210) e Vermelho 357 (AR357), respectivamente ao longo do presente trabalho. Todos os corantes foram fornecidos pela Unidade de Negócios em Couro da Companhia Lanxess Ltda., Ind. de Produtos Químicos e Plásticos (São Leopoldo, RS, Brasil).

Para analisar o comportamento dos corantes em solução aquosa, foi realizado um teste espectrofotométrico que permitiu achar o comprimento de onda com maior absorvância de cada corante. O teste consistiu em uma varredura de absorção no intervalo do espectro eletromagnético correspondente à luz visível. Usou-se um espectrofotômetro UV-VIS T80 de PG Instruments Ltd. (Leicester, LEC, UK).

Após conhecer o λ_{Max} de cada corante, foi construída uma curva padrão para relacionar a concentração de corante em solução aquosa em função da absorvância no λ_{Max} ($\text{ABS}_{\lambda_{\text{Max}}}$). Preparou-se, para isso, uma solução padrão contendo 1000 mgL^{-1} do corante e foram realizadas diluições sucessivas até que se obtivessem diferentes concentrações. Foram feitas leituras da absorvância no λ_{Max} de cada diluição com concentração conhecida.

Finalmente, analisou-se a estabilidade de cada corante em solução aquosa quando submetidos a diferentes condições de pH e temperatura. No caso do pH prepararam-se soluções de corantes em uma faixa de pH de 2,5 a 7,5 usando soluções 0,1 M de NaOH e HCl, a uma concentração conhecida (200 mgL^{-1}) e mediu-se a $\text{ABS}_{\lambda_{\text{Max}}}$ à temperatura ambiente. Cabe ressaltar que quando se aumentou o volume da solução ao adicionar HCl ou NaOH também se adicionou corante até alcançar a concentração desejada. Para testar a estabilidade da solução a diferentes condições de temperatura, a solução aquosa de corante (pH 5,0 e concentração 200 mgL^{-1}) foi resfriada em banho de resfriamento até uma temperatura menor de 20°C e aquecida em banho térmico Marconi Equipamentos

(MA127 - Piracicaba, SP, Brasil) até atingir os valores de temperatura desejados (20°C a 60°C). Uma vez alcançada cada temperatura, mediu-se a $ABS_{\lambda_{Max}}$ para encontrar possíveis variações.

Algumas características físico-químicas dos corantes, informadas pelo fornecedor, são apresentadas na Tabela 4.2 e a estrutura química é mostrada na Figura 4.1.

Tabela 4.2. Características físico-químicas dos corantes para couro usados no trabalho

	Azul ácido 161	Preto ácido 210	Vermelho ácido 357	Marrom ácido 414
Nome C.I.^a	Acid Blue 161	Acid Black 210	Acid Red 357	Acid Brown 414
Nome comercial	BAYGENAL Azul Escuro 2S	SOLVADER 21C	BAYGENAL Red GT	BAYGENAL Dark Brown L-2N2G
Número CAS^b	12392-64-2	99576-15-5	57674-14-3	82640-18-4
Número EINECS^b	15706 (C.I.) ^c	300285 (C.I.)	260-892-4	280-008-0
Tipo	Azo dissulfonado. Complexo orgânico de cromo.	Triazo dissulfonado. Amino	Azo dissulfonado. Complexo orgânico de cromo.	Complexo orgânico de ferro.
Massa Molar (g mol⁻¹)	394,40	938,02	956,7	599,23
Pureza (%)	77	70	80	75
λ_{Max} (nm)	578	460	494	484
Fórmula linear	C ₂₀ H ₁₃ N ₂ O ₅ SNaCr	C ₃₄ H ₂₅ K ₂ N ₁₁ O ₁₁ S ₃	C ₃₂ H ₂₀ CrN ₁₀ O ₁₄ S ₂ 3Na	C ₁₈ H ₁₇ FeN ₄ Na ₂ O ₁₁ S

^a Nome no Índice Internacional de Corantes (CI, do inglês “*Colour Index International*”)

^b Número EINECS (EINECS, do inglês “*European Inventory of Existing Chemical Substances*”)

^c Número no Índice Internacional de Corantes

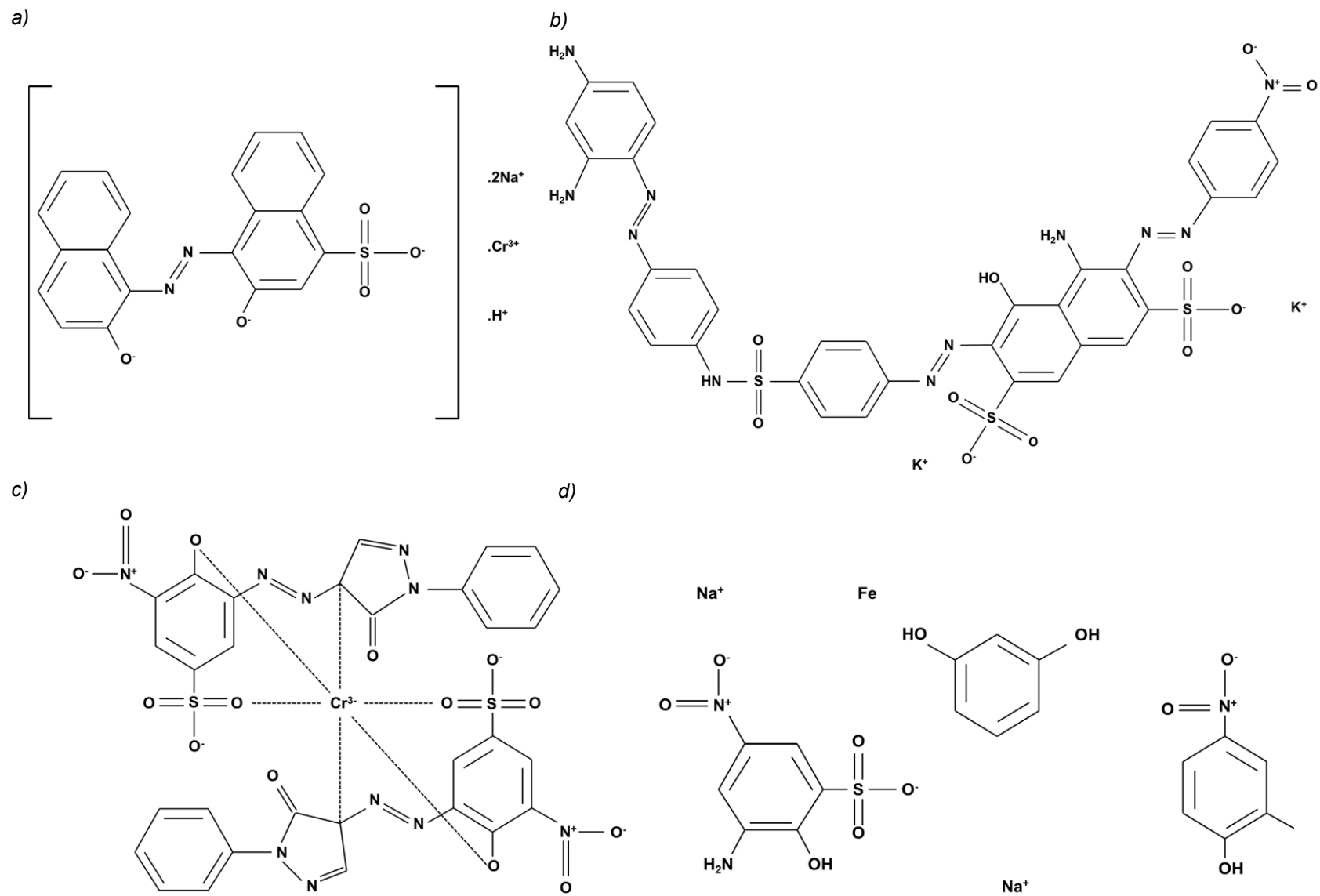


Figura 4.1. Estrutura química dos corantes para couro estudados no trabalho: a) Azul ácido 161; b) Preto ácido 210; c) Vermelho ácido 357; d) Marrom ácido 414

Fonte: adaptado de Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.2. Coleta e isolamento de micro-organismos

As cepas dos basidiomicetos causadores de podridão branca da madeira, potenciais produtores de enzimas ligninolíticas, foram isoladas a partir de diversas amostras ambientais de uma coleta realizada no Parque da Gruta dos Índios, localizado na cidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul - Brasil.

4.2.1. Localização e descrição da área de coleta

O Parque da Gruta dos Índios insere-se no amplo cordão verde pertencente à cidade de Santa Cruz do Sul (Fig. 4.2). Essa área está localizada na zona urbana ao norte e leste do município. Conforme o Decreto nº 4117 de 1994, é uma área de 463,79 hectares de vegetação secundária, com perímetro linear de 32 km (Fig. 4.3). A altitude varia entre 50 e 150 metros acima do nível do mar, o clima é classificado como subtropical úmido, com temperaturas médias inferiores a 15°C nos meses de inverno e superiores a 20°C nos meses de verão (Bencke; Soares, 1998; Morales; Köhler, 2008; Wenzel; de Quadros, 2012).



Figura 4.2. Mapa de localização do cinturão verde na zona urbana de Santa Cruz do Sul e do município no Estado do Rio Grande do Sul

Fonte: adaptado de Bencke e Soares (1998) e Wenzel e de Quadros (2012).

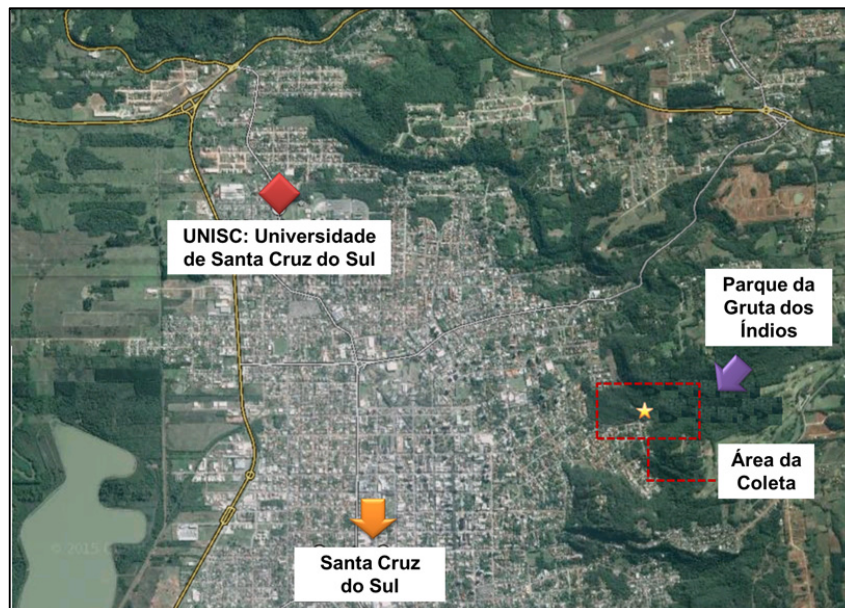


Figura 4.3. Mapa de localização da área de coleta
Fonte: adaptado do Serviço de Mapa de Google Maps™.

As diferentes formações florestais presentes no Rio Grande do Sul são em sua maioria classificadas como mata atlântica (Jurinitz; Jarenkow, 2003). Dentro desse bioma, a vegetação arbórea que conforma o cinturão verde de Santa Cruz é considerada como um ecossistema associado denominado floresta estacional secundária em avançado estágio de desenvolvimento, com predomínio das espécies *Lauraceas*, *Leguminosas* e *Sapindaceas* (Bencke; Soares, 1998).

4.2.2. Coleta e armazenamento de amostras

Esta etapa consistiu-se na coleta de corpos de frutificação (basidiocarpos) bem desenvolvidos crescendo em árvores e arbustos e em pedaços de madeira, guardadas em sacolas plásticas individuais e levadas ao Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO) onde foram armazenadas a 4°C até sua posterior utilização.

Fizeram-se registros fotográficos (*in situ*) procurando destacar tanto as características fenotípicas dos isolados como seus biótopos, visando facilitar uma posterior identificação morfológica.

4.2.3. Isolamento de cepas fúngicas

Os basidiocarpos coletados foram lavados com água destilada estéril e desinfetados com uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio durante 1 min (Hernández-Luna et al., 2008). Uma vez esterilizados, pedaços de micélio de 5 mm² foram retirados dos basidiocarpos e incubados a 30°C durante uma semana no meio de isolamento (Barrasa et al., 2014). Esse meio, denominado meio MEA-BC, consistiu no meio comercial Ágar Extrato de Malte (MEA, do inglês “*Malt Extract Agar*”) a 2% (m/v) complementado com os antibióticos Cloridrato de tetraciclina e Cloranfenicol® 0,01% (m/v), para evitar o crescimento de bactérias, e com o fungicida Benomyl® 1% (m/v), para favorecer o crescimento de fungos da podridão branca sobre outros fungos ambientais (Kiiskinen et al., 2004). O meio comercial MEA e o Cloranfenicol® foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão durante 15 min. O antibiótico Cloridrato de tetraciclina e o fungicida Benomyl® foram esterilizados usando filtro Millipore® de 0,45 µm de Millipore Corp. (Billerica, MA, USA) e posteriormente adicionados asepticamente ao meio.

Repicagens sucessivas foram necessárias até que obtiveram-se culturas puras. Uma vez puras, as culturas foram examinadas no microscópio e a presença de hifas septadas e formação de fíbulas confirmaram a natureza de basidiomicetos dos isolados (Barrasa et al., 2014; Hernández-Luna et al., 2008). Tamanho, forma e cor da colônia, além de forma e tamanho das hifas, também foram verificados para ajudar na identificação morfológica.

4.2.4. Conservação e reativação dos isolados

Objetivando a preservação dos micro-organismos, os isolados foram cultivados em meio comercial Ágar Batata Dextrose (PDA, do inglês “*Potato Dextrose Agar*”), conservados com óleo mineral e armazenados a 4°C. As cepas isoladas foram reativadas antes de serem usadas mediante o cultivo em 2% do meio comercial MEA e incubadas a 30°C durante 7 dias.

4.3. Ensaio em meio sólido

As cepas isoladas foram submetidas a uma triagem em placa de Petri contendo o meio de cultura sólido complementado com diferentes compostos indicadores da atividade ligninolítica, para avaliar qualitativamente a produção de enzimas com capacidade de degradar lignina, e com os corantes, com o objetivo de avaliar o potencial de descoloração.

4.3.1. Meio de cultura sólido e preparação do inóculo

Foram usadas placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 20 mL do meio comercial MEA complementado com diferentes substratos indicadores ou os corantes para couro a serem degradados. Cada indicador enzimático ou corante foi adicionado individualmente ao meio nutritivo Ágar Extrato de Malte (MEA). Usaram-se os indicadores guaiacol (meio MEA-GUA), ABTS (meio MEA-ABTS), siringaldazina (meio MEA-SYR), cloreto de manganês (meio MEA-CM) e os corantes AB210 (meio MEA-Preto), AR357 (meio MEA-Vermelho), AB161 (meio MEA-Azul) e MA414 (meio MEA-Marrom), sendo oito meios sólidos diferentes (Tab. 4.3). Os meios foram ajustados a um pH inicial de 5,5 usando HCl (concentração de 0,1 M) (Máximo et al., 2003) e foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão durante 15 min. Os substratos indicadores e os corantes foram esterilizados mediante filtração (filtro Millipore®) em uma concentração de 100 mgL⁻¹, para os indicadores, e 200 mgL⁻¹, para os corantes, e adicionados asépticamente ao meio de cultura após a esterilização do mesmo em autoclave.

As placas foram inoculadas com um *pellet* de 5 mm² retirado da suspensão de micélio em crescimento das culturas reativadas e incubadas a 30°C durante duas semanas ou até que as reações com os substratos foram evidentes. Todos os experimentos em meio sólido foram realizados em triplicata e usou-se um meio não inoculado como controle abiótico.

Tabela 4.3. Composição do meio sólido usado na triagem em meio sólido

Composto	Composição % (m/v)	Função	Referência
Extrato de Malte	2,0	Crescimento	Baccar et al. (2011), Barrasa et al. (2014) e Kiiskinen et al. (2004)
Extrato de Levedura	0,4		
Glicose	1,0		
Agar	1,5		
GUA	0,01	Indicador de atividade oxidase/peroxidase extracelular	Barrasa et al. (2014), Hernández-Luna et al. (2008) e Kiiskinen et al. (2004)
ABTS	0,01	Indicador da atividade Lac	Barrasa et al. (2014), Jarosz-Wilkolazka et al. (2002), Saroj et al (2014) e Zouari-Mechichi et al. (2006)
SYR	0,01	Indicador da atividade LiP	Jarosz-Wilkolazka et al. (2002)
MnCl ₂	0,01	Indicador da atividade MnP	
Corante Alvo	0,02	Indicador do potencial de descoloração	Baccar et al. (2011) e Barrasa et al. (2014).

4.3.2. Triagem da produção de enzimas ligninolíticas

Para testar a produção das enzimas ligninolíticas lacase, lignina peroxidase dependente de manganês, foi seguida a técnica de triagem em placa de Petri reportada por Jarosz-Wilkolazka et al. (2002), na qual a avaliação da atividade ligninolítica foi considerada positiva quando os substratos foram transformados pelas oxidases e/ou as peroxidases extracelulares e a reação foi indicada dependendo das características de cada substrato:

- A atividade de oxidases e/ou peroxidases extracelulares foi confirmada pela formação de um halo marrom avermelhado ao redor da zona de crescimento do micro-organismo no meio MEA-GUA, indicando a oxidação do composto guaiacol (Hernández-Luna et al., 2008).

- A atividade Lac foi considerada positiva quando no meio MEA-ABTS, o composto ABTS foi oxidado formando o cátion $ABTS^+$ que apresenta uma coloração verde escuro (Hernández-Luna et al., 2008; Jarosz-Wilkolazka et al., 2002; Zouari-Mechichi et al., 2006).

- A produção de peroxidases, nas quais se incluiu LiP, foi avaliada seguindo a reação do substrato siringaldazina no meio MEA-SYR, que foi considerada positiva quando SYR foi oxidado, formando um composto rosa ao redor do micélio em crescimento (Jarosz-Wilkolazka et al., 2002).

- A atividade da enzima MnP foi indicada pela formação de flocos marrons que aparecem pela acumulação do óxido de manganês (MnO_2) no meio MEA-CM, que conteve cloreto de manganês (II) (Jarosz-Wilkolazka et al., 2002).

4.3.3. Triagem de descoloração de corantes para couro em meio sólido

A capacidade de degradar os corantes sintéticos foi considerada positiva pela formação de um halo de descoloração ao redor do micélio em crescimento como reportaram Bacchar et al. (2011) e Barrasa et al. (2014).

4.4. Ensaio em meio líquido

Os isolados que mostraram reação positiva para produção de enzimas ligninolíticas e/ou para descoloração de corantes sintéticos em meio de cultura sólido, foram avaliados em outra triagem de acordo sua capacidade de degradar os corantes para couro Azul 161, Marrom 414, Vermelho 357 e Preto 210 em condições de fermentação submersa. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e usaram-se meios de cultura não inoculados que serviram como controle abiótico.

4.4.1. Preparação do inóculo

O inóculo para todos os experimentos em meio líquido foi preparado a partir do isolado que apresentou os melhores resultados na triagem em meio sólido. Antes da inoculação, o fungo foi reativado em meio MEA, crescendo a 30°C, durante 7 dias. Uma vez que o micro-organismo foi reativado, três *pellets* de 1 mm² foram cortados da periferia da suspensão de micélio em crescimento e foram usados como inóculo para os caldos nutritivos.

4.4.2. Meio de cultura líquido

Usaram-se frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do Caldo Extrato de Malte (MEB, do inglês "*Malt Extract Broth*"). O pH do meio foi ajustado em 5,5 antes de ser esterilizado em autoclave (121°C, 1 atm, 15 min). O caldo foi complementado com os corantes Azul 161, Marrom 414, Vermelho 357 e Preto 210, esterilizados por filtração (filtro Millipore®) e adicionados assepticamente ao meio em uma concentração de 200 mgL⁻¹. Os caldos MEB-Azul, MEB-Marrom, MEB-Preto e MEB-Vermelho foram inoculados e incubados durante 10 dias em câmara incubadora refrigerada com agitação orbital (*Shaker*) de Marconi Equipamentos (MA832 - Piracicaba, SP, Brasil) a 30°C e 150 rpm (Baccar et al., 2011; Máximo et al., 2003).

4.4.3. Triagem de descoloração de corantes para couro em meio líquido

A descoloração foi medida por espectrofotometria seguindo a variação na absorbância no λ_{Max} de cada corante (578 nm para o AB161, 460 nm para AB210, 484 nm para AB414 e 494 nm para AR357). Amostras de 3 mL foram retiradas assepticamente dos meios antes de serem inoculados com os isolados fúngicos e após 10 dias de crescimento em condições de fermentação submersa. As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 10 min e os sobrenadantes foram utilizados para fazer os estudos espectrofotométricos (Máximo et al., 2003). A absorbância do sobrenadante foi medida usando um espectrofotômetro UV/VIS Cary100 de Varian Inc., (Palo Alto, CA, USA).

A descoloração foi dada em termos de porcentagem e calculada pela diferença entre a absorbância das amostras antes e depois do tratamento (Park et al., 2007; Saroj et al., 2014), seguindo a Equação 4.1.

Equação 4.1. Descoloração (%).

$$\% Des = \frac{Abs.i - Abs.f}{Abs.i} * 100$$

Sendo:

%Des: Porcentagem de descoloração

Abs.i: Absorbância inicial no λ_{max}

Abs.f: Absorbância final no λ_{max}

4.5. Avaliação monovariável do efeito das condições de operação no processo de descoloração de corantes para couro

Nesta etapa foi analisado mediante uma análise monovariável, o efeito de algumas condições de operação, como a concentração inicial de corante, a agitação, o pH inicial do meio de cultura e a temperatura, sobre o crescimento dos micro-organismos e, portanto, sobre a descoloração dos corantes para couro.

Para esta etapa foi selecionado o corante que se degradou com mais facilidade. Nos testes foram usados frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio MEB suplementado com o corante. Os frascos foram inoculados como descrito em 4.4.1. As condições de operação mantiveram-se constantes em pH 5,5, temperatura 30°C, concentração inicial de corante 200 mgL⁻¹ e agitação 150 rpm, e só mudaram quando foi avaliado o efeito da respectiva condição de operação. No caso da análise do efeito da concentração inicial de corante e do pH, foi realizada uma cinética de descoloração e amostras de 3 mL foram retiradas todos os dias durante os 10 dias de incubação. Para as análises do efeito da temperatura e da agitação, as amostras foram obtidas antes e depois do tratamento.

Todas as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 min e usou-se o sobrenadante para medir a porcentagem de descoloração como descrito na Seção 4.4.3. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.1. Avaliação do efeito da concentração inicial de corante

Para avaliar o efeito causado pela concentração inicial de corante no crescimento do micro-organismo e no potencial de descoloração, usou-se o meio de cultura MEB complementado com o corante em diferentes concentrações que variaram entre 100 e 800 mgL⁻¹ (Daâssi et al., 2013; Saroj et al., 2014; Senthilkumar et al., 2011). As outras condições permaneceram constantes.

4.5.2. Avaliação do efeito do pH

O pH foi ajustado numa faixa de 2,0 a 7,0. Usaram-se soluções 0,1 M de NaOH e HCl para ajustar os valores (Daâssi et al., 2013; Palmieri et al., 2005; Saroj et al., 2014; Senthilkumar et al., 2014; Sharma et al., 2009). As outras condições mantiveram-se constantes.

4.5.3. Avaliação do efeito da agitação

Para avaliar o efeito da agitação repetiu-se o experimento variando-se as condições de agitação orbital. Foram comparadas as condições de cultura estática e quatro diferentes agitações (50, 100, 150 e 200 rpm) (Daâssi et al., 2013; Swamy; Ramsay, 1999a; Yesilada, et al., 2002).

4.5.4. Avaliação do efeito da temperatura

Foi usada uma câmara incubadora refrigerada com controle de temperatura e agitação orbital para incubar os meios MEB e avaliar o efeito da temperatura no processo de descoloração em uma faixa de 20 a 40°C (Daâssi et al., 2013; Palmieri et al., 2005; Sharma et al., 2009).

4.6. Métodos analíticos

Com o objetivo de elucidar e analisar os diferentes mecanismos envolvidos no processo de descoloração dos corantes, foram realizadas várias cinéticas de crescimento do isolado SC10 durante 10 dias de incubação no meio MEB suplementado com um dos corantes em uma concentração inicial de 200 mgL^{-1} , pH 5,5, agitação 150 rpm e temperatura 30°C . Por meio de diferentes métodos analíticos mediu-se a quantidade de glicose residual, a produção de biomassa, a atividade enzimática ligninolítica e a descoloração.

Usando o método destrutivo, amostras de 10 mL foram retiradas assepticamente do meio de cultura MEB, inoculado com os isolados fúngicos, a cada 24 horas durante 10 dias de crescimento. As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado para fazer as análises. Os métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos com um espectrofotômetro Cary100 (Varian Inc., USA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os diferentes procedimentos analíticos são apresentados resumidamente na Tabela 4.7, no final da seção.

4.6.1. Método de medição da atividade enzimática

Como mencionado antes, várias enzimas estão associadas ao sistema enzimático de degradação da lignina dos WRF. Entre elas encontram-se a lacase, a lignina peroxidase e a peroxidase dependente de manganês como as enzimas mais estudadas. As três têm sido reportadas por seu potencial para degradar corantes industriais.

Assumindo a hipótese de que uma ou várias dessas enzimas estivessem envolvidas na descoloração, seguiram-se diferentes métodos para confirmar a produção enzimática extracelular durante a fermentação submersa. Para todos os métodos, uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto ($U = \mu\text{mol min}^{-1}$). A atividade enzimática foi dada em $U\text{L}^{-1}$, segundo a Equação 4.2, derivada da lei de Lambert-Beer.

Equação 4.2. Atividade Enzimática

$$AE = \frac{\Delta Abs * V_{total} * 1000 * df}{\epsilon_{subs} * L * V_{caldo} * t}$$

Sendo:

- AE* Atividade Enzimática (UL⁻¹)
ΔAbs Absorbância final – Absorbância inicial
ε_{subs} Coeficiente de extinção molar da enzima pelo substrato específico (mM⁻¹ cm⁻¹)
V_{Total} Volume da solução na cubeta de quartzo (mL)
V_{Caldo} Volume do extrato enzimático usado na reação (mL)
V_{Total} Volume da solução na cubeta de quartzo (mL)
10³ Fator de conversão de mL a L
t Tempo em minutos
df Fator de diluição
L Espessura da cubeta (cm)

- Atividade enzimática lacase: a presença da enzima lacase (E.C 1.10.3.2) foi determinada baseando-se numa adaptação dos métodos usados por Heinzkill et al. (1998) e Wang e Ng (2006). Seguiu-se a reação enzimática oxidativa do sobrenadante do meio de cultura com o substrato ABTS. A solução de ABTS continha 1 mM de ABTS em uma solução tampão de acetato de sódio 0,2 M a pH 4,5. O aumento na absorbância foi medido a 405 nm usando um coeficiente de extinção molar do ABTS oxidado de 36 mM⁻¹cm⁻¹, durante os primeiros 5 min. A mistura de reação é mostrada na Tabela 4.4

Tabela 4.4. Mistura de reação para medição da atividade Lac

Componente	Volume (μL)
Solução ABTS 2 mM	750
Solução de enzima extracelular	750
Água Destilada	1500
Volume total da reação	3000

- Atividade enzimática lignina peroxidase: foi medida pelo método descrito por Arora e Gill (2001) e Saroj et al. (2014), no qual se seguiu a oxidação enzimática do substrato álcool veratrílico (VA) 2 mM a veratraldeído por meio da enzima LiP (EC 1.11.1.14), usando uma solução tampão de tartarato de sódio 50 mM em pH 3,0. A reação consistiu na mistura do sobrenadante do meio de cultura (onde estaria a enzima extracelular), o substrato VA e uma solução de H₂O₂ em uma concentração de 0,4 mM (Tab. 4.5). A reação começou com a adição de H₂O₂ e a variação na absorbância foi medida a 310 nm durante 3 min. O coeficiente de extinção molar do veratraldeído a 310 nm é $\epsilon_{310} = 9,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Zouari-Mechichi et al., 2006).

Tabela 4.5. Mistura de reação para medição da atividade LiP

Componente	Volume (µL)
Tartarato de sódio 125 mM	1000
Álcool veratrílico 10 mM	500
Solução de H ₂ O ₂ 2 mM	500
Solução de enzima extracelular	500
Volume total da reação	2500

- Atividade enzimática da peroxidase dependente de manganês: a atividade de MnP (EC1.11.1.13), produzida extracelularmente, foi medida como descrito inicialmente por Wariishi et al. (1992) e adaptado por Máximo et al. (2003) na medição de MnP extracelular produzida por *Geotrichum* sp. Seguiu-se a oxidação do substrato 2,6-dimetoxifenol (DMP) em uma concentração de 1 mM em solução tampão de tartarato de sódio (concentração de 0,1 M) a pH 4,5. Foi adicionado H₂O₂ (0,1 mM) e MnSO₄ (1mM) para induzir a reação, que foi medida por espectrofotometria seguindo o aumento da absorbância a 469 nm durante 10 min. Usou-se um coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{469} = 27,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Martínez et al., 1996) (Tab. 4.6).

Tabela 4.6. Mistura de reação para medição da atividade MnP

Componente	Volume (μL)
Tartarato de sódio 250 mM	1000
DMP 5 mM	500
Solução de H_2O_2 1 mM	250
MnSO_4 10 mM	250
Solução de enzima extracelular	500
Volume total da reação	2500

4.6.2. Método da medição do consumo de glicose

A glicose residual, presente no meio de cultura, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), desenvolvido por Miller (1959) e usado por Máximo et al.(2003) e Swamy e Ramsay (1999b) para medir o consumo de glicose por WRF em crescimento. Trata-se de um método colorimétrico, no qual são quantificados os açúcares redutores presentes no meio residual. O teste baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o DNS (cor amarelo), que é reduzido a ácido 3-amino-nitrosalicílico (cor avermelhado) (Miller, 1959). Foi construída uma curva padrão com concentrações conhecidas de glicose ($0,10$ a 1 gL^{-1}) a partir de uma solução padrão de glicose 1 gL^{-1} . Para obter a curva de calibração foram misturados em tubo Falcon® $500 \mu\text{L}$ da solução padrão de glicose e $500 \mu\text{L}$ do reagente DNS. O tubo foi aquecido a 100°C por 5 min e, posteriormente, resfriado em banho de gelo por outros 5 minutos. A mistura foi diluída em 2 mL de água destilada e foi medida a absorbância a 540 nm. Finalmente foi plotada a concentração de glicose (gL^{-1}) e a absorbância (ABS) obtida a partir do teste com o DNS de cada amostra, e foi calculada a Equação da reta por regressão linear. Uma vez terminada a curva de calibração, foi misturado 1 mL do sobrenadante das amostras retiradas diariamente durante os 10 dias de fermentação submersa com 1 mL do reagente DNS. Mediu-se a absorbância da mistura a 540 nm e a partir da equação da reta da curva de calibração foi calculada a concentração de glicose residual de cada amostra.

4.6.3. Método da medição da produção de biomassa

Para determinar a quantidade de biomassa produzida durante os 10 dias de incubação, foi utilizado o método gravimétrico de peso seco, usado por Máximo et al. (2003), para medir a quantidade de biomassa produzida por *Geotrichum* sp. na biodegradação de corantes azoicos e aplicado por Baccar et al. (2011) na determinação da biomassa produzida por *Trametes versicolor* na biodegradação do corante para couro Black Dycem TTO.

O método consistiu na filtração do caldo MEB com o corante usando uma membrana de nitrocelulose (Filtro Whatman®, 45 µm de poro, 50 mm de diâmetro) com peso conhecido. As células fúngicas retidas no filtro foram cuidadosamente lavadas com água destilada para que não houvesse perda de biomassa. Após a filtração, as membranas foram colocadas em placas de Petri tampadas e secas em estufa a 105°C por 24 horas (Baccar et al., 2011; Máximo et al., 2003).

Após este período, as membranas de nitrocelulose foram retiradas das placas de Petri e pesadas novamente na balança analítica. O resultado foi expresso em gramas de biomassa seca por litros de meio de cultura, como mostrado na Equação 4.3.

Equação 4.3. Produção de Biomassa (gL^{-1})

$$Biomassa (gL^{-1}) = \frac{WM_{Biomassa} - WM_{Sem Biomassa}}{Vol Exp}$$

Sendo:

<i>Biomassa</i>	Quantidade de Biomassa produzida na fermentação (gL^{-1})
$WM_{Biomassa}$	Peso final da membrana com a biomassa seca (g)
$WM_{sem Biomassa}$	Peso inicial da membrana (g)
<i>Vol Exp</i>	Volume do meio de cultura MEB (100 mL para todos os casos)

4.6.4. Método da medição da descoloração

A descoloração foi medida por espectrofotometria seguindo o método descrito na Seção 4.4.3, no qual se seguiu a variação na absorbância no λ_{Max} do corante. Usou-se a Equação 4.1 para calcular o valor da remoção da cor. Nesse caso a Abs_f foi substituída pelo valor de absorbância obtido em cada ponto da cinética (as amostras foram retiradas a cada 24 horas durante 10 dias de crescimento). Isto permitiu medir detalhadamente o processo de descoloração ao longo do tratamento.

Tabela 4.7. Resumo dos procedimentos analíticos empregados

Parâmetro	Método	Referência
Descoloração	Foi determinada por espectrofotometria, medindo a diminuição na absorção no λ_{max} do corante	Baccar et al.(2011); Park et al. (2007); Saroj et al.(2014)
Glicose residual	Foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS)	Máximo et al. (2003); Miller (1959); Swamy e Ramsay (1999b)
Biomassa	Mediu-se o peso seco da biomassa a 105 °C por 24 h	Baccar et al. (2011); Máximo et al. (2003)
Atividade enzimática	Lac: seguiu-se por espectrofotometria a reação enzimática do sobrenadante do meio de cultura com substrato ABTS	Heinzkill et al. (1998); Wang e Ng (2006)
	LiP: consistiu na reação de álcool veratrílico (VA) a veratraldeído em presença de H ₂ O ₂	Arora e Gill (2001); Saroj et al. (2014)
	MnP: foi medida seguindo por espectrofotometria a reação de MnP extracelular com DMP, em uma solução com H ₂ O ₂ e MnSO ₄	Martínez et al. (1996); Máximo et al. (2003)

4.7. Planejamento experimental para otimização das variáveis de operação

Na Seção 4.5 fez-se uma análise inicial monovariável do efeito linear de algumas variáveis operacionais sobre o processo de remoção do corante em meio líquido. Esse método clássico de otimização que consiste na variação de um fator por vez, enquanto as outras variáveis se mantiveram constantes.

Esses experimentos possibilitaram conhecer o efeito das variáveis e as faixas nas quais se evidenciou o melhor crescimento do micro-organismo e remoção do corante, entretanto, não permitiram verificar as interações entre diferentes variáveis e os efeitos quadráticos das mesmas.

Objetivando obter uma avaliação mais precisa da influência de uma determinada variável sobre o processo de descoloração, de analisar as interações de segunda ordem entre variáveis e de buscar uma otimização operacional, foi aplicado o método de planejamento Delineamento Composto Central Rotacional (CCD, do inglês “*Central Composite Design*”) e a metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês “*Response Surface Methodology*”).

4.7.1. Planejamento Experimental

Aplicou-se o método de CCD a fim de se obter um modelo estatístico quadrático (Box; Hunter, 1957; Box; Wilson, 1951). A matriz genérica do CCD usada nesta etapa dos experimentos é apresentada na Tabela 4.8 para k fatores de estudo. O modelo estatístico gerado a partir desse planejamento é apresentado na Equação 4.4.

Equação 4.4. Modelo estatístico

$$y_{mod} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \epsilon$$

Sendo:

- y_{mod} Os valores preditos pelo modelo
- β_0 A média dos valores de y
- β_i Os coeficientes dos efeitos principais dos fatores de estudo
- β_{ij} Os coeficientes dos efeitos de interação dupla dos fatores de estudo
- β_{ii} Os coeficientes dos efeitos quadráticos dos fatores de estudo
- x_j São as variáveis referentes aos fatores
- ϵ Erro de predição do modelo

Tabela 4.8. Matriz genérica para o planejamento CCD

Experimento	X_1	X_2	...	X_k
1	-1	-1	...	-1
2	+1	-1	...	-1
...
2^k	+1	+1	+1	+1
2^{k+1}	$-\alpha$	0	0	0
2^{k+2}	$+\alpha$	0	0	0
2^{k+3}	0	$-\alpha$	0	0
...
2^{k+2-k}	0	0	0	$+\alpha$
$2^{k+2-k+PC1}$	0	0	0	0
$2^{k+2-k+PC2}$	0	0	0	0

*Sendo k o número de fatores estudados, α os pontos axiais, sendo seus valores codificados calculados a partir da raiz quarta de 2^k , e PC os pontos centrais.

O desenho experimental baseou-se em 16 ensaios (2^4), mais 8 pontos axiais e 4 pontos centrais (PC), totalizando 28 experimentos. Os fatores que foram estudados (variáveis independentes) incluíram a concentração inicial de corante ($100-300 \text{ mgL}^{-1}$), a temperatura ($25-35^\circ\text{C}$), o pH ($3,0-6,0$) e a agitação ($0-200 \text{ rpm}$). Os níveis inferior e superior foram definidos a partir dos resultados dos experimentos iniciais de análise do efeito das variáveis operacionais e dados experimentais reportados no levantamento bibliográfico (Máximo et al., 2003; Park et al., 2007; Saroj et al., 2014). Definiu-se a porcentagem de remoção de corante, Equação 4.1, como uma única variável dependente. A Tabela 4.9 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis reais e codificados.

Tabela 4.9. Valores reais das variáveis do CCD e seus respectivos níveis codificados

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
pH	3,0	3,75	4,5	5,25	6,0
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	25	27,5	30	32,5	35
Agitação (rpm)	0	50	100	150	200
Concentração (mgL^{-1})	100	150	200	250	300

A Tabela 4.10 apresenta o planejamento experimental CCD com as variáveis independentes e seus respectivos níveis codificados.

Tabela 4.10. Planejamento delineamento composto central rotacional CCD

Exp.	pH	T (°C)	Agt. (rpm)	[C] (mgL ⁻¹)	Exp.	pH	T (°C)	Agt. (rpm)	[C] (mgL ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	15	1	1	1	-1
2	-1	-1	-1	1	16	1	1	1	1
3	-1	-1	1	-1	17	-2	0	0	0
4	-1	-1	1	1	18	2	0	0	0
5	-1	1	-1	-1	19	0	-2	0	0
6	-1	1	-1	1	20	0	2	0	0
7	-1	1	1	-1	21	0	0	-2	0
8	-1	1	1	1	22	0	0	2	0
9	1	-1	-1	-1	23	0	0	0	-2
10	1	-1	-1	1	24	0	0	0	2
11	1	-1	1	-1	25	0	0	0	0
12	1	-1	1	1	26	0	0	0	0
13	1	1	-1	-1	27	0	0	0	0
14	1	1	-1	1	28	0	0	0	0

T: Temperatura (°C), Agt.: Agitação (rpm), [C]: Concentração inicial de corante (mgL⁻¹)

Os valores obtidos no CCD foram interpretados de acordo com análise de variância (ANOVA). Essas análises foram realizadas com base no teste F-Fischer, relacionando a variância entre dois grupos (diferentes tratamentos) e a variância dentro de um grupo (variância experimental). As hipóteses formuladas foram:

Equação 4.5. Hipóteses nula

$$H_0 = \sigma_a^2 = \sigma_b^2$$

Equação 4.6. Hipóteses alternativa

$$H_a = \sigma_a^2 \neq \sigma_b^2$$

Sendo:

H_0 Hipótese nula

H_a Hipótese alternativa

σ_a^2 Variância associada ao tratamento

σ_b^2 Variância associada ao erro

A hipótese nula (H_0) foi testada frente à possibilidade de rejeição quando a mesma era verdadeira (afirmar que existe diferença entre os tratamentos quando na verdade não existe – Erro tipo I), sendo determinada a probabilidade de ocorrência do Erro tipo I (p). Foi considerada significativa a hipótese de rejeição quando a probabilidade do Erro tipo I foi inferior a 5 % ($p < 0,05$).

Os modelos estatísticos foram gerados eliminando os efeitos não significativos sobre as respostas, através do método dos mínimos quadrados utilizando o software Statistica® 10.0 (Statsoft, USA).

4.7.2. *Ajuste do modelo estatístico*

Os modelos gerados foram submetidos à análise de variância, comparando a variância associada ao modelo e os dados experimentais com a variância experimental, conforme as hipóteses citadas anteriormente (Equação 4.5), sendo considerado o modelo preditivo quando a probabilidade de erro ao rejeitar a igualdade entre as variâncias for inferior a 15 % ($p < 0,15$), além dos valores do coeficiente de determinação (R^2) e erro relativo médio (E).

4.7.3. *Estudos de descoloração em meio líquido com as condições de operação otimizadas*

Com o objetivo de comprovar se os dados preditos pelo modelo usado no planejamento experimental correspondiam a resultados otimizados, foram repetidos os experimentos em meio líquido, informado na Seção 4.4, e as análises descritas na Seção 4.6, nas condições ótimas indicadas pelos resultados da análise estatística.

4.8. Identificação molecular dos isolados fúngicos

O isolado fúngico que apresentou os melhores resultados de remoção dos corantes foi submetido a um processo de identificação molecular desenvolvido no Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O DNA ribossomal foi extraído e purificado a partir das culturas puras crescendo em meio comercial Ágar Extrato de Malte (MEA) a 30°C. A extração foi realizada seguindo o protocolo de UltraClean® Soil DNA Isolation Kit de Mobio Laboratories Inc. (Carlsbad, CA, USA). Após a extração, um fragmento de aproximadamente 650 pb da região ITS (do inglês “*Internal Transcribed Spacer*”) do DNA ribossomal (rDNA) foi amplificado via PCR (PCR, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”) usando um protocolo de termociclagem. O sequenciamento da região do rDNA ITS1-5.8S rDNA-ITS2 foi realizada utilizando os *primers* universais específicos para fungos ITS5 e ITS4 (White et al., 1990) mostrados na Tabela 4.11. As condições de amplificação incluíram a desnaturação inicial (94°C durante 5 min), seguido de 35 ciclos de desnaturação (94°C durante 1 min), anelamento (55°C durante 30 s), extensão (72°C durante 1 min) e uma extensão final (72°C durante 10 min) em termociclador. Os produtos de PCR foram examinados por eletroforese sobre um gel de agarose 1,5%, a 100V por 45min, e corados com GelRed ® para visualização em luz Ultravioleta e foi sequenciado pelo Centro de Biotecnologia ACTGene – Ludwing Biotec (Alvorada, RS, Brasil).

As sequências obtidas foram processadas e comparadas com sequencias tipo, depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A busca de similaridade das sequencias foi realizada usando o algoritmo BLAST (em inglês: *Basic Local Alignment Search Tool*), onde uma identidade de 99-100% permitiu a identificação do isolado em até o nível taxonômico de espécie.

Tabela 4.11. *Primers* para PCR que usados na amplificação das regiões 18S e ITS

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')	Referência
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	(White et al., 1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os principais resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa. Esses dados são analisados e discutidos mediante uma comparação com os resultados dos trabalhos de outros autores. O capítulo está estruturado em cinco seções diferentes: na primeira são apresentados os dados da coleta e isolamento dos micro-organismos. Na segunda parte são mostrados e discutidos os resultados da triagem para avaliar a produção de enzimas ligninolíticas e a descoloração de corantes em meio sólido. Na terceira parte se faz referência aos experimentos de descoloração em meio líquido, incluindo os métodos usados para analisar os efeitos das variáveis operacionais e entender os mecanismos envolvidos na descoloração. A quarta seção é relativa à otimização do processo mediante o planejamento experimental (CCD) e a metodologia de Superfície de Resposta (RSM) e a quinta parte compreende a identificação molecular do isolado com os melhores resultados

5.1. Coleta e isolamento de fungos

Foi coletado um total de trinta e cinco exemplares de fungos crescendo em pedaços de madeira em decomposição de arbustos, ramos e tocos de árvores numa zona do Parque da Gruta dos Índios, na cidade de Santa Cruz do Sul, RS-Brasil. A maioria eram basidiomicetos de podridão branca, classificados morfologicamente dentro dos gêneros *Trametes*, *Ganoderma* e *Pycnoporus*, entre outros. Na Figura 5.1 são mostrados alguns dos basidiocarpos de WRF coletados.

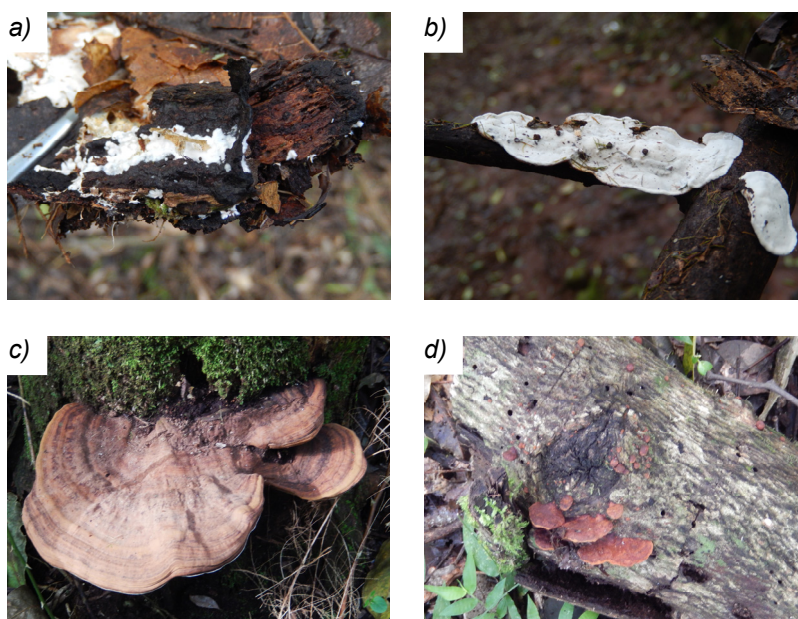


Figura 5.1. Amostras de basidiocarpos dos fungos coletados: a) SC03; b) SC07; c) SC11; d) SC27

O fungo coletado SC10 foi localizado a uma latitude 29°42'42.38" Sul e a uma longitude 52°24'44.09" Oeste, crescendo solitariamente em um galho perto do solo. Seguindo a chave de caracterização morfológica de Hood (2006), o corpo de frutificação apresentou um basidiocarpio com longevidade anual, do tipo sésseis a efluso-reflexo e estava imbricado lateralmente ao substrato. O píleo tinha um formato aplanado e flabeliforme. A superfície abhimenial tinha coloração branca-creme, vilosa e concentricamente zonada. A superfície himenial poróide tinha uma coloração creme-clara a tons de amarelo escuro, com 2 a 4 poros por mm (Fig. 5.2).

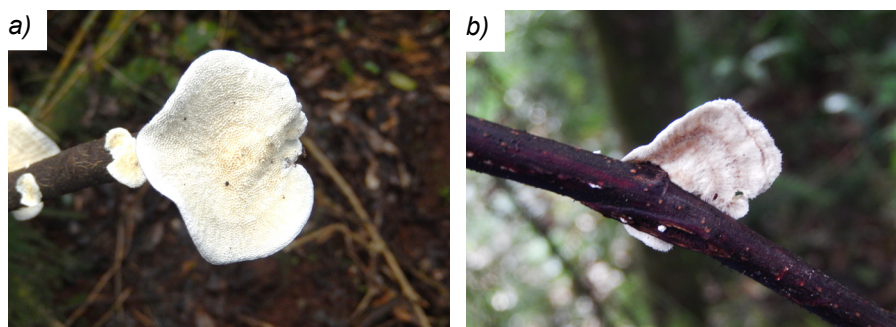


Figura 5.2. Basidiocarpo do fungo coletado SC10: a) Vista superior; b) Vista inferior

Na etapa de isolamento, embora fossem usados antibióticos e fungicidas para favorecer o crescimento de fungos de podridão branca no meio MEA-BC, problemas de contaminação com micro-organismos ambientais como bactérias, leveduras e principalmente outros fungos (*Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp.), afetaram a primeira etapa da pesquisa. É recomendado fazer uma correta manipulação das amostras e ser rigoroso na aplicação dos mecanismos de limpeza dos corpos de frutificação para evitar problemas de contaminação cruzada. Uma vez padronizados os métodos de coleta e limpeza do material, o meio MEA-BC garantiu o correto crescimento e desenvolvimento das cepas coletadas, produzindo grandes quantidades de micélio fúngico. Foi possível isolar trinta cepas diferentes que foram analisadas macroscópica e microscopicamente, e a partir das quais foram preparados os inóculos para os experimentos posteriores (Fig. 5.3).

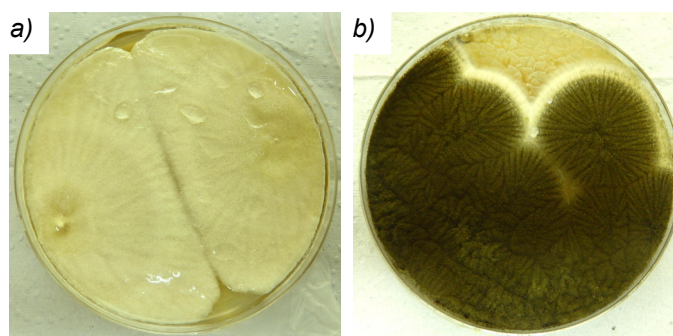


Figura 5.3. Isolados puros crescendo no meio MEA-BC após seis dias de incubação a 30°C: a) SC02; b) SC11

O isolado SC10 apresentou um profuso crescimento micelial branco, com aspecto de algodão, em disposição concêntrica a partir do inóculo. A análise microscópica, usando-se o corante azul de metileno, permitiu confirmar a natureza de basidiomiceto do isolado SC10, mostrando a formação de fíbulas ou “*clamp-connection*” (Barrasa et al., 2014; Hood, 2006), além de hifas septadas, basidiósporos e hifas vegetativas (Fig 5.4).

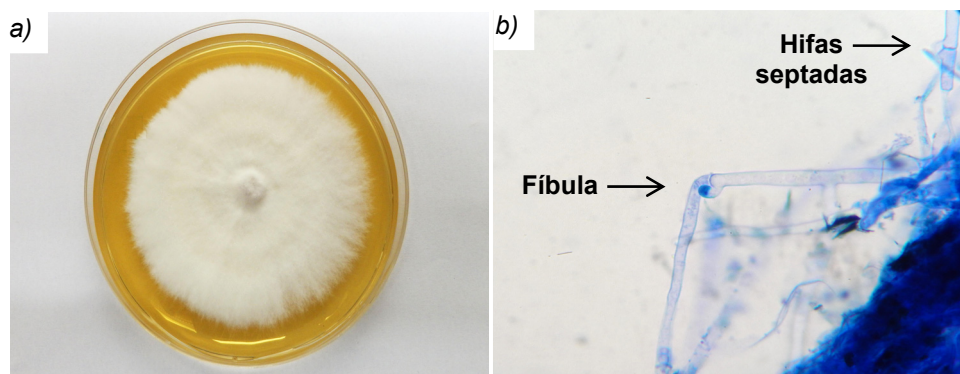


Figura 5.4. Características morfológicas do isolado SC10 depois de seis dias de incubação a 30°C em meio MEA: a) Estrutura macroscópica; b) Estrutura microscópica tingida com azul de metileno (Aumento 100X)

As características morfológicas, tanto macroscópicas quanto microscópicas, colocaram o isolado SC10 dentro do gênero *Trametes*, sendo provavelmente a espécie *T. hirsuta* ou *T. villosa*, tipos de fungos bastante comuns no Rio Grande do Sul (Reck; da Silveira, 2008).

5.2. Ensaio de descoloração em meio sólido

As trinta cepas isoladas foram submetidas a uma triagem inicial em placa de Petri, visando avaliar a produção de enzimas ligninolíticas em meio sólido. Aqueles isolados que apresentaram os melhores resultados para atividade enzimática extracelular foram testados mediante uma segunda triagem de acordo a sua capacidade para descolorir os quatro corantes para couro em meio sólido.

5.2.1. Triagem de produção de enzimas ligninolíticas

Das trinta cepas avaliadas nesta etapa, onze oxidaram o substrato guaiacol no meio MEA-GUA, formando um halo marrom avermelhado ao redor da zona de crescimento. Isso indicou a produção de enzimas oxidases e/ou peroxidases extracelulares. Segundo Kiiskinen (2004), os WRF que apresentaram alguma atividade no meio MEA-GUA tiveram resultados similares quando foram testados em meios com outros substratos indicadores ou corantes poliméricos (Kiiskinen et al., 2004). A produção de enzimas com potencial oxidativo foi confirmada no meio MEA-ABTS, já que os mesmos onze micro-organismos apresentaram atividade enzimática extracelular, indicando a oxidação do cátion ABTS⁺ pela ação da enzima lacase. A reação foi revelada pela formação de um halo escuro ao redor do micélio. Resultados similares reportaram Zouari-Mechichi et al. (2006), que ao fazer uma triagem de WRF nativos com o substrato ABTS observaram que o isolado *Trametes trogii* B6J formou rapidamente um halo esverdeado ao redor do micélio. A partir desse isolado conseguiram isolar e purificar duas isoenzimas de lacase (Zouari-Mechichi et al., 2006).

O isolado SC11, por outro lado, foi o único a apresentar alguma atividade no meio de cultura MEA-SYR, sugerindo a produção de peroxidases extracelulares, provavelmente LiP (Jarosz-Wilkolazka et al., 2002). No entanto, nenhum dos outros dez isolados apresentaram alguma atividade neste meio de cultura. Uma possível explicação para isso é que as enzimas peroxidases de algumas espécies de WRF precisam de outros cofatores como peróxido de hidrogênio ou mediadores de baixo peso molecular (Hernández-Luna et al., 2008), condições que não foram garantidas nesta análise. As cepas SC02 e SC10 foram as únicas que apresentaram uma mínima formação de flocos marrons no meio de cultura MEA-CM, sugerindo a produção da enzima peroxidase dependente de manganês, responsável por oxidar o cloreto de manganês II presente no meio, tal como indicou Jarosz-Wilkolazka et al. (2002) ao fazer uma triagem para a produção da enzima MnP em meio sólido.

O isolado *Trametes* sp. SC10 foi o fungo que mostrou os melhores resultados em termos de extensão e rapidez. No meio MEA-GUA, essa cepa formou um fino halo marrom avermelhado ao redor do micélio em sete dias de incubação a 30°C. Na parte inferior da biomassa, o micélio também cresceu com esta cor (Fig. 5.5 b-c ver ▲). No meio MEA-ABTS, o isolado também formou um halo marrom escuro (Fig. 5.5 d ver ◆), embora na literatura se mencione um halo verde escuro (Zouari-Mechichi et al., 2006). A diferença se deve a uma mistura de cores, já que o meio de cultura usado neste teste (MEA) apresentou uma cor amarela intensa. O fungo expressou esta atividade em cinco dias de cultura, mais rápido do que no meio MEA-GUA.

No meio MEA-CM, a cepa de *Trametes* sp. SC10 demorou um pouco mais para crescer (dez dias). O micélio formado foi um pouco diferente, morfologicamente, apresentando uma coloração mais amarelada e uma textura mais rugosa. Na vista inferior percebeu-se a formação dos flocos marrons na zona de crescimento (Fig 5.5 e-f ver ◆).

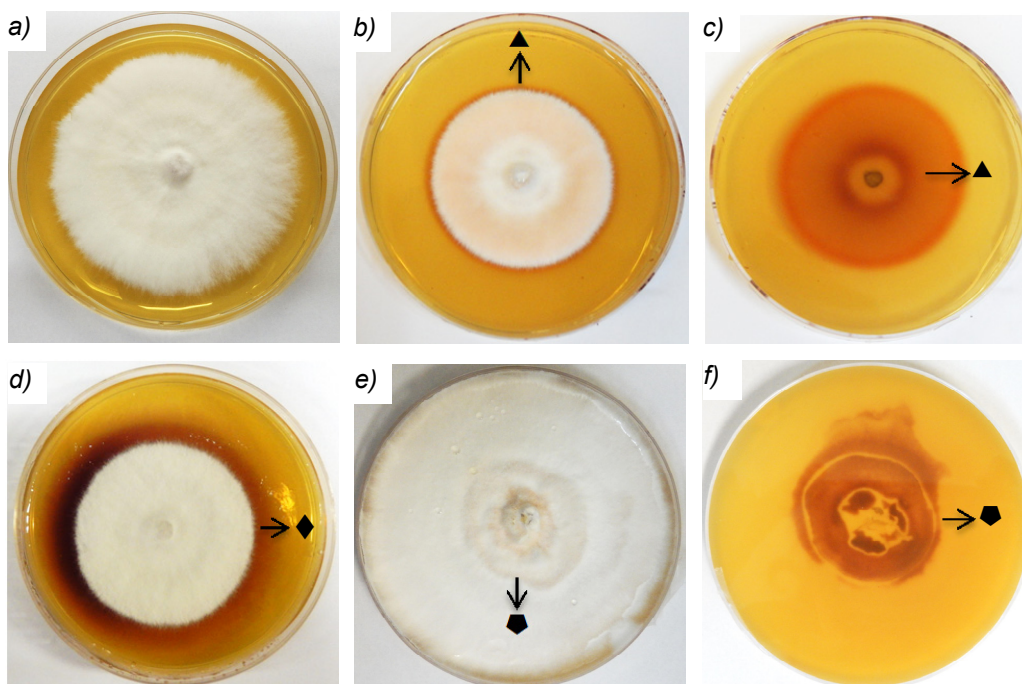


Figura 5.5. *Trametes* sp. SC10 crescendo no meio de cultura: a) MEA (controle) após seis dias; b) MEA-GUA (vista superior); c) MEA-GUA (vista inferior) após sete dias; d) MEA-ABTS após cinco dias; e) MEA-CM (vista superior) e f) MEA-CM (vista inferior) após dez dias

Os resultados da triagem em meio sólido, para se avaliar a produção de enzimas ligninolíticas extracelulares, mostraram o potencial do isolado SC10 para oxidar distintos tipos de substratos. Essa capacidade esteve associada à produção das enzimas Lac e MnP. Hernández-Luna et al. (2008), que também isolaram vários WRF nativos, obtiveram resultados similares com seus isolados CS5 e CU1, posteriormente identificados como *T. villosa* e *T. hirsuta*. Os autores testaram adicionalmente a descoloração em meio sólido e líquido dos corantes sintéticos *Remazol Brilliant Blue R*, *Acid Red 44* e *Cristal Violeta*, atingindo altos valores de descoloração (Hernández-Luna et al., 2008). Similarmente, Jarosz-Wilkolazka et al. (2002) confirmaram que o isolado da espécie *Trametes versicolor*, que mostrou atividade nos meios com ABTS, SYR e Mn²⁺, também conseguiu degradar eficientemente os corantes industriais *Basic Blue 22* e *Acid Red 183* em meio sólido (Jarosz-Wilkolazka et al., 2002). Os autores Barrasa et al. (2014) reportaram também que as cepas de *T. versicolor* e *T. pubescens*, que mostraram atividade enzimática extracelular nos meios sólidos com guaiacol, siringaldazina e ABTS, também degradaram os corantes *Reactive Blue 38* e *Reactive Black 5* em meio sólido MEA (Barrasa et al., 2014). Por causa dessas razões o isolado *Trametes* sp. SC10 foi selecionado para testar a descoloração dos quatro corantes para couro em uma segunda triagem em meio sólido e posteriormente em meio líquido.

O sistema de triagem em meio sólido, usado para avaliar a produção de enzimas ligninolíticas por isolados de basidiomicetos nativos, funcionou corretamente, sendo um método rápido e efetivo para avaliar cepas produtoras de enzimas ligninolíticas que têm múltiplas aplicações biotecnológicas. No entanto, o método usado ainda não analisou outros fatores como a fontes de nutrientes, o uso de mediadores e de indutores e o efeito dos inibidores. Devido ao fato que a expressão do sistema enzimático ligninolítico pode variar entre as diferentes espécies de fungos de podridão branca, esses fatores também precisam ser analisados em um estudo adicional (Jarosz-Wilkolazka et al., 2002; Zouari-Mechichi et al., 2006).

5.2.2. Triagem da descoloração de corantes para couro em meio sólido

O isolado *Trametes* sp. SC10, que apresentou os melhores resultados na triagem inicial, foi avaliado em um segundo teste no qual se mediu a capacidade da cepa de descolorir corantes para couro em meio de cultura sólido MEA. Os corantes para couro AB161, AB414, AB210 e AR357, foram adicionados ao meio em uma concentração inicial de 200 mgL⁻¹. A descoloração foi avaliada qualitativamente pela formação de um halo de descoloração ao redor do micélio fúngico ou pela bioissorção do corante por parte da biomassa.

O fungo ocasionou uma transformação em todos os corantes, mas os resultados variaram para cada um. No meio MEA-Azul, por exemplo, o isolado conseguiu formar um halo de descoloração rapidamente, porém em dez dias de incubação não foi capaz de degradar o corante remanescente (Fig. 5.6 e). No meio MEA-Marrom o fungo obteve os piores resultados. Em dez dias de incubação o isolado só conseguiu uma diminuição na intensidade da cor e não evidenciou-se a formação de um halo de descoloração (Fig. 5.6 f). Resultados contrários foram obtidos com o corante Preto 210. No meio MEA-Preto o isolado formou um halo de descoloração ao redor do micélio, mas o corante remanescente não apresentou nenhuma alteração em oito dias de incubação (Fig. 5.6 g). A cepa de *Trametes* sp. mostrou os melhores resultados no meio MEA-Vermelho, onde além de formar um halo de descoloração, diminuiu a intensidade da cor remanescente no meio de cultura em seis dias de incubação (Fig. 5.6 h). Os controles abióticos permaneceram sem nenhuma alteração nos dez dias de incubação (Fig. 5.6 a-d).

A descoloração dos corantes em meio sólido, indicada pelo halo sem cor na segunda triagem, confirmou o resultado esperado e sugeriu que a remoção de cor esteve associada ao mecanismo de biodegradação enzimática relacionado à produção de enzimas extracelulares, conforme como na triagem inicial. O isolado de *Trametes* sp. SC10 apresentou um mecanismo adicional, aparentemente associado ao fenômeno de bioissorção, indicado pela adsorção do corante na biomassa fúngica.

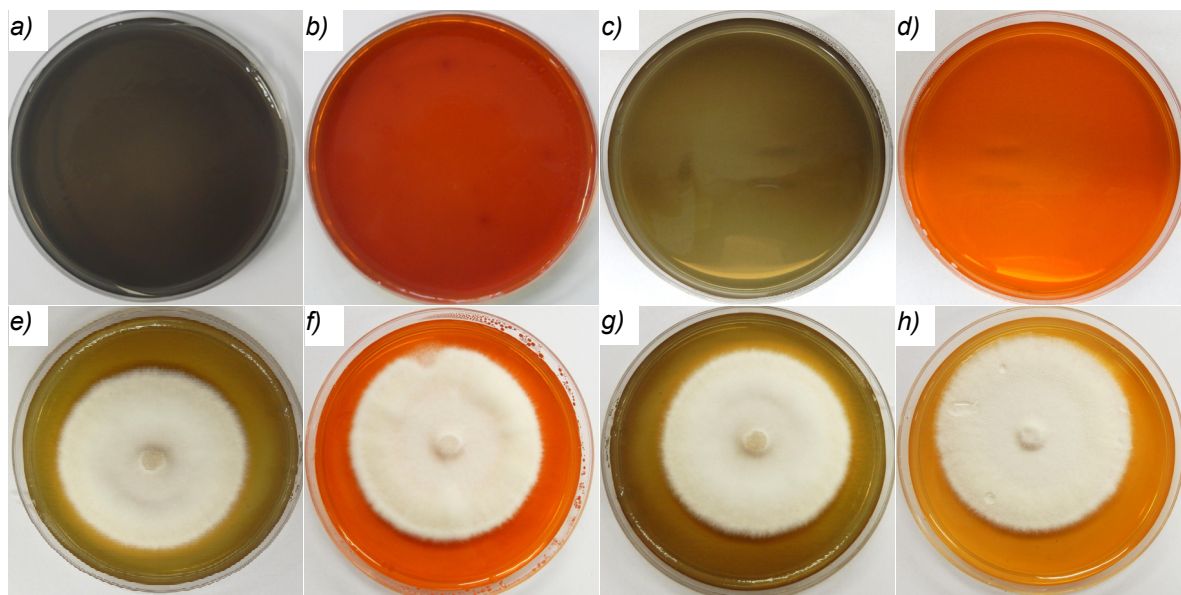


Figura 5.6. Controles abióticos do meio MEA, suplementado com os corantes em estudo: a) MEA-Azul; b) MEA-Marrom; c) MEA-Preto e d) MEA-Vermelho. *Trametes* sp. SC10 crescendo no meio de cultura: e) MEA-Azul; f) MEA-Marrom; g) MEA-Preto e h) MEA-Vermelho

Os resultados estiveram de acordo com os dados de outros autores. Barrasa et al. (2014), por exemplo, mostraram que cepas de *Trametes versicolor* descoloriram os corantes *Reactive Blue 38* e *Reactive Black 5* em meio sólido com oito e seis dias de incubação, respectivamente. Além disso, os autores relataram que o isolado *Trametes pubescens* alcançou a transformação dos dois corantes em oito dias de tratamento (Barrasa et al., 2014). Jarosz-Wilkolazka et al. (2002) reportaram que *T. versicolor* conseguiu descolorir os corantes *Basic Blue 22* e *Acid Red 183* em cinco e oito dias, respectivamente. Os autores também mostraram que uma cepa de *T. sanguinea* descoloriu o corante *Basic Blue 22* em oito dias, mas não mostrou nenhuma transformação no corante *Acid Red 183* (Jarosz-Wilkolazka et al., 2002). Hernández-Luna et al. (2008) mostraram que várias cepas do gênero *Trametes* descoloriram os corantes *Remazol Brilliant Blue*, *Acid Red 44* e *Cristal Violeta*. Entre eles encontravam-se as espécies *T. maxima*, *T. villosa*, *T. pubescens* e *T. trogii*. Os autores reportaram que os isolados tiveram diferentes formas e rendimentos ao descolorir os corantes (Hernández-Luna et al., 2008).

5.3. Ensaio em meio líquido

Nesta seção apresentam-se e discutem-se os principais resultados dos estudos realizados em condições de fermentação submersa. Incluem-se os experimentos de descoloração dos corantes para couro em meio líquido, as análises do efeito das variáveis operacionais e os métodos analíticos utilizados para entender os mecanismos envolvidos no processo de remoção da cor.

5.3.1. Experimentos de descoloração em meio líquido

Uma vez conhecida a capacidade do isolado *Trametes* sp. SC10 de descolorir os quatro corantes para couro em meio sólido, foi avaliada a sua capacidade de descoloração em meio líquido. O ensaio consistiu em uma fermentação submersa, na qual o caldo nutritivo MEB foi suplementado individualmente com os corantes em uma concentração inicial de 200 mgL⁻¹. Durante 10 dias de incubação em *shaker* a 30°C, pH 5,5 e 150 rpm, a cepa SC10 conseguiu valores de descoloração de 96,07 ± 0,56%, 90,96 ± 0,49%, 83,90 ± 0,57% e 95,88 ± 0,61% para os corantes Azul 161, Marrom 414, Preto 210 e Vermelho 357, respectivamente (Fig. 5.7).

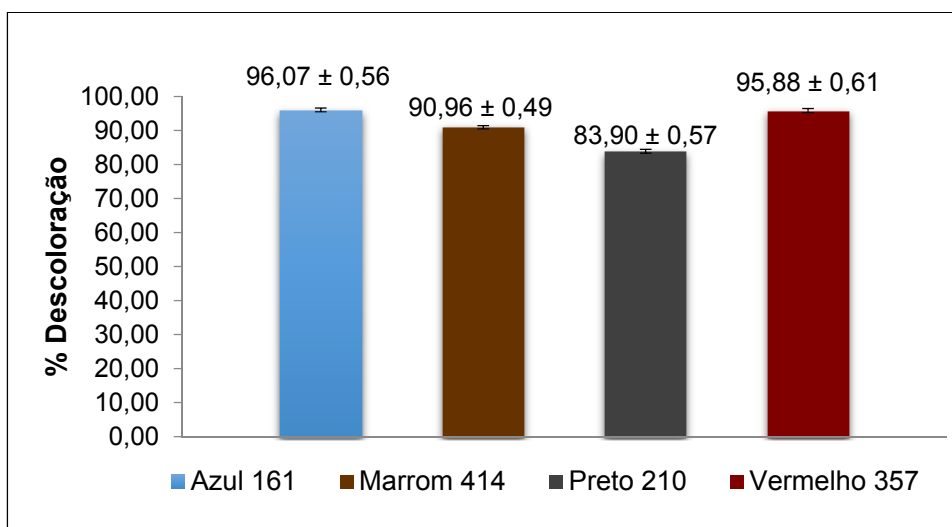


Figura 5.7. Descoloração dos corantes Azul 161, Marrom 414, Preto 210 e Vermelho 357 pelo isolado *Trametes* sp. SC10. Concentração inicial de corante 200 mgL⁻¹, 30°C, 150 rpm e pH 5,5 durante 10 dias de cultivo

A Figura 5.8 mostra qualitativamente a remoção de cada corante obtida pelo isolado *Trametes* sp. SC10. Pode-se comparar o controle abiótico (Erlenmeyer à esquerda de cada figura) com as triplicatas dos tratamentos após 10 dias de incubação (Erlenmeyers à direita).

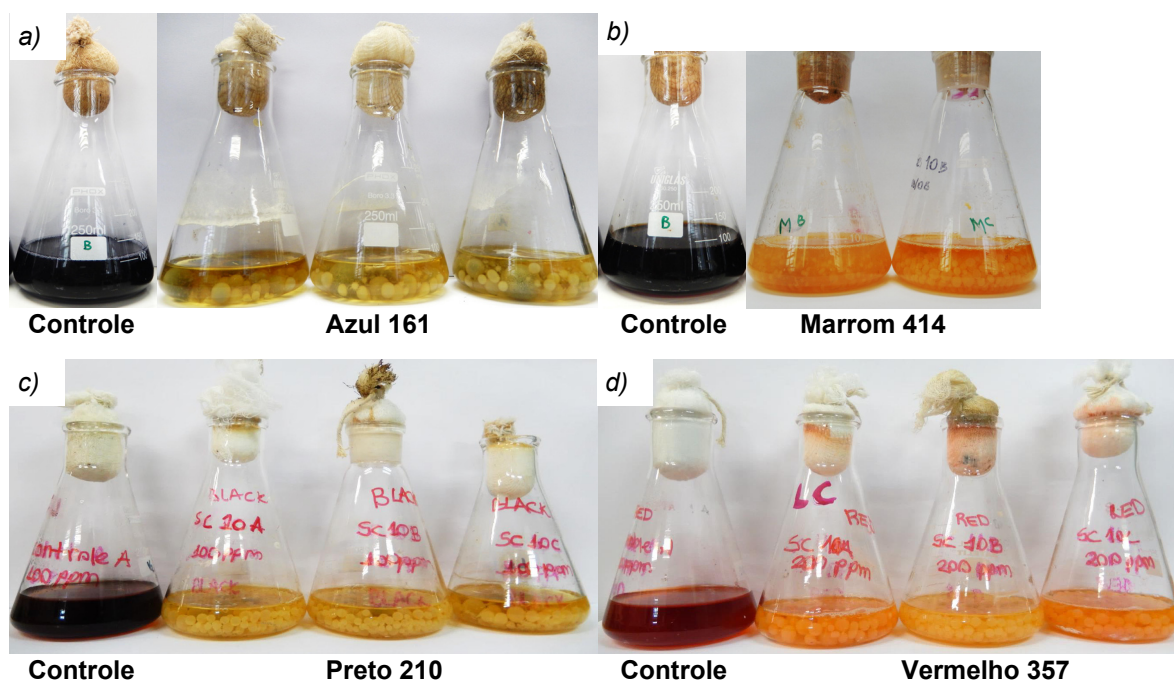


Figura 5.8. Isolado *Trametes* sp. SC10 crescendo no meio de cultura: a) MEB-Azul; b) MEB-Marrom; c) MEB-Preto; d) MEA-Vermelho. Concentração de corante 200 mgL⁻¹, 30°C, 150 rpm e pH 5,5 após 10 dias de cultura

Os experimentos em meio líquido renderam melhores resultados de descoloração do que os realizados em meio sólido. Isso se deve às condições de cultura em meio líquido que favorecem a distribuição de nutrientes e oxigênio, importante na expressão das enzimas ligninolíticas, associadas à biodegradação dos corantes. O tipo de corante e as características da sua estrutura também têm uma importante influência na capacidade de descoloração (Aksu et al., 2007; Kaushik; Malik, 2009). Isso explica porque o isolado SC10 não teve o mesmo rendimento de descoloração para os quatro corantes para couro avaliados. Esses corantes diferem na quantidade de ligações azo, sais, grupos doadores e aceptores de elétrons (como SO₃⁻) e complexos metálicos, associados à estrutura (ver Figura 4.1), que também têm importante efeito na descoloração.

Objetivando melhorar o rendimento da descoloração dos corantes, foi analisado o efeito de algumas variáveis operacionais como a concentração inicial de corante, agitação, pH inicial do meio de cultura e temperatura. O Vermelho 357, o corante mais fácil de descolorir pelo isolado SC10 (tanto em meio sólido quanto líquido) e o segundo melhor em termos de porcentagem de descoloração, foi selecionado para essas análises. Esse corante, por outro lado, já tinha sido foco de estudo no grupo de pesquisa nos trabalhos de Piccin (2013) e Scaraffuni (2014), os quais usaram um resíduo da indústria coureira como adsorvente no tratamento de efluentes contendo esse corante (Piccin, 2013; Scaraffuni, 2014).

5.3.2. Avaliação do efeito da concentração inicial de corante

A capacidade da cepa *Trametes* sp. SC10 para descolorir o Vermelho 357 foi estudada mediante uma cinética de descoloração em diferentes concentrações iniciais de corante, que variaram de 100 a 800 mgL⁻¹. O teste foi desenvolvido a 30°C, 150 rpm e pH 5,5 durante 10 dias de cultura (Fig. 5.9).

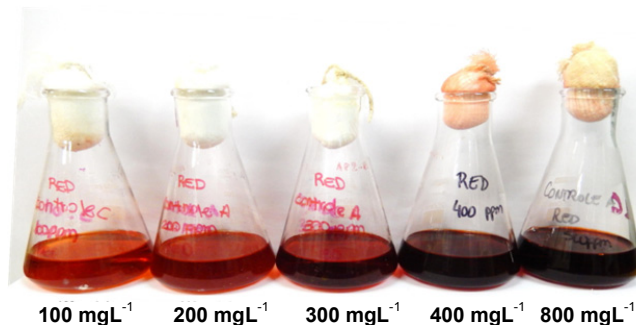


Figura 5.9. Frascos Erlenmeyer contendo o meio extrato de malte líquido (MEB) com o corante Vermelho 357 em diferentes concentrações (100 a 800 mgL⁻¹)

O isolado conseguiu porcentagens de descoloração de $95,93 \pm 0,21\%$, $95,88 \pm 0,61\%$ e $92,00 \pm 0,55\%$ para concentrações de 100, 200 e 300 mgL⁻¹ respectivamente. Como se pode observar na Figura 5.10, a porcentagem de descoloração diminui com o aumento da concentração. Além disso, o tempo necessário para atingir valores altos de descoloração também aumentou de 120 h para 144 h na medida em que se incrementou a concentração inicial de AR357.

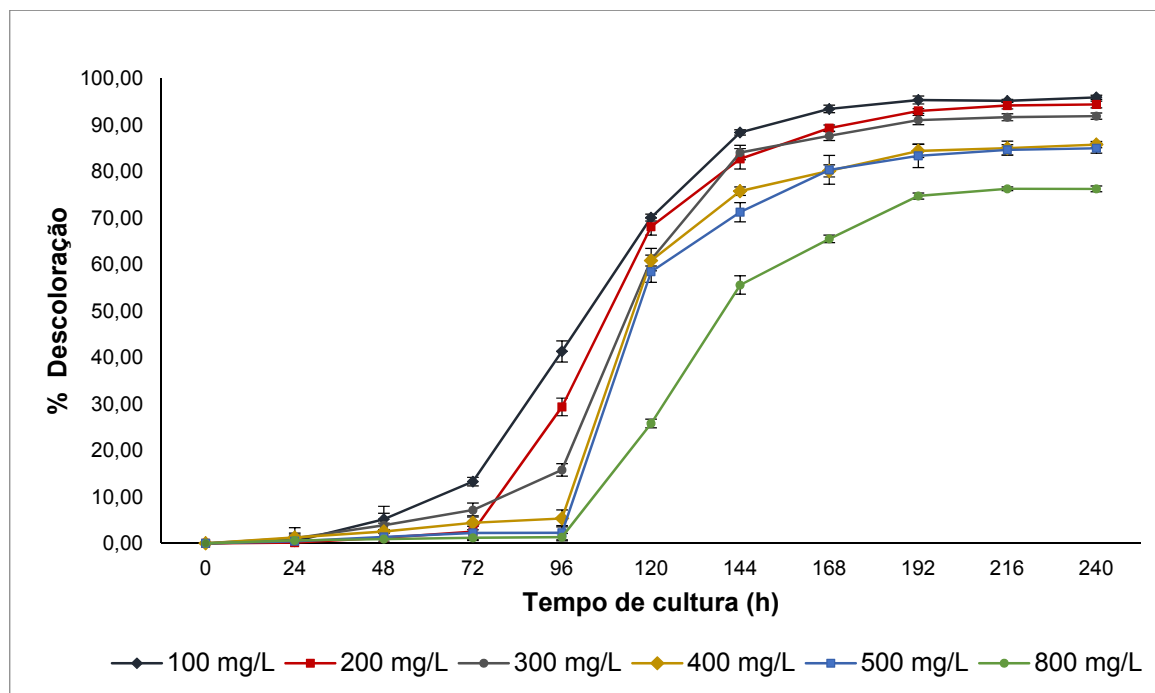


Figura 5.10. Cinética de descoloração do corante Vermelho 357 pelo isolado *Trametes* sp. SC10 em diferentes concentrações de corante (150 rpm; 30°C pH 5,5)

Pode-se observar no perfil de descoloração que para concentrações maiores de 300 mgL⁻¹, nos mesmos 10 dias de tratamento, as porcentagens de descoloração diminuíram de uma média de 94% para valores menores de 85%. O tempo necessário para isso também aumentou de 144 h para 192 h. Além disso, as concentrações maiores de 500 mgL⁻¹ mostraram uma diminuição na produção de micélio fúngico e na descoloração.

O efeito adverso na capacidade de descoloração, causado pelo aumento da concentração inicial de corante, pode ser explicado pelo fato de que altas concentrações de corantes azoicos são tóxicas para os micro-organismos, afetam o crescimento e inibem a produção de enzimas ligninolíticas. Isso se deve a que o aumento na concentração de corante também provoca o aumento de outros fatores inibidores, tais como o pH e a concentração de sais e metais pesados, associados à estrutura do corante. Assim, é inibido o crescimento do micélio fúngico e, portanto, também são diminuídas as taxas de descoloração (Ali, 2010; Rodríguez-Couto, 2015).

Os resultados obtidos estão de acordo com os de vários autores que já reportaram que o aumento na concentração inicial de corante é negativo para os rendimentos de descoloração de corantes industriais por WRF. Kapdan et al. (2000), por exemplo, estudaram a máxima concentração do corante *Turquoise Blue G* tolerada por *Trametes versicolor* (sinôn. *Colarius versicolor*) e relataram que a eficiência na descoloração foi quase 100% nas concentrações de 100 a 250 mgL⁻¹, no intervalo de 3 a 5 dias de tratamento. No entanto, a descoloração diminuiu até quase 80% nas concentrações de corante de 700 a 1200 mgL⁻¹ em 9 dias de incubação (Kapdan et al., 2000). Segundo Yesilada et al. (2002), o aumento na concentração inicial do corante *Astrazon Red* afetou o rendimento de descoloração do fungo *Trametes trogii*. Como resultado desse parâmetro, a cepa alcançou 95%, 90% e 76% de descoloração para as concentrações de corante de 66, 132 e 264 mgL⁻¹, respectivamente. Os autores Aksu et al. (2007) atingiram 92% de descoloração do corante *Reactive Black 5*, quando a concentração inicial era 58,4 mgL⁻¹ com o fungo *T. versicolor*, no intervalo de 5 a 8 dias de cultivo. Quando a concentração foi aumentada para 385,6 mgL⁻¹, o fungo só conseguiu 77% de descoloração em 14 dias de incubação. Similarmente, para Sukumar et al. (2009), a redução da cor diminuiu quando aumentou-se a concentração do corante azoico *Acid Red 66*, num tratamento com o fungo *T. versicolor*. O isolado alcançou resultados de 95,7%, 90,1% e 88,6% para concentrações de 10, 50 e 100 mgL⁻¹, respectivamente. Hernández-Luna et al. (2008) obtiveram, ótimos rendimentos de descoloração que atingiram valores de mais de 90%, para três corantes diferentes, entre eles o corante azoico *Acid Red 44*, por isolados de *Trametes villosa* e *Trametes maxima* em uma concentração inicial de corante de 200 mgL⁻¹.

Considerando que não houve diferença entre as percentagens de descoloração do corante Vermelho 357 nas concentrações de 100 e 200 mgL⁻¹ (95,93 ± 0,21% e 95,88 ± 0,61, respectivamente), os experimentos adicionais realizados para elucidar os mecanismos envolvidos no processo de descoloração e para avaliar os efeitos das variáveis de operação foram realizados na maior concentração (200 mgL⁻¹).

5.3.3. Avaliação do efeito do pH

O efeito do pH foi analisado mediante uma cinética de descoloração usando o isolado *Trametes* sp. SC10 crescendo no meio MEB-Vermelho em uma faixa de pH de 2,0 a 7,0, mantendo constantes a concentração inicial de (200 mgL^{-1}) e as condições de incubação (30°C e 150 rpm).

Os dados apresentados na Figura 5.11 mostram como os tempos e porcentagens de descoloração foram afetados pelo pH inicial do meio de cultura. A remoção máxima de cor foi de $94,31 \pm 0,96\%$ a um pH de 5,0, mas não se alterou consideravelmente quando o pH do meio foi alterado para valores mais alcalinos, atingindo $93,61 \pm 0,04\%$ e $91,89 \pm 2,13$ para pH 6,0 e 7,0 respectivamente. No meio com pH 4,0, o isolado também conseguiu uma boa remoção de cor, alcançando $94,10 \pm 0,96\%$ de descoloração. No entanto, a acidificação do meio de cultura influenciou negativamente na produção de biomassa e, portanto, na capacidade de descoloração do corante. Para valores de pH de 3,0 e 2,0, o isolado removeu quantidades menores do corante: $52,29 \pm 0,62\%$ e $40,37 \pm 0,42\%$, respectivamente.

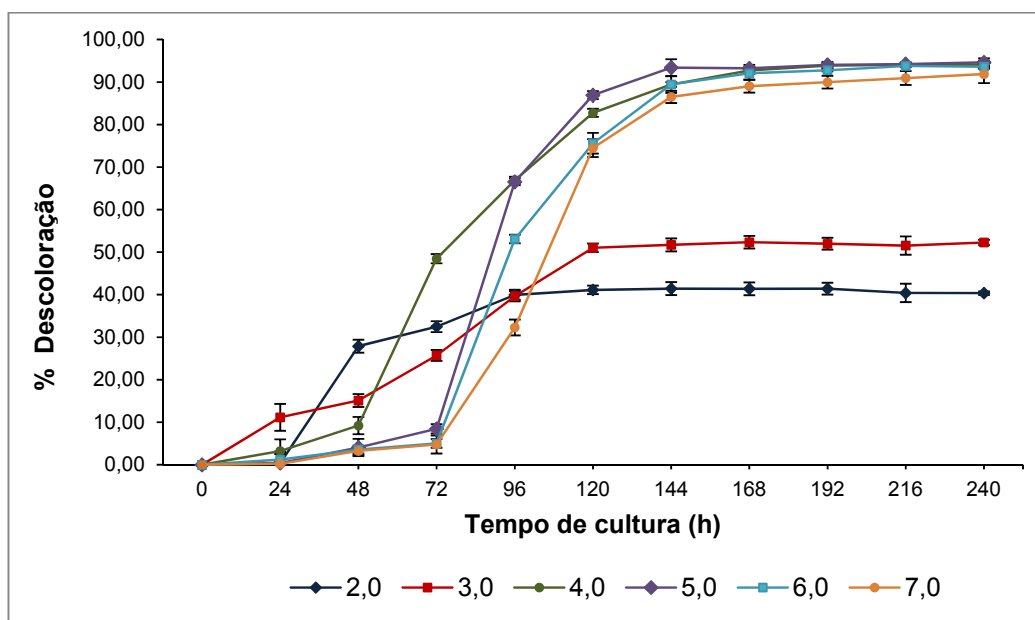


Figura 5.11. Cinética de descoloração do corante Vermelho 357 pelo isolado *Trametes* sp. SC10 em diferentes valores de pH. Concentração inicial de corante 200 mgL^{-1} , 150 rpm e 30°C

Na literatura, a informação sobre o efeito do pH no crescimento dos WRF e na sua capacidade de descolorir e biodegradar corantes industriais é muito diversa. Por exemplo, segundo Fu e Viraraghavan (2001), as melhores condições de pH para o crescimento de basidiomicetos se encontram em valores de pH variando numa faixa de 4,0 a 5,0. Os resultados obtidos nesta etapa coincidem com esses dados, já que o isolado *Trametes* sp. SC10 apresentou uma boa produção de biomassa nesta faixa de pH.

Os dados de descoloração, no entanto, diferem de outros autores. Além a cepa *Trametes* sp. SC10 ter atingido as melhores porcentagens de descoloração nessa faixa de 4,0 a 5,0, um pH alcalino não influenciou na capacidade de remoção da cor residual. Segundo Kaushik e Malik (2009), condições de acidez no meio de cultura produzem melhores resultados de remoção de corante na maioria dos fungos de podridão branca. Isso acontece porque as enzimas ligninolíticas têm uma atividade máxima em pH ácido (Kapdan et al., 2000; Kaushik; Malik, 2009). Para Ali (2010), os fungos geralmente apresentam melhores resultados de descoloração e biodegradação de corantes em valores de pH ácidos ou neutros. Contudo, baixos valores de pH nem sempre são adequados para o tratamento de efluentes contendo corantes. Assim, as cepas fúngicas capazes de descolorir corantes azoicos, em condições de pH alcalino são mais adequadas para aplicações no tratamento de efluentes industriais, já que as águas residuais da indústria coureira e têxtil possuem elevados valores de pH (Ali, 2010; Rodríguez-Couto, 2015).

Por outro lado, os resultados obtidos confirmam os dados de outros pesquisadores como Yesilada et al. (2002), que estudaram o efeito de várias condições de operação como pH, temperatura, quantidade de inóculo e agitação, na descoloração do corante industrial *Astrazon Red FBL* por uma cepa de *Trametes trogii* (sinôn. *Funalia trogii*). Os autores observaram que o pH foi a única variável que não teve influência na descoloração. Além disso, o fungo conseguiu altas porcentagens de descoloração em todos os valores de pH, variando dentro de uma faixa de 6 a 11, similar aos resultados obtidos com o isolado SC10.

Os autores Hernández-Luna et al. (2008) também reportaram altos valores de descoloração do corante azoico *Acid Red 44*, com cepas de *Trametes villosa* e *Trametes maxima*, em um meio de cultura com pH 6,0. Similarmente, Zille et al (2005) também conseguiram uma eficiente biodegradação de dois corantes azoicos usando enzimas lacases isoladas de *Trametes villosa* em um pH de 5,0. De acordo com Yang (2009), o pH ideal na descoloração de seis corantes azoicos diferentes por uma cepa de *Trametes* sp. SQ01 foi 4,5.

5.3.4. Avaliação do efeito da agitação

As percentagens de descoloração atingidas pela cepa de *Trametes* sp. SC10 foram comparadas em condições de cultura estática e em quatro diferentes agitações (50, 100, 150 e 200 rpm). Os resultados indicaram que na medida em que foi aumentada a velocidade de rotação, a remoção de corante também aumentou em termos de rapidez e extensão. Na Figura 5.12 pode-se observar que para o cultivo estático o isolado SC10 apenas atingiu $6,28 \pm 0,93\%$ de descoloração, no entanto, nas culturas dinâmicas a descoloração foi aumentando, conseguindo-se remover $95,88 \pm 0,61\%$ e $96,03 \pm 1,33\%$ para 150 e 200 rpm, respectivamente.

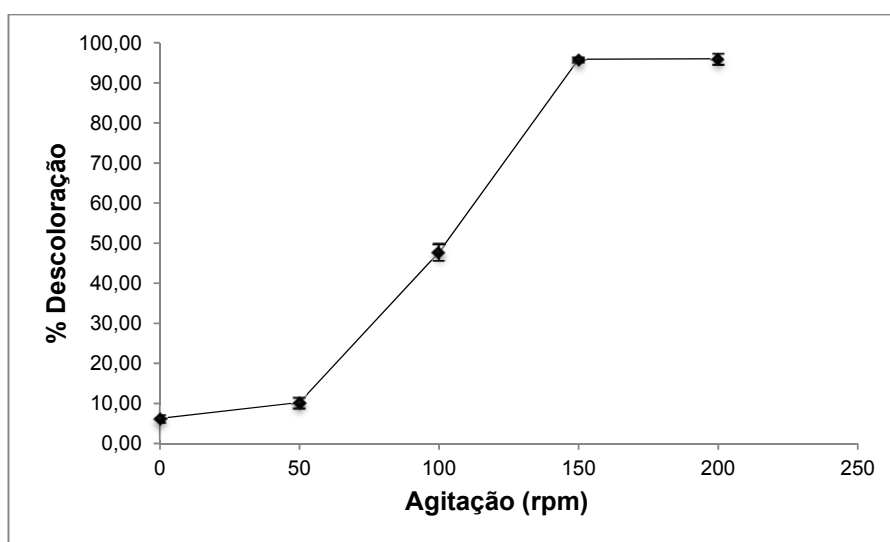


Figura 5.12. Efeito da agitação na capacidade de descoloração de *Trametes* sp. SC10. Concentração inicial de corante 200 mgL^{-1} , pH 5,5 e 30°C

A morfologia do fungo também foi afetada pelo aumento da agitação. Em cultivo estático, *Trametes* sp. SC10 cresceu formando uma suspensão homogênea de micélio flutuando na superfície do meio de cultura. No entanto, nas culturas com agitação, o isolado cresceu formando pequenas esferas de micélio (*pellets*) com diâmetro de 3 a 5 mm, que se distribuíram homogêneamente pelo meio de cultura devido à rotação orbital. As diferenças morfológicas causadas pelo efeito da agitação podem ser observadas na Figura 5.13.

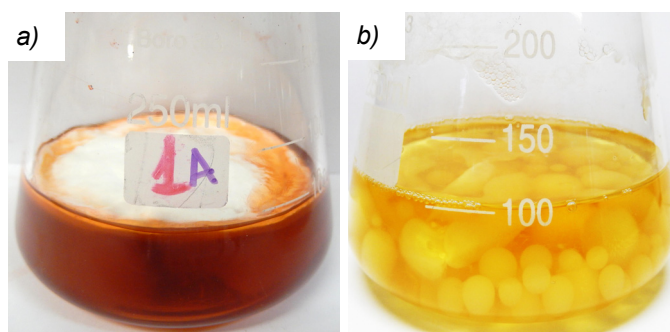


Figura 5.13. Diferenças morfológicas e de descoloração causadas pelo efeito da agitação em *Trametes* sp. SC10 crescendo no meio MEB-Vermelho: a) Sem agitação; b) Agitação de 200 rpm. Concentração inicial de corante 200 mgL^{-1} , pH 5,5 e 30°C

Os resultados obtidos nessa análise coincidem com os de Swamy e Ramsay (1999), que avaliaram o efeito da agitação na descoloração dos corantes azoicos *Amaranth*, *Tropaeolin O*, *Reactive Black 5* e *Remazol Orange* mediante culturas em meio líquido de *Trametes versicolor*. Em condição estática o fungo conseguiu apenas 5% de descoloração para *Amaranth*, 8% para *Tropaeolin*, 13% para *Reactive Black 5* e 0% para *Remazol Orange*. Em condições de agitação (200 rpm), no entanto, o fungo atingiu 100% de descoloração para todos os corantes (Swamy; Ramsay, 1999). Resultados similares foram obtidos por Yesilada et al. (2002), que analisaram o efeito da rotação em cepas de *Trametes trogii* (sinôn. *Funalia trogii*) descolorindo o corante *Astrazon Red FBL*. Os autores observaram que a agitação teve importância na transformação do corante, atingindo os maiores resultados de descoloração sob maior agitação (100-150 rpm). Os autores Jarosz-Wilkolazka et al. (2002) mostraram como a agitação melhorou os resultados de descoloração do corante azoico *Acid Red 183*, usando vários WRF, entre eles *T. versicolor*.

O melhor desempenho das culturas agitadas pode estar associado às condições fisiológicas. Ao comparar as duas formas de crescimento do isolado, infere-se que a disposição em *pellets* pode favorecer as condições de aeração e agitação, necessárias para satisfazer a necessidade de oxigênio dos microorganismos durante o cultivo, além de aumentar a transferência de massa (oxigênio e nutrientes) da fase líquida (meio de cultura) para a fase sólida (células em crescimento) (Jarosz-Wilkolazka et al., 2002; Kaushik; Malik, 2009).

Na natureza, os WRF desenvolvem-se aerobiamente e, portanto, eles precisam de oxigênio para o crescimento e manutenção. Além disso, as enzimas ligninolíticas precisam do oxigênio como cofator para aumentar a sua ação catalítica. Essa exigência de oxigênio, que depende de cada WRF e do seu LDS, pode afetar a morfologia e levar a diminuições nas taxas de crescimento e síntese enzimática (Žnidaršić; Pavko, 2001).

5.3.5. Avaliação do efeito da temperatura

Para conhecer a temperatura ideal de crescimento e descoloração de *Trametes* sp. SC10 foram avaliadas cinco temperaturas diferentes na faixa de 20°C a 40°C. As outras condições de operação permaneceram constantes (concentração inicial de corante 200 mgL⁻¹, pH 5,5 e 150 rpm).

Os resultados desta análise mostraram que nas temperaturas de 25°C e 30°C não houve diferença na quantidade de cor removida pelo isolado SC10, atingindo 95,27 ± 1,44% e 95,88 ± 0,61%, respectivamente. Contudo, um breve aumento de temperatura de 5°C provocou uma importante diminuição na capacidade de descoloração, fazendo que o isolado só alcançasse 32,40 ± 1,58% de remoção a 35°C. Quando a temperatura foi diminuída para 20°C, o potencial de remoção do corante também diminuiu. Nessa temperatura o isolado só atingiu 27,11 ± 0,86% de descoloração. Na temperatura de 40°C o isolado não teve crescimento nem descoloração. Os resultados da análise do efeito da temperatura são mostrados na Figura 5.14.

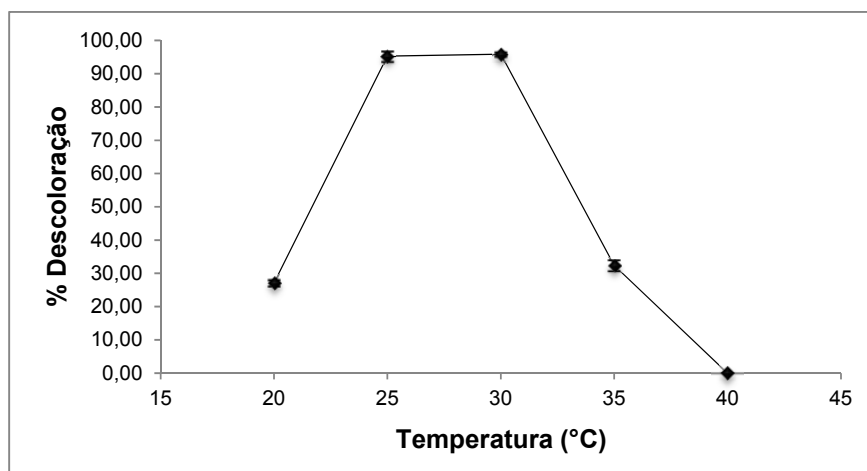


Figura 5.14. Efeito da temperatura na capacidade de descoloração de *Trametes* sp. SC10. Concentração inicial de corante 200 mgL^{-1} , pH 5,5 e 150 rpm

Diferentes tipos de micro-organismos têm diferentes temperaturas ideais de crescimento. A maioria dos fungos de podridão branca cresce em uma faixa de temperatura de 25 - 35°C, no entanto, outros autores indicam que a melhor faixa de temperatura para biodegradar corantes sintéticos está entre 25 - 37°C. Estas condições dependem de cada espécie (Ali, 2010; Fu; Viraraghavan, 2001).

Para o isolado *Trametes* sp. SC10, os melhores resultados encontraram-se na faixa de temperatura entre 25 e 30°C. Resultados semelhantes já foram reportados por Zille et al. (2005) mediante um trabalho que envolveu a descoloração de dois corantes azoicos com enzimas lacases isoladas de *Trametes villosa*. Os autores reportaram uma temperatura ótima de 25°C para os experimentos. Similarmente, Hernández-Luna et al. (2008) também estudaram a descoloração de *Acid Red 44*, por cepas de *Trametes villosa* e *Trametes maxima*, atingindo mais de 90% de descoloração com os dois fungos em uma temperatura ótima de 25°C. Segundo Sukumar et al. (2009), uma temperatura de 30°C foi ótima na descoloração do corante azoico *Acid Red 66*, por cepas de *Trametes* sp. No entanto, temperaturas menores de 25°C influenciaram negativamente no crescimento do micro-organismo e na remoção de corante.

5.3.6. Análise da produção de enzimas ligninolíticas

Assumindo que parte da descoloração dos corantes esteve associada ao mecanismo de biodegradação baseado na produção extracelular de enzimas ligninolíticas produzidas pelo WRF, foi necessário saber quais dessas enzimas estavam sendo produzidas por *Trametes* sp. SC10 durante o processo de descoloração do corante para couro Vermelho ácido 357.

- Enzima Lacase: a produção da enzima lacase foi medida durante os 10 dias de tratamento, seguindo a oxidação do substrato ABTS, a partir das amostras retiradas durante a cinética de descoloração. O isolado mostrou uma importante produção de enzima a partir das 96 horas de tratamento, passando de $211,48 \pm 10,45 \text{ UL}^{-1}$ a $2327,48 \pm 93,97 \text{ UL}^{-1}$ em apenas 24 h. O máximo pico de produção foi no período entre as 120 e 144 horas de incubação ($2207,03 - 2327,4 \text{ UL}^{-1}$). Na Figura 5.15 pode observar-se uma relação entre a produção da enzima lacase e a descoloração do corante.

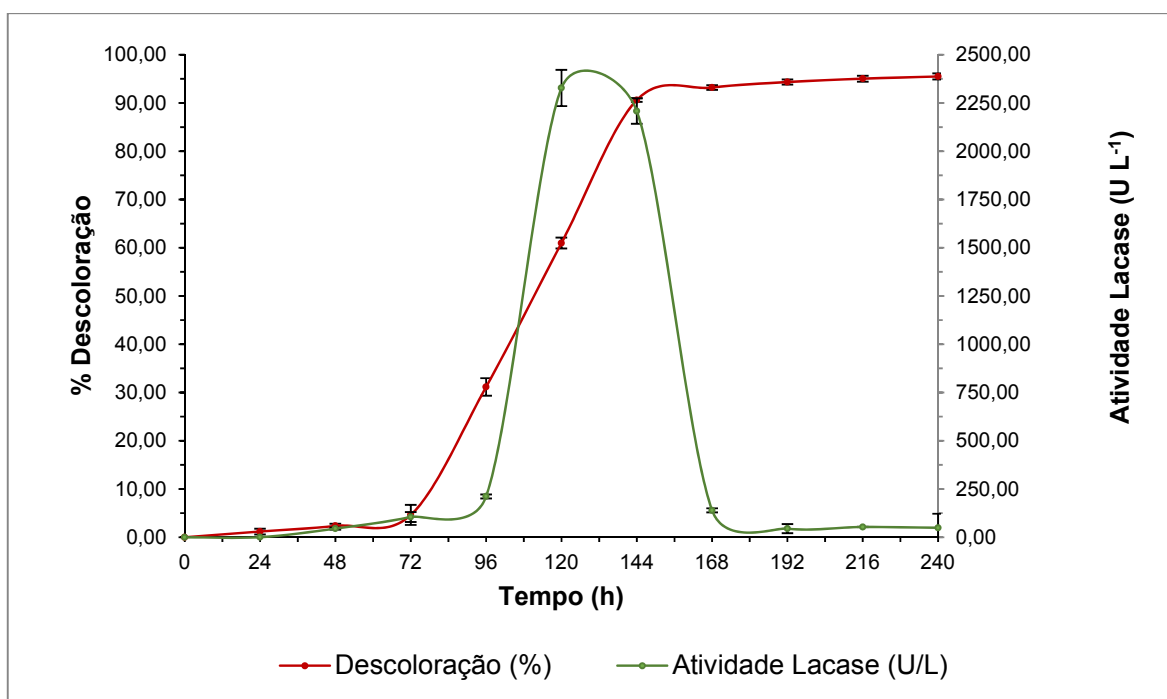


Figura 5.15. Relação entre descoloração e a atividade da enzima lacase pelo isolado *Trametes* sp. SC10 durante uma cinética de descoloração do corante Vermelho 357

- Enzima lignina peroxidase: a produção da enzima LiP foi calculada seguindo a reação de álcool veratrílico (VA) a veratraldeído em presença de H_2O_2 . O isolado *Trametes* sp. SC10 não mostrou nenhuma atividade com este substrato e, portanto, descartou-se a produção de LiP pelo isolado *Trametes* sp. SC10, nas condições avaliadas.

- Enzima peroxidase dependente de manganês: a atividade da enzima MnP foi medida seguindo a reação da enzima com o substrato 2,6-dimetóxi-fenol (DMP) em presença de H_2O_2 e $MnSO_4$. O isolado *Trametes* sp. SC10 mostrou atividade enzimática MnP, porém, em proporção muito menor quando comparada à enzima Lac. Similarmente à Lac, a produção enzimática MnP destacou-se a partir das 96 h de cultura, quando passou de uma atividade de $9,84 \pm 1,76 \text{ UL}^{-1}$ a $60,84 \pm 3,36 \text{ UL}^{-1}$. A máxima atividade enzimática reportou-se entre 120 e 196 h de tratamento, atingindo $63,19 \pm 0,92 \text{ UL}^{-1}$. No entanto, a atividade enzimática da MnP não diminuiu tão rapidamente como ocorreu com a enzima Lac, e observou-se atividade até no último dia de incubação (Fig. 5.16).

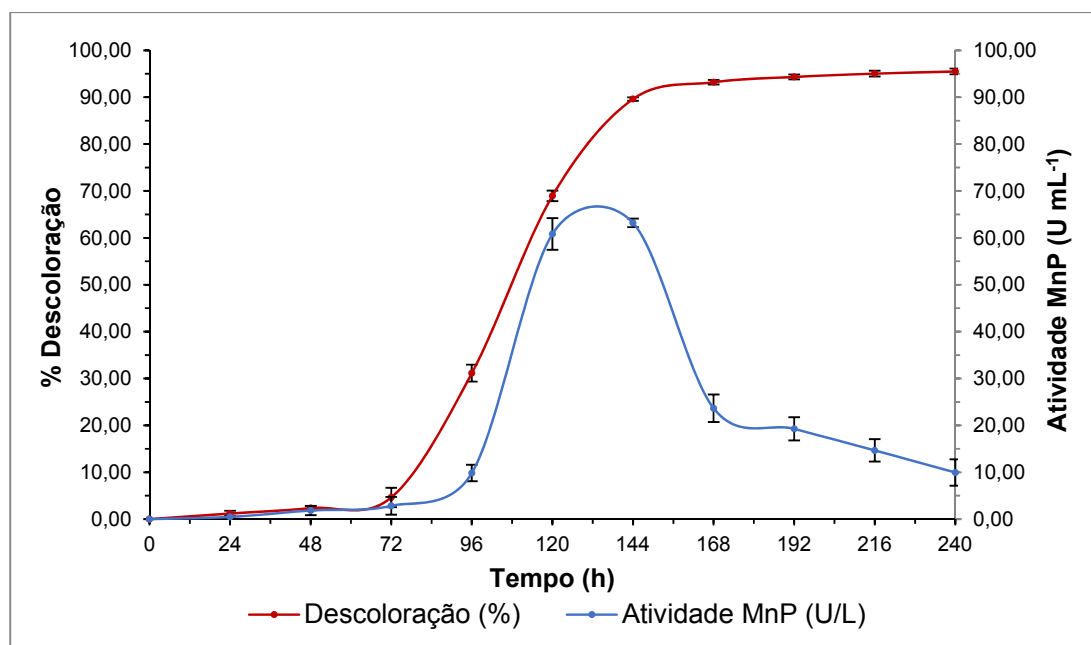


Figura 5.16. Relação entre descoloração e a atividade da enzima MnP pelo isolado *Trametes* sp. SC10 durante uma cinética de descoloração do corante Vermelho 357

Os resultados mostraram que o isolado *Trametes* sp. SC10 é produtor das enzimas lacase e peroxidase dependente de Manganês (Lac > MnP), mas não produziu lignina peroxidase, nas condições estudadas. Assim, na classificação dos fungos de podridão branca de acordo a produção de enzimas ligninolíticas sugerida por Hatakka (1994), o isolado SC10 está dentro do grupo II (WRF produtores de Lac e MnP mas não LiP).

A produção das duas enzimas simultaneamente no gênero *Trametes*, já foi reportada por vários autores. Hernández-Luna et al. (2008), por exemplo, observaram a produção de MnP e Lac no isolado *T. villosa* CS5, atingindo uma atividade enzimática Lac de 2800 UL⁻¹ e uma atividade MnP de 120 UL⁻¹. Os resultados obtidos por *Trametes* sp. SC10 estão muito perto desses valores para a enzima lacase (2207,03 – 2327,4UL⁻¹). Similarmente, Rodriguez et al. (1999) relataram que *T. hispida* produziu a enzima Lac (86 - 1042 UL⁻¹) e MnP (39 - 96 UL⁻¹) mas não LiP. Os autores Paice et al. (1993) reportaram a produção de Lac (206 UL⁻¹) e MnP (200 UL⁻¹), mas não LiP, no fungo *T. versicolor* durante o branqueamento de celulose. O isolado *Trametes* sp. SC10 mostrou melhor atividade enzimática que essas cepas.

Pode-se observar na cinética de descoloração que a remoção esteve ligada à produção da enzima lacase. Justo quando o fungo começou a mostrar atividade enzimática Lac, a partir das 96 h, o corante residual diminuiu de 68,84 % até 39,04% nas 24 h seguintes. Similarmente, quando a cepa atingiu o máximo pico de atividade entre as 120 e 144 h, atingiu-se a máxima descoloração, passando de 60,96 ± 1,13% a 90,61 ± 0,38%. Neste período de 24 h, o isolado obteve quase 30% de remoção. Na faixa de tempo em que se observou atividade lacase (96-144 h), o micro-organismo removeu 60 % de corante residual (ver Fig. 5.15).

Por outro lado, a baixa atividade enzimática da MnP (63,19 ± 3,36 UL⁻¹) quando comparada com Lac (2207,03 – 2327,4UL⁻¹) sugere que não houve participação desta peroxidase na descoloração do corante Vermelho 357.

Para descartar uma possível degradação do substrato DMP, usado para avaliar a atividade de MnP, pela ação da enzima Lac, como já foi relatado por Hernández-Luna et al. (2008) e Johannes e Majcherczyk (2000), foi realizado um experimento adicional seguindo a degradação do substrato DMP pelo extrato enzimático, em ausência de H₂O₂ e MnSO₄. Os resultados mostraram que não houve degradação. Partindo-se do pressuposto que o cofator Mn²⁺ estava presente em concentrações adequadas no caldo nutritivo durante a cinética de descoloração, descartou-se a participação da enzima MnP no processo de descoloração.

Assim, a descoloração do corante para couro Vermelho 357 pode atribuir-se à atividade da enzima lacase produzida extracelularmente pelo isolado *Trametes* sp. SC10.

Vários autores têm associado a descoloração de corantes industriais à produção de enzimas lacase por fungos do gênero *Trametes*. Rodriguez, et al. (1999) observaram que a descoloração de vários corantes industriais esteve associada à produção da enzima lacase pelo fungo *T. hispida* (86 - 1042 UL⁻¹). Da mesma forma, Rodriguez-Couto et al. (2004) mostraram que a descolorização dos corantes para couro *Luganil Green* e *Sella Soli Red* por *T. hirsuta* foi conseguida pela ação da enzima Lac (300 - 1000 UL⁻¹). Os autores Zouari-Mechichi et al. (2006) estudaram a descoloração de seis corantes industriais por enzimas purificadas, extraídas de *T. trogii*. Os autores conseguiram importantes porcentagens de remoção devido à atividade enzimática Lac (500 UL⁻¹). Similarmente, Lu et al. (2007) degradaram o corante antraquinônico *Remazol Brilliant Blue R* com uma enzima Lac extraída de *T. sanguinea* (5117 UL⁻¹). Hernández-Luna et al. (2008) também degradaram o corante industrial *Acid Red 44* com uma cepa de *T. villosa* e atribuíram a descoloração à produção da enzima lacase (2800 UL⁻¹). Yang et al. (2009) alcançaram a descoloração de quatro corantes azoicos (*Congo Red*, *Acid Red*, *Orange G* e *Reactive Black 5*) com uma enzima lacase de *T. versicolor* (500 UL⁻¹).

A atividade da enzima lacase do isolado *Trametes* sp. SC10 foi maior que a reportada por muitos desses autores, o que demonstra o potencial desse isolado nativo. É importante ressaltar que em vários desses trabalhos, a produção da enzima lacase foi melhorada pela adição de indutores e cofatores como etanol, Cu^{2+} , Tween 80, álcool veratrílico, guaiacol, ABTS, entre outros. Os níveis notáveis de produção de lacase pelo isolado *Trametes* sp. SC10, atingidos nesta pesquisa, não foram induzidos por nenhum fator. Portanto, esse aspecto deve ser abordado e pesquisado em trabalhos posteriores, visando melhorar os rendimentos de descoloração.

5.3.7. Análise do metabolismo do isolado *Trametes* sp. SC10 na descoloração do corante Vermelho 357

Para conhecer o metabolismo do isolado *Trametes* sp. SC10 durante o processo de descoloração do corante Vermelho 357 foram medidos o consumo de glicose e a produção de biomassa. Os resultados permitiram analisar e relacionar o metabolismo primário e secundário à remoção do corante. Na Figura 5.17 pode-se observar que quando a glicose residual diminuiu de $81,88 \pm 1,38$ para $41,27 \pm 2,17\%$ após 72 h de cultura, a biomassa aumentou consideravelmente, indicando o início da fase exponencial de crescimento dentro do metabolismo primário. No período entre 96 e 120 h de tratamento, a glicose foi praticamente consumida, e o fungo começou o metabolismo secundário. Assim, era esperado que a partir das 120 h começasse a remoção do corante, já que é sabido teoricamente que as enzimas ligninolíticas, associadas à descoloração, são produzidas no metabolismo secundário (Eriksson, 2010; Kirk; Farrell, 1987; Tuomela, 2000). Isso foi comprovado experimentalmente por vários autores que avaliaram a descoloração de corantes sintéticos com cepas de *Trametes* sp. (Swamy; Ramsay, 1999a). Contudo, a descoloração começou por volta das 24 h de tratamento e foi aumentando quando o micro-organismo ainda estava ainda na fase exponencial. Isso faria pensar que a produção enzimática esteve associada ao metabolismo primário, contradizendo a fundamentação teórica.

No entanto, ao fazer uma análise da atividade enzimática, pode-se observar que a maior atividade enzima lacase esteve entre as 96 e 144 h (Fig. 5.15), quando o micro-organismo estava saindo da etapa exponencial e entrando no metabolismo secundário.

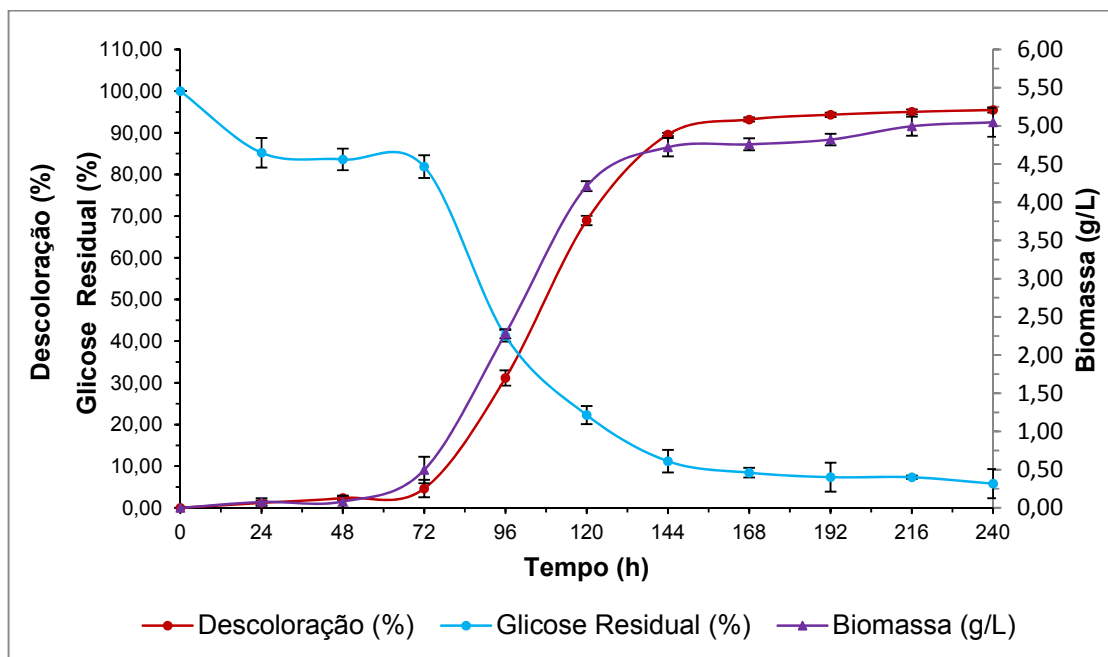


Figura 5.17. Descoloração do corante Vermelho 357 pelo isolado *Trametes* sp. SC10 em função do tempo. A quantidade de glicose residual e de biomassa também foram analisadas. O teste foi realizado em meio líquido. Concentração inicial de corante de 200 mgL^{-1} , 150 rpm, 30°C e pH 5,5

Embora a descoloração começasse quando o isolado *Trametes* sp. SC10 ainda estava na etapa de crescimento exponencial (metabolismo primário) a maior remoção de corante atingiu-se quando a atividade enzimática esteve no seu pico de expressão, no mesmo período em que a glicose foi consumida e a produção de biomassa estabilizou-se (metabolismo secundário). Isso sugeriu que outro mecanismo esteve associado à remoção inicial de corante.

Uma análise qualitativa do processo de descoloração, realizada para encontrar uma explicação para o fenômeno, permitiu concluir que o mecanismo associado à descoloração durante a etapa de crescimento exponencial foi a biossorção, explicado na próxima seção.

5.3.8. Mecanismo de bioissorção

No teste de descoloração do corante Vermelho 357 com o isolado *Trametes* sp. SC10 foi observado como uma parte do corante foi adsorvida pelo micélio do fungo nos primeiros dias de tratamento. Na Figura 5.18 pode-se observar como a biomassa foi adquirindo a cor da solução aquosa a partir das 24 horas de tratamento. Esse fenômeno é conhecido como bioissorção, e consistiu na adsorção do corante disperso no meio de cultura líquido pela biomassa. Nesse caso, a biomassa do fungo atuou como a fase sólida ou bioadsorvente, e o corante vermelho representou o adsorbato a ser bioissorvido do meio de cultura (fase líquida). A cor adsorvida na biomassa, no entanto, foi desaparecendo conforme a atividade enzimática aumentava no intervalo entre 96 a 144 h de tratamento. A cor vermelha adquirida pela biomassa por causa do corante no meio desapareceu quase que por completo. É sabido que nesse período, a enzima lacase teve sua máxima expressão, sugerindo que a enzima extracelular também degradou o corante acumulado na biomassa. Este fenômeno já foi relatado por outros autores (Baccar et al., 2011; Saroj et al., 2014).

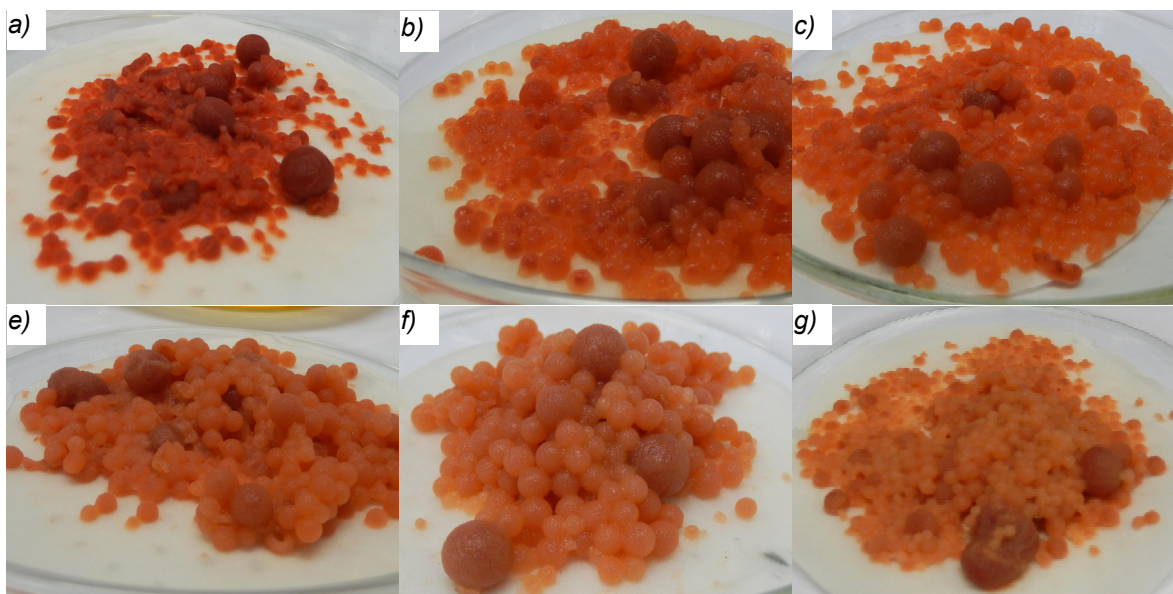


Figura 5.18. Avaliação qualitativa da bioissorção do corante Vermelho 357 pela biomassa do isolado *Trametes* sp. SC10 após: a) 24 h; b) 48 h; c) 72 h; d) 96; e) 120 h; f) 144 h e g) 168 h de tratamento. Concentração inicial de corante de 200 mgL^{-1} , 150 rpm, 30 °C e pH 5,5

Foi realizado um teste adicional que consistiu em suspender a biomassa, obtida após os dez dias de tratamento, no solvente metanol. Isso com o objetivo de descartar a presença de corante retido no micélio e bioacumulação do corante (Máximo et al., 2003). Na Figura 5.19 pode-se observar que, embora a biomassa mudasse um pouco sua cor inicial adquirindo uma tonalidade mais rosa, o micélio não reteve o corante Vermelho 357 após o tratamento.

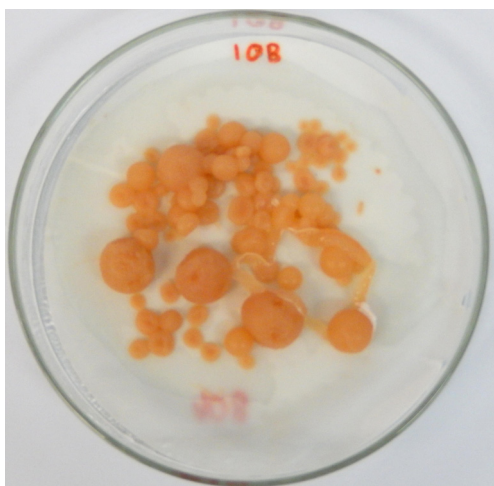


Figura 5.19. Biomassa do isolado *Trametes* sp. SC10 após teste com metanol

Assim, os resultados qualitativos mostraram como o mecanismo de bioadsorção também esteve envolvido no processo de remoção do corante pelo isolado *Trametes* sp. SC10, e explica porque a descoloração começou antes da produção da enzima lacase. Vários autores já reportaram a capacidade de bioadsorção de corantes industriais por espécies do gênero *Trametes*: *T. versicolor* (Aksu; Karabayır, 2008; Baccar et al., 2011; Bayramoğlu; Arica, 2007) e *T. Trogii* (Park et al., 2007; Yesilada et al., 2002).

Este trabalho se focou na análise do mecanismo de biodegradação enzimática mostrado pelo isolado *Trametes* sp. SC10 e analisou qualitativamente o mecanismo de bioadsorção. No entanto, sabendo que esse mecanismo também participou da descoloração, é necessário quantificar a remoção associada e estudar rigorosamente outros parâmetros como as cinéticas de descoloração e isotermas de adsorção.

5.4. Planejamento experimental para otimização das variáveis de operação

Foi realizado um planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (CCD) e a partir dos resultados foi aplicada a metodologia de Superfície de Resposta (RSM), objetivando otimizar as condições de operação envolvidas no processo de descoloração do corante AR357.

5.4.1. Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional

Para realizar o planejamento de experimentos, foram avaliados os mesmos fatores estudados nos experimentos em meio líquido, mostrados na seção anterior (agitação, temperatura, pH e concentração inicial de corante). Os níveis inferior e superior das variáveis foram definidos a partir dos resultados que mostraram boa produção de biomassa e/ou remoção de corante. No caso da concentração de corante, foi selecionada a faixa de 100 a 300 mgL⁻¹, na qual obtiveram-se as maiores porcentagens de remoção conforme apresentado na Seção 5.3 (Fig. 5.10). Para o pH encontrou-se que a melhor descoloração esteve entre 4,0 e 7,0, e que o pH alcalino não afetou a remoção (Fig. 5.11). No entanto, a pH 3,0 houve crescimento de micélio. Na literatura, alguns autores relataram que um pH ácido melhorou o rendimento de descoloração em *Trametes* sp. Nozaki et al. (2008), por exemplo, estudaram a descoloração de 27 corantes, usando 21 espécies de basidiomicetos, entre eles *T. versicolor*. Os autores observaram que o pH ótimo para a descoloração foi de 3,0 a 5,0. Assim, para confirmar os resultados encontrados na seção anterior, foi incluído um pH ácido no planejamento e, portanto, a faixa de pH analisada esteve entre 3,0 e 6,0. No caso da agitação, os melhores resultados de descoloração foram alcançados entre 150 e 200 rpm. Embora entre 0 e 150 rpm não houvesse uma boa remoção do corante, houve uma boa produção de biomassa (Fig. 5.12 e 5.13). Na literatura encontram-se relatos contraditórios sobre esta variável, tendo autores que indicam que a agitação diminui a descoloração (Ali, 2010). Portanto, sabendo que a biodegradação enzimática não foi o único mecanismo envolvido na descoloração foi analisada a faixa de agitação entre 0 e 300 rpm.

Para a temperatura, escolheu-se a faixa onde houve remoção e produção de biomassa (25 a 35°C). A variável resposta foi a remoção de corante, definida como descoloração, Desc. (%). Na Tabela 5.1 são apresentados os resultados obtidos para a variável resposta nos 28 experimentos realizados, definidos a partir do planejamento CCD, com os fatores e níveis definidos na seção de materiais e métodos (Tab. 4.8 e 4.9).

Tabela 5.1. Resultados de descoloração pelo isolado *Trametes* sp. SC10 observados para os experimentos do planejamento experimental CCD

Exp.	pH	T (°C)	Agt. (rpm)	[C] (mgL ⁻¹)	Desc. (%)	Des.
1	3,75	27,5	50	150	12,43	0,83
2	3,75	27,5	50	250	6,92	1,13
3	3,75	27,5	150	150	86,50	0,22
4	3,75	27,5	150	250	81,50	1,14
5	3,75	32,5	50	150	9,51	0,54
6	3,75	32,5	50	250	5,80	0,24
7	3,75	32,5	150	150	83,48	0,21
8	3,75	32,5	150	250	88,28	0,53
9	5,25	27,5	50	150	10,92	0,55
10	5,25	27,5	50	250	5,85	0,39
11	5,25	27,5	150	150	95,03	0,76
12	5,25	27,5	150	250	89,88	0,78
13	5,25	32,5	50	150	4,45	0,28
14	5,25	32,5	50	250	3,75	0,81
15	5,25	32,5	150	150	87,91	0,91
16	5,25	32,5	150	250	85,55	0,20
17	3,00	30,0	100	200	43,27	1,11
18	6,00	30,0	100	200	45,34	0,56
19	4,50	25,0	100	200	86,73	1,00
20	4,50	35,0	100	200	7,37	1,02
21	4,50	30,0	0	200	0,51	0,38
22	4,50	30,0	200	200	95,72	0,19
23	4,50	30,0	100	100	61,90	0,84
24	4,50	30,0	100	300	14,11	1,14
25	4,50	30,0	100	200	46,12	0,00*
26	4,50	30,0	100	200	45,88	0,00*
27	4,50	30,0	100	200	45,38	0,00*
28	4,50	30,0	100	200	45,55	0,00*

T: Temperatura (°C), Agt.: Agitação (rpm), [C]: Concentração inicial de corante (mgL⁻¹), Desc.: Descoloração (%) e Des.: Desvio padrão. 0,00* Ponto central

Para a temperatura, escolheu-se a faixa onde houve remoção e produção de biomassa. A melhor descoloração alcançada em todos os experimentos pelo *Trametes* sp. SC10 foi $95,72 \pm 0,16\%$ em condições de operação de pH 4,5, 30°C, 200 rpm e concentração inicial de corante 200 mgL^{-1} . No entanto, esse ponto não é necessariamente o ponto ótimo de descoloração, e serve só como referência para confirmar os resultados dos experimentos iniciais ($95,88 \pm 0,61$ de descoloração, com pH 5,5, Agt. 150 rpm; T. 30°C e [C]. 200 mgL^{-1}).

Uma análise da ANOVA (análise de variância) dos dados do planejamento experimental (Tab. 5.2), considerando os parâmetros significativos com base na probabilidade do erro tipo I ($p < 0,05$), permitiu verificar pelo teste F que, em ordem de grandeza, a concentração inicial de corante, a agitação, e a temperatura foram significativos para a variável de resposta, descoloração. No entanto, o pH não foi significativo na faixa avaliada. Os efeitos quadráticos e as interações entre as variáveis também não foram significativos.

Tabela 5.2. ANOVA do Planejamento Delineamento Composto Central Rotacional

Fator	Soma de quadrados	gl	Quadrados médios	F	p-valor	Observação
(1) pH (L)	405,4	1	405,42	1,9804	0,164422	NS
pH (Q)	75,9	1	75,94	0,3709	0,544760	NS
T (L)	3570,3	1	3570,31	17,4402	0,000096	Significativo
T (Q)	13,7	1	13,73	0,0671	0,796495	NS
Agt. (L)	90933,6	1	90933,59	444,190	0,000003	Significativo
Agt. (Q)	121,7	1	121,68	0,5944	0,443704	NS
[C]	2057,4	1	2057,45	10,0502	0,002383	Significativo
[C] (Q)	7,7	1	7,70	0,0376	0,846857	NS
1L e 2L	17,8	1	17,77	0,0868	0,769281	
1L e 3L	0,5	1	0,55	0,0027	0,958957	
1L e 4L	7,0	1	7,03	0,0344	0,853551	
2L e 3L	4,9	1	4,85	0,0237	0,878175	
2L e 4L	14,4	1	14,40	0,0704	0,791709	
3L e 4L	1,4	1	1,40	0,0068	0,934316	
Erro	12487,8	13	204,72	-	-	-
Total	110006,5	27	-	-	-	-

T: Temperatura (°C), Agt.: Agitação (rpm), [C]: Concentração inicial de corante (mgL^{-1}), gl: Partição dos Graus de Liberdade, F: Teste F. p-valor: Nível de significância e NS: Não significativo.

O gráfico de Pareto mostrado na Figura 5.20, apresenta os efeitos lineares e quadráticos de cada um dos fatores sobre a remoção de corante, além das diferentes interações entre as mesmas.

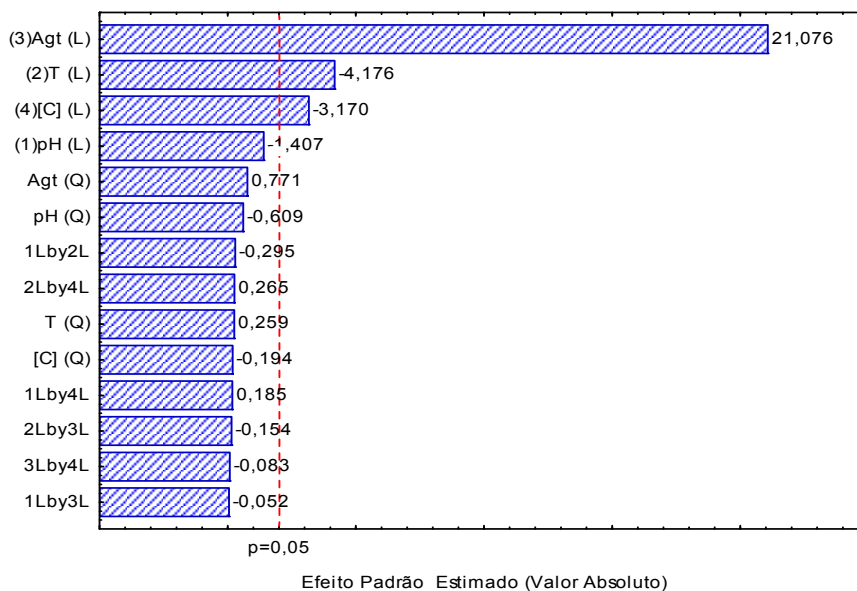


Figura 5.20. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos dos fatores estudados no CCD sobre a variável de resposta, remoção de corante

A partir do gráfico pode-se observar que a ampla diferença de grandeza entre o efeito principal da agitação quando comparada com as outras variáveis, coloca a essa variável como a condição mais significativa na descoloração. Além disso, o valor é positivo, o que indica que um aumento na rotação favorece a remoção. Esses dados confirmam os resultados da Seção 5.3.4, na qual tinha sido observado que numa faixa entre 0 e 200 rpm, o aumento da velocidade de rotação indicou uma maior remoção de corante. No caso da temperatura, o efeito também foi significativo, mas o valor negativo indicou que uma diminuição nos valores favoreceu a remoção, o que já tinha sido observado na seção 5.3.5. O menor valor de temperatura avaliado no planejamento esteve na faixa de melhor remoção de corante, quando foi analisado no experimento inicial na Seção 5.3.5 (25 - 30°C, ver Fig. 5.14). Similarmente, o efeito principal da concentração inicial de corante também foi significativo negativamente, o que indica que uma menor concentração inicial de corante, aumenta a descoloração.

Os dados confirmam os resultados da Seção 5.3.2, na qual a menor concentração (100 mgL^{-1}) deu a melhor descoloração até esta parte do experimento ($95,93 \pm 0,21\%$). Por outro lado, o efeito linear do pH não foi significativo. Esses dados diferem dos resultados iniciais, nos quais tinha sido observado que um pH alcalino não afetava a remoção de corante, mas os rendimentos de descoloração diminuía quando o pH era reduzido a uma faixa entre 2,0 a 3,0. No entanto, para o pH 4,0, houve uma boa remoção de corante ($94,10 \pm 0,96\%$). Para os dados dos resultados do planejamento experimental, a faixa avaliada esteve entre 3,0 e 6,0. Nessa faixa, o efeito do pH não teve significância estatística na descoloração porque embora em pH 3,0 não houve uma boa remoção, para valores de pH de 3,75 e 4,0, a resposta da descoloração foi alta. Entre os efeitos não significativos, o valor p do pH foi o que esteve mais perto de $p=0,05$, mas não foi suficientemente pequeno para definir uma significância estatística. Experimentos adicionais serão necessários para avaliar outras faixas de pH.

Finalmente, foi construída a equação que representa o modelo estatístico. Para um melhor ajuste do modelo, foram considerados os parâmetros não significativos para um $p > 0,15$. Os efeitos das variáveis e das interações que não foram o suficientemente pequenos, foram suprimidos da Equação 4.4. Além disso, o coeficiente de determinação e o erro relativo médio apresentados pelo modelos foram $0,873$ e $2,13 \%$, respectivamente, comprovando o ajuste satisfatório do modelo. A Equação 5.1 representa o modelo gerado no planejamento experimental para a descoloração, Desc. (%), em função dos fatores significativos. Foram usadas as variáveis codificadas (Tab. 4.10).

Equação 5.1: Modelo de descoloração, Desc. (%)

$$Desc. (\%) = 44,28 - 2,37 X_1 - 7,04 X_2 + 35,54 X_3 + 2,04 X_3^2 - 5,34 X_4$$

Sendo:

$X1$: pH

$X3$: Agitação

$X2$: Temperatura

$X4$: Concentração inicial de corante.

5.4.2. Metodologia de Superfície de Resposta aplicada à descoloração do corante Vermelho 357 com o isolado *Trametes sp. SC10*

Após a avaliação dos dados do planejamento Delineamento Composto Central Rotacional (CCD), foi usada a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) para otimizar os resultados. O objetivo foi encontrar um ponto de operação no qual, teoricamente, seria possível alcançar melhores rendimentos de descoloração, produção de biomassa e atividade enzimática lacase. Os fatores estudados foram restringidos aos três identificados como significativos no estudo anterior, sendo eles a agitação, a temperatura e a concentração inicial de corante. Para o caso do pH, que apesar de ser um dos fatores estudados não apresentou um efeito significativo na descoloração, o valor ótimo foi definido de acordo aos experimentos iniciais da Seção 5.3.3. Nesse caso a maior descoloração foi alcançada a pH na faixa de 4,0 a 5,0. Assim, para a elaboração das superfícies de resposta, o pH foi fixado em 4,5 ($\alpha=0$). Para as outras variáveis foram usados os dados experimentais reais. A seguir, é discutida a análise das superfícies de resposta:

- Agitação vs. Temperatura: a superfície de resposta entre o efeito das duas variáveis mais importantes, segundo a análise de variância do CCD, foi construída fixando a concentração inicial de corante em 100 mgL^{-1} ($\alpha=-2$), já que o efeito da concentração inicial de corante foi negativamente significativa. A melhor descoloração foi alcançada na máxima velocidade de agitação (200 rpm) (Fig. 5.21). Esse é o ponto da menor temperatura avaliada nos experimentos, confirmando os dados da ANOVA do planejamento experimental e os resultados da Seção 5.3. Também pode-se observar que a medida que diminuiu a agitação, a descoloração de corante foi menor. O efeito oposto é observado na temperatura. Fixando um valor de agitação, pode-se observar que quando aumentou a temperatura, diminuiu a remoção de corante. Por outro lado, a figura mostra que os perfis são lineares, confirmando que os efeitos quadráticos das variáveis não foram significativos.

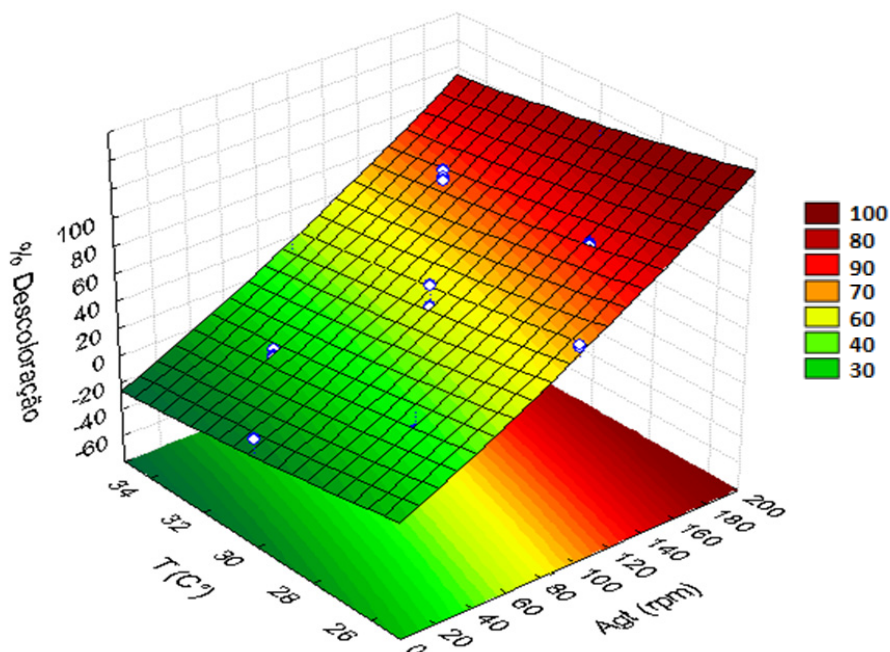


Figura 5. 21. Superfície de resposta do efeito da Agt.e da T na resposta Desc. (%) com concentração inicial de corante fixa no nível (- α) e pH fixo no nível (0), no tratamento do corante Vermelho 357 com o isolado *Trametes* sp. SC10

- Agitação vs. Concentração inicial de corante: como a concentração inicial de corante também foi significativa na descoloração, foi construída a superfície de resposta dos efeitos dos fatores agitação e concentração inicial de corante. O parâmetro temperatura foi fixado no menor nível estudado (- α) para que ao ser mantida no nível mais baixo, favorecesse a descoloração. Na Figura 5.21 pode-se observar que a melhor remoção de corante obteve-se no ponto Agt. 200 rpm e [C] 100 mgL⁻¹. Por outro lado, verificou-se que não houve curvatura nos pontos de máxima descoloração para os dois fatores estudados na superfície de resposta. Como já tinha sido indicado no gráfico de Pareto (Fig. 5.20), os fatores quadráticos destas duas variáveis não foram significativos. Ao serem perfis lineares, pode-se notar facilmente, através da Figura 5.22, que tanto uma diminuição da agitação quanto um aumento da concentração inicial de corante, afetaram gradualmente a variável resposta, atingindo menos remoção de corante.

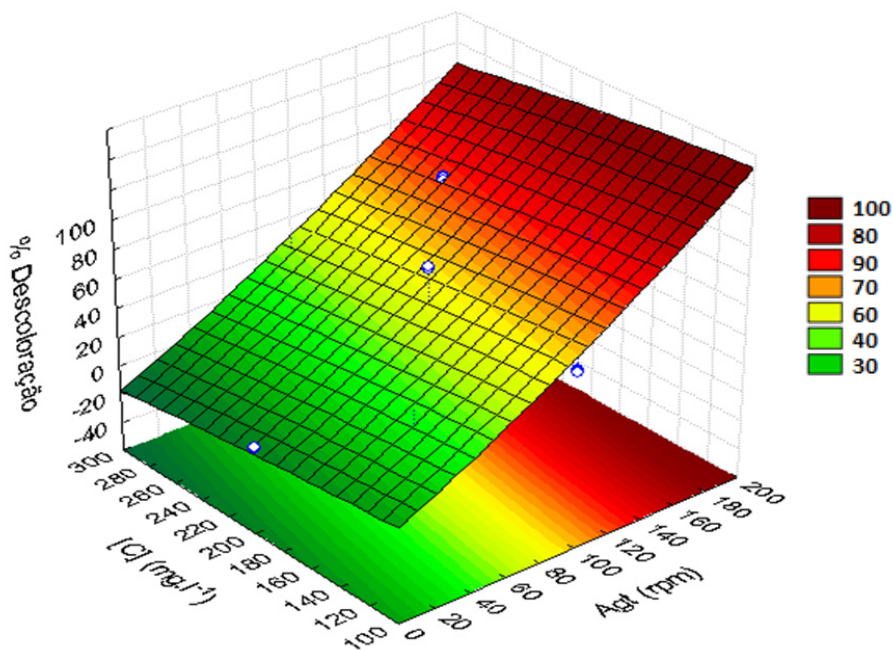


Figura 5.22. Superfície de resposta do efeito da Agt. e da [C] na resposta Desc. (%) com temperatura no nível (- α) e pH fixo no nível (0), no tratamento do corante Vermelho 357 com o Isolado *Trametes* sp. SC10

Os resultados da superfície de resposta confirmaram os dados dos experimentos realizados inicialmente para avaliar o efeito das variáveis operacionais. Como já tinha sido mencionado, a agitação aumenta a transferência de oxigênio e nutrientes, o que favorece o crescimento dos fungos. Além disso, ao ter maior disponibilidade de oxigênio, garante-se maior ação catalítica das enzimas ligninolíticas, que usam o oxigênio como cofator (Jarosz-Wilkolazka, et al., 2002; Kaushik; Malik, 2009; Žnidaršić; Pavko, 2001). Por esse motivo, a agitação foi a variável mais significativa na remoção do corante AR357 pelo isolado *Trametes* sp. SC10.

O efeito significativo negativo da concentração inicial de corante pode estar associado à toxicidade do corante azoico. Ao aumentar a concentração aumenta consequentemente a toxicidade, o que afeta o metabolismo do fungo, e diminui a capacidade de remoção do corante (Ali, 2010; Rodríguez-Couto, 2015). Por outro lado, o efeito da temperatura está associado às condições ambientais de cada fungo.

Os ecossistemas são ambientes dinâmicos, e os micro-organismos são afetados por alterações nestes parâmetros e, conseqüentemente, as suas atividades de decomposição também. O micro-organismo foi coletado no inverno (Julho de 2014), em um ecossistema que se caracteriza pelas baixas temperaturas do período. Isso poderia explicar porque uma diminuição da temperatura favorece o crescimento do micro-organismo.

A partir da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) aplicada aos resultados do planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (CCD), encontrou-se o ponto aproximado onde a remoção do corante AR357 é maximizada pelos fatores com efeito significativo no tratamento com uma cepa de *Trametes* sp. SC10: agitação 200 rpm, temperatura 25°C e concentração inicial de corante 100 mgL⁻¹. O pH não foi significativo e o valor ideal foi definido em 4,5, a partir dos experimentos iniciais. O valor de R² da equação de regressão do modelo mostrou um bom ajuste aos dados experimentais (0,873).

5.4.3. Estudos de descoloração com as variáveis otimizadas

Foi estudada a descoloração do corante Vermelho 357 com o isolado *Trametes* sp. SC10, usando o ponto de descoloração ótimo obtido da aplicação da metodologia de Superfície de Resposta (RSM), que teoricamente daria melhores valores de descoloração. Os experimentos de cinética de descoloração e de medição de atividade lacase realizados na Seção 5.3, foram repetidos nas condições de operação otimizadas (agitação 200 rpm, temperatura 25°C, concentração inicial de corante 100 mgL⁻¹ e pH 4,5).

Na Figura 5.23 pode-se observar que, embora a descoloração fosse praticamente igual, o comportamento de remoção de corante e da atividade enzimática foi muito diferente para as condições com e sem otimização. Para as condições otimizadas, o isolado *Trametes* sp. SC10 atingiu 96,58 ± 0,61% de descoloração e superou por pouco a quantidade de remoção de cor conseguida nas condições não ideais (150 rpm, 30°C, pH 5,5 e concentração inicial de corante de 200 mgL⁻¹), nas quais atingiu-se 95,49 ± 0,62% de descoloração em 10 dias de tratameto.

No entanto, nas condições de operação otimizadas, *Trametes* sp. SC10 alcançou esse valor em menos tempo, obtendo $95,33 \pm 1,28\%$ em 8 dias de tratamento. Além disso, pode ser observado que a descoloração começou em menos tempo de incubação. Enquanto que para as condições iniciais o isolado começou mostrar remoção às 72 h de tratamento, nas condições otimizadas já tinha sido removido $27,02 \pm 3,31\%$ do corante em 72 horas de operação. Essa capacidade de remoção inicial pode ser atribuída ao mecanismo de bioissorção, já que o fungo cresceu mais rapidamente nas condições ótimas, aumentando a quantidade de bioissorvente (avaliação qualitativa).

Por outro lado, na Figura 5.23 pode-se observar que a enzima lacase comportou-se diferente nas condições otimizadas, começando a produção às 72 h, enquanto que para as condições não ideais só evidenciou-se atividade lacase às 120 h de tratamento. No tratamento com as condições ótimas de operação observou-se o pico de atividade enzimática entre as 120 e 144 h, similar às condições iniciais. Contudo, o valor máximo de atividade lacase foi maior nas condições otimizadas ($2280,70 \pm 62,94$ a $2549,63 \pm 61,49$ UL⁻¹).

Similar ao experimento com as condições iniciais, a descoloração também esteve associada à atividade enzimática no estudo com as condições otimizadas, atingindo-se a máxima remoção no pico de atividade enzimática (120 – 144 h).

O ponto ótimo avaliado reduziu o tempo de operação e aumentou a quantidade de corante removido durante o tratamento. Essas condições de operação garantiram uma maior produção de biomassa e uma maior atividade enzimática lacase, melhorando os parâmetros dos mecanismos usados pelo isolado *Trametes* sp. SC10 na descoloração do corante Vermelho 357, entre eles bioissorção e biodegradação enzimática.

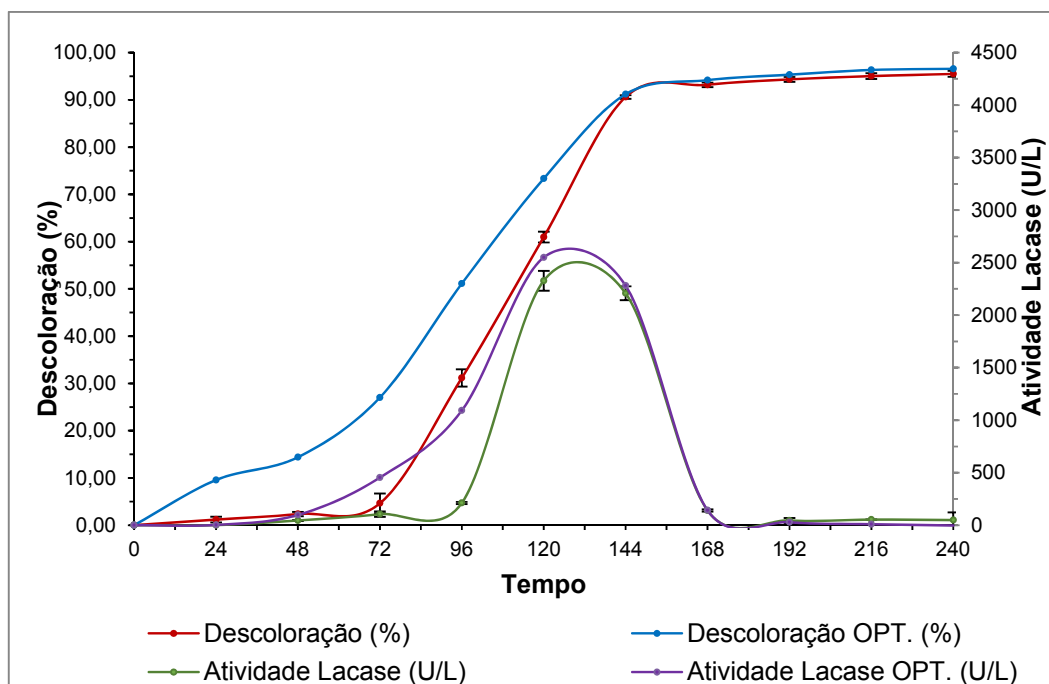


Figura 5.23. Comparação da relação entre descoloração e a atividade da enzima lacase pelo isolado *Trametes* sp. SC10 durante uma cinética de descoloração do corante Vermelho 357 para condições de operação com e sem otimizar

5.5. Identificação molecular do isolado *Trametes* sp. SC10

Os excelentes resultados de remoção do corante Vermelho 357 e os notáveis níveis de atividade da enzima lacase, fizeram do isolado *Trametes* sp. SC10 um bom candidato para o tratamento de corantes da indústria de couro.

Portanto, uma identificação molecular foi necessária para conhecer a espécie do micro-organismo. A identificação esteve baseada no uso dos *pimers* específicos ITS5 e ITS4

Foi extraído o DNA genômico a partir do micélio vegetativo de duas cepas puras do isolado *Trametes* sp. SC10. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C e a qualidade do DNA extraído foi analisada em géis de agarose 1% (p/v). A revelação foi realizada no fotodocumentador Syngene (Cambridge, UK) usando luz UV. Os resultados mostraram que o DNA foi extraído satisfatoriamente (Fig. 5.24).

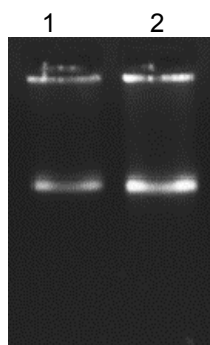


Figura 5.24. Os poços 1 e 2 contêm o DNA genômico extraído de dois isolados de *Trametes* sp. SC10. Visualização em gel de agarose 1,5% (p/v) com buffer TAE 1X (0.1 M Tris, 0.09M ácido bórico, 1mM EDTA) a 7,5 V por 180 min

Uma vez extraído o DNA genômico, foi realizada a PCR para amplificar as regiões de interesse utilizando os *primers* específicos ITS5 e ITS4 [(5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') e (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')]. Os produtos de PCR foram migrados em géis de agarose a 1,5% (p/v) em 1X TAE a 7,5 V cm⁻¹ por 180min. Os géis foram corados com GelRed ® para visualização com luz UV e o marcador de tamanho molecular 1Kb (Invitrogen) foram usados para comparar os tamanhos das bandas usando o software UVI Mw Start Gel ® 11. Condições electroforese: 3µL de produto de PCR + 1µL de tampão de corrida + 1µL de GelRed ® (diluído 1:500). Os resultados da amplificação foram satisfatórios, conseguindo bandas únicas de aproximadamente 500 pb, quando comparadas com o marcador de peso molecular e o controle negativo (Fig. 5.25).

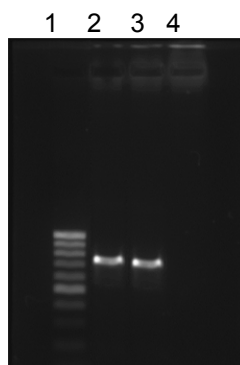


Figura 5.25. Resultados dos segmentos amplificados. Os poços 2 e 4 contêm os segmentos amplificados a partir do DNA extraído de dois isolados de *Trametes* sp. SC10. O poço 1 contém o marcador de peso molecular e o poço 4 tem o controle negativo. Visualização em gel de agarose 1,5% (p/v) com buffer TAE 1X a 7,5 V por 180 min

Os segmentos amplificados foram sequenciadas pelo Centro de Biotecnologia ACTGene. O programa Chromas Pro v1.74 foi usado para editar as sequências, que depois foram comparadas na base de dados do NCBI no GenBank®, usando o algoritmo BLAST®. A comparação com a cepa tipo de *Trametes villosa* CBS334.49, permitiu identificar ao isolado *Trametes* sp. S10 como *Trametes villosa*, com uma identidade de 99%. A sequência de *Trametes villosa* SC10 foi depositada no GenBank®, como *Trametes* KP872699, código KP872699.

6. CONCLUSÕES

As principais conclusões tiradas a partir dos resultados deste trabalho são:

- A partir da coleta realizada no município de Santa Cruz do Sul foram isoladas e avaliadas várias espécies de basidiomicetos que degradaram diferentes substratos para enzimas ligninolíticas em meio sólido, entre eles o isolado *Trametes* sp. SC10. A padronização deste método foi importante, já que se trata de uma metodologia rápida, econômica e simples, que permitirá realizar novas coletas visando encontrar cepas com altos rendimentos de descoloração, entre outras aplicações biotecnológicas;

- O isolado SC10, que se destacou na produção de enzimas ligninolíticas na triagem inicial, demonstrou também seu potencial de degradar quatro corantes em meio sólido, o que confirmou a hipótese de que as enzimas ligninolíticas também teriam a capacidade de descolorir corantes para couro;

- Na triagem em meio líquido, *Trametes* sp. SC10 apresentou melhores resultados de descoloração do que em meio sólido, atingindo $96,07 \pm 0,56\%$, $90,96 \pm 0,49\%$, $83,90 \pm 0,57\%$ e $95,88 \pm 0,61\%$ de remoção dos corantes Azul 161, Marrom 414, Preto 210 e Vermelho 357, respectivamente, em 240 horas de tratamento (10 dias). Esses valores demonstram o potencial da cepa para o tratamento de corantes para couro em solução aquosa. O isolado apresentou melhores rendimentos do que muitos outros micro-organismos citados na literatura, ressaltando que foi usado o fungo *in vivo* sem adição de indutores nem cofatores;

- Os métodos analíticos de avaliação da atividade enzimática, da produção de biomassa, do consumo de glicose e da remoção de corante, permitiram concluir que a descoloração esteve associada à alta atividade da enzima lacase ($2327,4 \pm 144,0 \text{ UL}^{-1}$). No entanto, também se observou que o mecanismo de biossorção esteve associado à remoção no início do tratamento;

- Os estudos monovariáveis para avaliar o efeito de diferentes condições operacionais demonstraram que os melhores rendimentos de descoloração obtiveram-se com maior agitação, numa faixa entre 150 e 200 rpm, com menor

concentração de corante, 100 a 300 mgL⁻¹, e na faixa de temperatura entre 25 e 30C°. O pH ideal esteve entre os valores de 4,5 e 5,5, sendo que, um pH alcalino não influenciou nos rendimentos de descoloração. Esses valores estiveram de acordo com a literatura;

- O uso de um planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (CCD) e a aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), confirmou os efeitos significativos da temperatura, da agitação e da concentração inicial de corante sobre a descoloração. Contudo, o efeito do pH não foi significativo. A aplicação do ponto ótimo obtido da RSM (25°C, 100 mgL⁻¹ de corante, pH 4,5 e 200 rpm) melhorou consideravelmente os rendimentos de descoloração, permitindo atingir 96,58 ± 0,61% de remoção de corante e 2549,63 ± 61,49 UL⁻¹ de atividade lacase, em menos tempo (8 dias);

- O isolado SC10 foi identificado por meio de uma análise molecular da região ITS1-5.8S-ITS2 como *Trametes villosa*, com 99% de identidade;

- O isolado nativo *T. villosa* SC10 é considerado um bom candidato para o tratamento de águas residuais poluídas com banhos de tingimento do couro.

TRABALHOS FUTUROS

Os resultados promissores atingidos neste trabalho, ainda em fase inicial, abrem a porta para muitas possibilidades de pesquisa, entre as que se destacam:

- Avaliar o efeito de cofatores e indutores nos rendimentos de remoção de corante de *Trametes villosa* SC10; extrair e caracterizar as enzimas ligninolíticas produzidas por *T. villosa* SC10, avaliar a capacidade de *T. villosa* de descolorir outros corantes industriais, incluindo misturas dos mesmo; estudar o potencial para degradar outros compostos xenobióticos como metais pesados e surfactantes, capacidade que já foi relatada por outros pesquisadores; realizar novas coletas de micro-organismos para encontrar cepas com rendimentos de descoloração iguais ou melhores às de *T. villosa* SC10; avaliar o tratamento de efluentes de tingimento de curtume, sintéticos e reais, em diferentes escalas de operação, entre outras.

7. REFERÊNCIAS

- ABADULLA, E. *et al.* Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3357–3362, 2000.
- ABQTIC. **The Brazilian Leather Guide**. 21. Chemists, Association of Leather Technicians and Chemist, 2014. p. 259–279
- ADLER, E. Lignin chemistry - past, present and future. **Wood Science and Technology**, v. 11, n. 3, p. 169–218, 1977.
- AGUSTINE, C. **Isolamento microbiano na biodegradação de resíduos de curtumes**. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.
- AKAR, T.; DIVRIKLIOGLU, M. Biosorption applications of modified fungal biomass for decolorization of Reactive Red 2 contaminated solutions: Batch and dynamic flow mode studies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7271–7277, 2010.
- AKHTAR, M. *et al.* Biomechanical pulping: a mill-scale evaluation. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 28, n. 3-4, p. 241–252, fev. 2000.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 997–1026, 2005.
- AKSU, Z. *et al.* Inhibitory effects of chromium(VI) and Remazol Black B on chromium(VI) and dyestuff removals by *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1167–1174, abr. 2007.
- AKSU, Z.; BALIBEK, E. Effect of nutritional conditions on dye removal from textile effluent by *Aspergillus lentulus*. **Journal of Environmental Management**, v. 91, n. 7, p. 1546–1555, 2010.
- AKSU, Z.; KARABAYIR, G. Comparison of biosorption properties of different kinds of fungi for the removal of Gryfalan Black RL metal-complex dye. **Bioresource technology**, v. 99, n. 16, p. 7730–7741, 2008.
- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes: A Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 213, n. 1-4, p. 251–273, 2010.
- ANASTASI, A. *et al.* Bioremediation potential of basidiomycetes isolated from compost. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6626–6630, set. 2008.
- ANASTASI, A. *et al.* Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3067–3075, 2010.
- ANASTASI, A. *et al.* Decolourisation and detoxification in the fungal treatment of textile wastewaters from dyeing processes. **New Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 38–45, 2011.
- ANASTASI, A. *et al.* Integrated fungal biomass and activated sludge treatment for textile wastewaters bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 106–111, 2012.

- ANDRIOLI, E. **Depilação enzimática-oxidativa de peles para curtimento**. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.
- ANDRIOLI, E.; GUTTERRES, M. Emprego de tanino vegetal no tratamento de águas. **Saneamento Ambiental**, v. 119, p. 29–33, 2006.
- AQUIM, P.; GUTTERRES, M.; TRIERWEILER, J. Assessment of water management in tanneries. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 94, n. 6, p. 253–257, 2010.
- ARORA, D. .; GILL, P. . Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7-8, p. 602–605, maio 2001.
- ARORA, D.; SHARMA, R. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1760–88, mar. 2010.
- ASGHER, M.; AZIM, N.; BHATTI, H. N. Decolorization of practical textile industry effluents by white rot fungus *Coriolus versicolor* IBL-04. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, n. 1, p. 61–65, 2009.
- BACCAR, R. *et al.* Decolorization of a tannery dye: From fungal screening to bioreactor application. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 184–189, out. 2011.
- BARR, D.; AUST, S. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 2, p. 78A–87A, 1 fev. 1994.
- BARRASA, J. M. *et al.* Wood and humus decay strategies by white-rot basidiomycetes correlate with two different dye decolorization and enzyme secretion patterns on agar plates. **Fungal Genetics and Biology : FG & B**, v. 72, p. 106–14, nov. 2014.
- BASTO, C. *et al.* Stability and decolourization ability of *Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 3, p. 355–362, mar. 2007.
- BAYRAMOĞLU, G.; ARICA, M. Y. Biosorption of benzidine based textile dyes “Direct Blue 1 and Direct Red 128” using native and heat-treated biomass of *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, n. 1, p. 135–143, 2007.
- BEAUDETTE, L. A. *et al.* Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2020–2025, 1998.
- BENCKE, C.; SOARES, J. Estudo fitossociológico da vegetação arbórea de uma área de floresta estacional em Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. **Caderno de Pesquisa : Série Botânica**, v. 10, n. 1, p. 37–57, 1998.
- BETTS, W. B. *et al.* Biosynthesis and structure of lignocellulose. In: BETTS, W. B. **Biodegradation: Natural and Synthetic Materials**. Springer Series in Applied Biology. London: Springer London, 1991. p. 139–155.
- BEZALEL, L. *et al.* Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2554–2559, 1 jul. 1996.

- BLANCHETTE, R. A. Degradation of the lignocellulose complex in wood. **Biological Transformation of Wood by Microorganisms**, v. 73, n. S1, p. 999–1010, 31 dez. 1995.
- BLANCHETTE, R. A. *et al.* Wood-destroying roft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1328–1335, 8 mar. 2004.
- BLÁNQUEZ, P. *et al.* The effect of HRT on the decolourisation of the Grey Lanaset G textile dye by *Trametes versicolor*. **Chemical Engineering Journal**, v. 126, n. 2–3, p. 163–169, 15 fev. 2007.
- BLÁNQUEZ, P.; SARRÀ, M.; VICENT, T. Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 1–7, jan. 2008.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–46, 28 jan. 2003.
- BOGAN, B.; LAMAR, R.; HAMMEL, K. Fluorene Oxidation *in vivo* by *Phanerochaete chrysosporium* and *in vitro* during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1788–1792, 1 maio 1996.
- BÖTTCHER, U. F.; TROJANOWSKI, J.; HÜTTERMANN, A. New form of lignolytically active mycelium generated by immobilization of protoplasts isolated from the white rot fungi *Heterobasidion annosum* and *Polyporus pinsitus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 380–386, 1988.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S. Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces. **The Annals of Mathematical Statistics**, p. 195–241, 1957.
- BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 13, n. 1, p. 1–45, 1951.
- BOYLE, C. D.; KROPP, B. R.; REID, I. D. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3217–3224, 1 out. 1992.
- BRITES-ALVES, A. M.; DE PINHO, M. Ultrafiltration for colour removal of tannery dyeing wastewaters. **Desalination**, v. 130, n. 2, p. 147–154, nov. 2000.
- BUMPUS, J. *et al.* Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. **Science**, v. 228, n. 4706, p. 1434–1436, 21 jun. 1985.
- BUMPUS, J. A. Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 154–158, jan. 1989.
- BUMPUS, J. A. Biodegradation of Azo Dyes by Fungi. In: ARORA, D. (Ed.). **Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications**. 1. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2003. p. 457–469.
- BUMPUS, J.; AUST, S. Biodegradation of DDT [1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 2001–2008, 1987.
- CHAGAS, E. P.; DURRANT, L. R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 8-9, p. 473–477, nov. 2001.

CHIVUKULA, M.; SPADARO, J. T.; RENGANATHAN, V. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. **Biochemistry**, v. 34, n. 23, p. 7765–7772, 1995.

CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation—the prospects for practical applications. **Environment International**, v. 36, n. 3, p. 299–307, 2010.

CHRISTIE, R. M. **Colour chemistry**. 1. ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2001. p. 24–27

CICB. **Estudo de Competitividade do Setor de Curtumes do Brasil**. São Paulo: 2013.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 582–594, 2002.

COLLINS, P. *et al.* Oxidation of anthracene and benzo [a] pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4563–4567, 1996.

COOPER, M. Environmental developments and researches in brazilian leather sector. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 95, n. 6, p. 243–249, 2011.

COVINGTON, A. D. **Tanning chemistry: the science of leather**. Royal Society of Chemistry, 2009.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1114–1118, 1990.

DAÂSSI, D. *et al.* Decolorization of the metal textile dye Lanaset Grey G by immobilized white-rot fungi. **Journal of Environmental Management**, v. 129, p. 324–32, 15 nov. 2013.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals—an overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 159–169, 2008.

DE JONG, E. *et al.* Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. **Mycological Research**, v. 96, n. 12, p. 1098–1104, 1992.

DEAN, J. F. D.; ERIKSSON, K. E. L. Biotechnological modification of lignin structure and composition in forest trees. **Holzforschung**, v. 46, n. 2, p. 135–147, 1992.

DESJARDIN, D. E.; WOOD, M. G.; STEVENS, F. A. **California Mushrooms**. TIMBER PressINC, 2015.

DETTMER, A. Seleção, isolamento e otimização dos meios de cultivo de microorganismos produtores de enzimas para aplicação ao processamento de peles na etapa de depilação/caleiro. Tese de Doutorado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.

DETTMER, A. *et al.* Optimization of the biotechnological process for hide unhairing in substitution of toxic sulfides. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, n. 5, p. 803–810, 2012.

DIORIO, L. A. *et al.* Development of a bioreactor system for the decolorization of dyes by *Coriolus versicolor f. antarcticus*. **Chemosphere**, v. 72, n. 2, p. 150–156, 2008.

DOS SANTOS, A. B.; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2369–85, set. 2007.

EILERS, A. *et al.* Metabolism of 2, 4, 6-trinitrotoluene by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome P-450. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 75–80, 1999.

ENAYATIZAMIR, N. *et al.* Biodegradation pathway and detoxification of the diazo dye Reactive Black 5 by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10359–62, nov. 2011.

ENAYATZAMIR, K.; ALIKHANI, H. A.; RODRÍGUEZ COUTO, S. Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 1, p. 296–300, 15 maio 2009.

ERIKSSON, K. E. Lignin Biodegradation. In: HEITNER, C.; DIMMEL, D.; SCHMIDT, J. (Eds.). . **Lignin and Lignans: Advances in Chemistry**. 1. ed. Boca Ratón: CRC Press: Taylor & Francis Group, 2010. p. 629.

ERIKSSON, K. E.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components**. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 407

ESPANTALEÓN, A. *et al.* Use of activated clays in the removal of dyes and surfactants from tannery waste waters. **Applied Clay Science**, v. 24, n. 1-2, p. 105–110, nov. 2003.

ESTEVE-NÚÑEZ, A.; CABALLERO, A.; RAMOS, J. L. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 3, p. 335–352, 2001.

FAO. World statistical compendium for raw hides and skins, leather and leather footwear 1993-2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. p. 98 – 146

FAULL, J. L. Fungal degradation of explosives. In: ARORA, D. (Ed.). . **Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications**. 1. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2004. p. 471–480.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions**. 2. ed. Berlin: de Gruyter, 1989.

FONTOURA, J. Desempenho de micromicidas para preservação de peles e couros. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

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

FUCK, W. Tingimento de couro com corantes fúngicos. Tese de Doutorado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

FUCK, W.; GUTTERRES, M. Produtos químicos perigosos e de uso restrito no couro. **Tecnicouro**, v. 25, p. 108–120, 2008.

FUJITA, M.; HARADA, H. Ultrastructure and Formation of Wood Cell Wall. In: HON, D. N. S.; SHIRAIISHI, N. **Wood and Cellulosic Chemistry**. 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. p. 1–49.

FUKUDA, T. *et al.* Degradation of bisphenol a by purified laccase from *Trametes villosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, n. 3, p. 704–706, 15 jun. 2001.

GAO, D. *et al.* Competition strategies for the incubation of white rot fungi under non-sterile conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 937–944, set. 2008.

GENBANK. Genetic Sequence Database. NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>.

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

GOMI, N. *et al.* Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* Dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products. **Biodegradation**, v. 22, n. 6, p. 1239–1245, 2011.

GUTTERRES, M. Desenvolvimento Sustentável em Curtumes. **Tecnicouro**, v. 25, n. 9, p. 108–120, 2004.

GUTTERRES, M. *et al.* Reduction of water demand and treatment cost in tanneries through reuse technique. **The Journal of the American Chemists Association**, v. 103, n. 4, p. 138–143, 2008.

GUTTERRES, M. *et al.* Characterization of rawwastewater from tanneries. **Journal of American Leather Chemists Association**, artigo aceito para publicação, 2015.

GUTTERRES, M.; AQUIM, P. Wastewater reuse focused on industrial applications. In: SHARMA, S. K.; SANGHI, R. **Wastewater Reuse and Management**. Dordrecht: Springer, 2013. p. 127–164.

HAMMEL, K. . Quality and Decomposition. (Eds.: Cadisch,G. y Giler,K.E.), CAB International,. In: CADISCH, G.; GILER, K. . (Eds.). . **Plant Litter Quality and Decomposition**. 1. ed. London: CAB International, 1997. p. 33–45.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 125–135, 1994.

HATAKKA, A. Biodegradation of Lignin. In: **Biopolymers Online**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. p. 129–145.

HATTORI, T.; SHIMADA, M. Microbial, Enzymatic, and Biomimetic Degradation of Lignin in Relation to Bioremediation. In: HON, DAVID N SHIRAIISHI, N. (Ed.). . **Wood and Cellulosic Chemistry**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. p. 547–571.

HEIDERMAN, E. **Fundamentals of leather manufacture**. Eduard Roether KG, 1993.

HEINFLING, A. *et al.* Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2788–2793, 11 ago. 1998.

HEINFLING, A.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 261–266, 1997.

HEINZKILL, M. *et al.* Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1601–1606, 1 maio 1998.

HERNÁNDEZ-LUNA, C. E.; GUTIÉRREZ-SOTO, G.; SALCEDO-MARTÍNEZ, S. M. Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 465–473, 2008.

HIGUCHI, T. **Biochemistry and Molecular Biology of Wood**. 1. ed. London: Springer-Verlag, 1997. p. 362

HOOD, I. A. The mycology of the Basidiomycetes. In: POTTER, K.; RIMBAWANTO, A.; BEADLE, C. (Eds.). **Heart rot and root rot in tropical Acacia plantations**. Canberra: ACIAR, 2006. v. 124p. 34.

HUNGER, K. **Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications**. Freiburg: Wiley, 2003. p. 1–12

HÜTTERMANN, A. *et al.* Enzymatic modification of lignin for technical use: strategies and results. **ACS symposium series**. Oxford University Press, 1989.

JAROSZ-WILKOŁAZKA, A. *et al.* Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 566–572, abr. 2002.

JIN, L.; NICHOLAS, D. D.; KIRK, T. K. Mineralization of the methoxyl carbon of isolated lignin by brown-rot fungi under solid substrate conditions. **Wood Science and Technology**, v. 24, n. 3, p. 263–276, 1990.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. **Journal of Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 193–199, mar. 2000.

JOSHI, D.; GOLD, M. Degradation of 2, 4, 5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1779–1785, 1993.

JURINITZ, C. F.; JARENKOW, J. A. Estrutura do componente arbóreo de uma floresta estacional na Serra do Sudeste, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 4, p. 475–487, dez. 2003.

KANG, K. *et al.* Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. **Water Research**, v. 36, n. 19, p. 4907–4915, nov. 2002.

KANTH, S. *et al.* Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. **Dyes and Pigments**, v. 76, n. 2, p. 338–347, 2008.

KAPDAN, I. K. *et al.* Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5, p. 381–387, 2000.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 127–41, jan. 2009.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Effect of nutritional conditions on dye removal from textile effluent by *Aspergillus lentulus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1957–1964, 2010.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Mycoremediation of Synthetic Dyes: An Insight into the Mechanism, Process Optimization and Reactor Design. In: SINGH, S. N. (Ed.). . **Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters SE - 1**. Environmental Science and Engineering. 1. ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 1–25.

KHAYET, M.; ZHRIM, A. Y.; HILAL, N. Modelling and optimization of coagulation of highly concentrated industrial grade leather dye by response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, v. 167, n. 1, p. 77–83, fev. 2011.

KIISKINEN, L. L.; RÄTTÖ, M.; KRUIUS, K. Screening for novel laccase-producing microbes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 640–6, jan. 2004.

KIRBAS, Z.; KESKIN, N.; GÜNER, A. Biodegradation of polyvinylchloride (PVC) by white rot fungi. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, n. 3, p. 335–342, 1999.

KIRK, T. K.; BURGESS, R.; KONING JR., J. Use of Fungi in Pulping Wood: An Overview of Biopulping Research. In: LEATHAM, G. (Ed.). . **Frontiers in Industrial Mycology**. Springer US, 1992. p. 99–111.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R. A.; AKHTAR, M. (Eds.). . **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. 1. ed. Atlanta: TAPPI Press, 1998. p. 273–308.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465–505, jan. 1987.

KNAPP, J. S.; NEWBY, P. S.; REECE, L. P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 7, p. 664–668, jul. 1995.

KNAPP, J.; VANTOCH-WOOD; ZHANG, F. Use of wood-rotting fungi for the decolorization of dyes and industrial effluents. In: GADD, G. . (Ed.). . **Fungi in Biorremediation**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2001. v. 23p. 242–304.

KO, K. S.; JUNG, H. S. Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, n. 3, p. 191–199, 1999.

KREISEL, H. **Clave para la identificación de los macromicetos de Cuba**. Centro de Información Científica y Técnica. Universidad de La Habana, 1971.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. **Lignocellulose biotechnology: future prospects**. IK International Pvt Ltd, 2007.

KUWAHARA, M. *et al.* Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247–250, abr. 1984.

LARKING, D. M. *et al.* Enhanced degradation of polyvinyl alcohol by *Pycnoporus cinnabarinus* after pretreatment with fenton's reagent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1798–1800, 1999.

LEVIN, L.; MELIGNANI, E.; RAMOS, A. M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4554–4563, 2010.

LI, X.; JIA, R. Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull-*Schizophyllum* sp. F17 under solid-state condition in a continuous flow packed-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 6885–6892, 2008.

LU, L. *et al.* Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1232–1239, 2007.

MA, L. *et al.* Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 1–9, jan. 2014.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 246–252, set. 2005.

MARTÍNEZ, A. T. *et al.* Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 195–204, set. 2005.

MARTÍNEZ, M. J. *et al.* Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, n. 2, p. 424–432, 1996.

MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; BRILLAS, E. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review. **Applied Catalysis : Environmental**, v. 87, n. 3-4, p. 105–145, 7 abr. 2009.

MASAPHY, S.; HENIS, Y.; LEVANON, D. Manganese-enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity. **Applied and Environmental microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3587–3593, 1996.

MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R.; MACHADO, K. M. G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 415–421, 2000.

MÁXIMO, C.; AMORIM, M. T. P.; COSTA-FERREIRA, M. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 145–151, jan. 2003.

MELLA, B. Remoção de cromo de banhos residuais de curtimento através de precipitação química e eletrocoagulação Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

MINUSSI, R.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 158–64, jan. 2007.

MORALES, M. N.; KÖHLER, A. Comunidade de Syrphidae (Diptera): diversidade e preferências florais no Cinturão Verde (Santa Cruz do Sul, RS, Brasil). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 1, p. 41–49, 2008.

MOREIRA, M.; TEIXEIRA, R. Estado da arte tecnológico em processamento do couro: revisão bibliográfica no âmbito internacional. **Centro Nacional de Tecnologias Limpas**, p. 19–30, 2003.

NAZER, D. W.; AL-SA'ED, R. M.; SIEBEL, M. A. Reducing the environmental impact of the unhairing–liming process in the leather tanning industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, n. 1, p. 65–74, jan. 2006.

NERUD, F.; MIŠURCOVÁ, Z. Distribution of ligninolytic enzymes in selected white-rot fungi. **Folia Microbiologica**, v. 41, n. 3, p. 264–266, 1996.

NIEBISCH, C. H. *et al.* Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1–3, p. 316–22, 15 ago. 2010.

NILSSON, T.; DANIEL, G. Chemistry, physics and technology of wood. **Holzforschung - International Journal of the Biology**, v. 43, n. 1, p. 11–18, 1989.

NOVOTNÝ, C. *et al.* Potential of combined fungal and bacterial treatment for color removal in textile wastewater. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 879–88, jan. 2011.

NOVOTNÝ, Č. *et al.* Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1545–1551, 2004.

OSORIO-ECHAVARRÍA, J.; VIDAL BENAVIDES, A. I.; QUINTERO DÍAZ, J. C. Decolorization of textile wastewater using the white rot fungi anamorph R1 of *Bjerkandera* sp. **Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia**, n. 57, p. 85–93, 2011.

PACHECO, J. W. Curtumes. **São Paulo: CETESB**, p. 13–33, 2005.

PAICE, M. G. *et al.* Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 260–265, 1993.

PALMA, C. *et al.* Wastewater treatment for removal of recalcitrant compounds: a hybrid process for decolorization and biodegradation of dyes. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 4, p. 621–625, ago. 2011.

PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 17–24, jan. 2005.

PARK, C. *et al.* Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, n. 1, p. 59–65, ago. 2007.

PASCHOAL, F. M. M.; ANDERSON, M. A.; ZANONI, M. V. B. Simultaneous removal of chromium and leather dye from simulated tannery effluent by photoelectrochemistry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 1, p. 531–7, 15 jul. 2009.

PASTI-GRIGSBY, M. B. *et al.* Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3605–3613, 1992.

PAZARBASI, M. B. *et al.* Decolorization of various leather dyes and leather industry effluent by *Trametes trogii* TEM H2. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 21, p. 1410–1416, 2012.

PAZARLIOGLU, N. K.; UREK, R. O.; ERGUN, F. Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1923–1929, abr. 2005.

PICCIN, J. S. *et al.* Kinetics and isotherms of leather dye adsorption by tannery solid waste. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 30–38, fev. 2012.

PICCIN, J. S. Resíduo sólido da indústria coureira como adsorventes alternativos de corantes. Tese de Doutorado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

PRATO-GARCIA, D.; CERVANTES, F. J.; BUITRÓN, G. Azo dye decolorization assisted by chemical and biogenic sulfide. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250-251, p. 462–468, 15 abr. 2013.

PREETHI, V. *et al.* Ozonation of tannery effluent for removal of cod and color. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 1, p. 150–4, 15 jul. 2009.

PUBCHEM. Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

PÜNTENER, A. Leather Dyes. In: FREEMAN, H. S.; PETERS, A. T. (Eds.). **Colorants for Non-Textile Applications**. [s.l.] Elsevier Science, 2000. p. 478–484.

QUADROS, A. V. Avaliação da remoção de matéria orgânica carbonácea em filtros anaeróbiostratando lixiviado de resíduos sólidos urbanos. Dissertação de Mestrado, UNISINOS, RS, Brasil,

2009.RALPH, J. *et al.* Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1-2, p. 29–60, 2004.

RALPH, J.; BRUNOW, G.; BOERJAN, W. Lignins. In: **eLS**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2001.

RECK, M. A.; DA SILVEIRA, R. M. B. Ordem Polyporales (Basidiomycota) no Parque Estadual de Itapuã, Viçosa, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 301–314, 2008.

REDDY, C. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 320–328, 1995.

REDDY, C.; MATHEW, Z. **Bioremediation potential of white rot fungi** British Mycological Society Symposium Series. **Anais...**2001

RODRIGUEZ, A. *et al.* Degradation of natural lignins and lignocellulosic substrates by soil-inhabiting fungi imperfecti. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 21, n. 3, p. 213–219, 1996.

RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 27–32, 1999.

RODRIGUEZ-COUTO, S. *et al.* Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorization of dyes from a leather factory. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 3, p. 233–238, 2004.

RODRIGUEZ-COUTO, S. Treatment of textile wastewater by white-rot fungi: still a far away reality. **Textiles and Light Industrial Science and Technology (TLIST)**, v. 2, p. 113–119, 2013.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Dye removal by immobilised fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 227–35, jan. 2009.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Degradation of Azo Dyes by White-Rot Fungi. In: SINGH, S. N. (Ed.). **Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters SE - 14**. Environmental Science and Engineering. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 315–331.

RODRÍGUEZ-COUTO, S.; ROSALES, E.; SANROMÁN, M. A. Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors. **Chemosphere**, v. 62, n. 9, p. 1558–1563, 2006.

ROMERO, S. *et al.* Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, n. 1, p. 42–47, 2006.

ROSALES, E.; PAZOS, M.; SANROMÁN, M. A. Comparative efficiencies of the decolourisation of leather dyes by enzymatic and electrochemical treatments. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p. 312–317, set. 2011.

SANGEETA, P.; KHERIA, S.; PAKSHIRAJAN, K. Biodecolourization of real textile industry wastewater using the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 70, p. 982–986, 2011.

SARATALE, R. G. *et al.* Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 138–157, jan. 2011.

SAROJ, S. *et al.* Biodegradation of azo dyes acid red 183, direct blue 15 and direct red 75 by the isolate *Penicillium oxalicum* SAR-3. **Chemosphere**, v. 107, p. 240–8, jul. 2014.

SCARAFFUNI, C. Adsorção aplicada ao tratamento de efluentes de tingimento de couro. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

SELVAKUMAR, S.; MANIVASAGAN, R.; CHINNAPPAN, K. Biodegradation and decolourization of textile dye wastewater using *Ganoderma lucidum*. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 71–79, 2013.

SELVI, A. *et al.* Studies on the application of natural dye extract from *Bixa orellana* seeds for dyeing and finishing of leather. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 84–86, maio 2013.

SENTHILKUMAR, S.; PERUMALSAMY, M.; H., J. P. Decolourization potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing amido black 10B. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 845–853, out. 2014.

SHARMA, P.; SINGH, L.; DILBAGHI, N. Response surface methodological approach for the decolorization of simulated dye effluent using *Aspergillus fumigatus fresenius*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2-3, p. 1081–6, 30 jan. 2009.

SHIN, K.-S.; KIM, C.-J. Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 6, p. 569–572, 1998.

SINGH, S.; PAKSHIRAJAN, K. Enzyme activities and decolourization of single and mixed azo dyes by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 2, p. 146–150, mar. 2010.

SOUZA, F. Aplicação de enzimas no processamento de couros: Comparação entre processos químicos e coenzimáticos. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2397–2401, 1992.

SRINIVASAN, S. V. *et al.* Decolourisation of leather dye by ozonation. **Desalination**, v. 235, n. 1-3, p. 88–92, jan. 2009.

SUKUMAR, M.; SIVASAMY, A.; SWAMINATHAN, G. In situ biodecolorization kinetics of Acid Red 66 in aqueous solutions by *Trametes versicolor*. **Journal of hazardous materials**, v. 167, n. 1-3, p. 660–3, 15 ago. 2009.

SUTHERLAND, J. Degradation of hydrocarbons by yeasts and filamentous fungi. In: ARORA, D. **Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications**. Mycology. 1. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2004. p. 446–455.

SVOBODOVÁ, K. *et al.* Mechanism of Reactive Orange 16 degradation with the white rot fungus *Irpex lacteus*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 1279–1284, 2007.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 130–137, fev. 1999a.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. . Effects of glucose and NH₄⁺ concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 278–284, ago. 1999b.

TAN, C. *et al.* Biosorption of basic orange using dried *A. filiculoides*. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 10, p. 1333–1340, 2010.

TASKIN, M.; ERDAL, S. Reactive dye bioaccumulation by fungus *Aspergillus niger* isolated from the effluent of sugar fabric-contaminated soil. **Toxicology and industrial health**, v. 26, n. 4, p. 239–247, 2010.

TIEN, M.; KIRK, T. Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. **Science (New York, N.Y.)**, v. 221, n. 4611, p. 661–3, 12 ago. 1983.

TUOMELA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 169–183, abr. 2000.

UCHIDA, H. *et al.* Polymerization of bisphenol a by purified laccase from *Trametes villosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 287, n. 2, p. 355–358, 21 set. 2001.

VALLI, K.; GOLD, M. H. Degradation of 2, 4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 1, p. 345–352, 1991.

WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 5, p. 521–5, jan. 2006.

WARD, G.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C. The biodegradation Of Lignocellulose By White Rot Fungi. In: ARORA, D. (Ed.). **Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications**. Mycology. 1. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2004. p. 393–407.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23688–23695, 25 nov. 1992.

WENZEL, J. .; DE QUADROS, A. Análise biológica e geológica integrada do Cinturão Verde de Santa Cruz do Sul, RS, visando sua ampliação e preservação. **FEPAM em Revista**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2012.

WESENBERG, D. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 1-2, p. 161–187, dez. 2003.

WHITE, T. . *et al.* **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal**. [s.l.] eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York, 1990. p. Pp. 315–322

WOLTER, M. *et al.* Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus* sp. Florida in solid wheat straw substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 398–404, 1997.

XIN, B. *et al.* A feasible method for growing fungal pellets in a column reactor inoculated with mycelium fragments and their application for dye bioaccumulation from aqueous solution. **Bioresource technology**, v. 105, p. 100–105, 2012.

XIN, B.; CHEN, G.; ZHENG, W. Bioaccumulation of Cu-complex reactive dye by growing pellets of *Penicillium oxalicum* and its mechanism. **Water research**, v. 44, n. 12, p. 3565–3572, 2010.

XIONG, X.-J.; MENG, X.-J.; ZHENG, T.-L. Biosorption of Cl Direct Blue 199 from aqueous solution by nonviable *Aspergillus niger*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1, p. 241–246, 2010.

YANG, X. Q. *et al.* Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1185–1189, 2009.

YAVER, D. S. *et al.* Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 834–841, 1996.

YAVER, D. S.; GOLIGHTLY, E. J. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. **Gene**, v. 181, n. 1-2, p. 95–102, nov. 1996.

YESILADA, O.; CING, S.; ASMA, D. Decolourisation of the textile dye Astrazon Red FBL by *Funalia trogii* pellets. **Bioresource Technology**, v. 81, n. 2, p. 155–157, jan. 2002.

YOUNG, L.; YU, J. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v. 31, n. 5, p. 1187–1193, maio 1997.

ZEROUAL, Y. *et al.* Biosorption of bromophenol blue from aqueous solutions by *Rhizopus stolonifer* biomass. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 177, n. 1-4, p. 135–146, 2006.

ZHAO, X.; HARDIN, I. R. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. **Dyes and Pigments**, v. 73, n. 3, p. 322–325, jan. 2007.

ZILLE, A. *et al.* Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6711–8, 1 nov. 2005.

ŽNIDARŠIĆ, P.; PAVKO, A. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 237–252, 2001.

ZOUARI-MECHICHI, H. *et al.* Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 141–148, jun. 2006.