



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Coleta, isolamento e triagem de fungos nativos para tratamento de corantes usados na indústria do couro

Autor: Alan Pereira Magalhães

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariliz Soares Gutterres

Co-Orientador: Msc. Santiago Monsalve-Ortiz

Porto Alegre, dezembro de 16

Sumário

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Equações	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Lista de Símbolos e unidades	x
1 Introdução.....	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Processo de produção do couro	3
2.2 Tingimento do couro.....	4
2.3 Corantes	5
2.3.1 Classificação de acordo com a estrutura química	5
2.3.2 Classificação de acordo com os métodos de aplicação	6
2.4 Uso de Corantes para o tingimento e efluentes	7
2.5 Tratamento de efluentes e legislação ambiental.....	8
2.6 Fungos de podridão branca e biodegradação da lignina	9
2.7 Fungos de podridão branca e tratamento de corantes: mecanismos envolvidos.....	10
2.8 Estado da arte da biodescoloração e biodegradação de corantes por fungos de podridão branca.....	10
2.9 Os WRF no tratamento de corantes para o couro e efluentes de tingimento de curtume.....	13
3 Materiais e Métodos.....	16
3.1 Reagentes.....	16
3.1.1 Compostos indicadores de atividade enzimática e corantes para couro	16
3.1.2 Meios de cultura.....	17
3.2 Micro-organismos	18
3.2.1 Coleta de fungos nativos	18
3.2.2 Isolamento de cepas fúngicas.....	19
3.2.3 Cepa de referência.....	19
3.2.4 Conservação dos micro-organismos.....	19
3.2.5 Preparação do inóculo.....	19
3.3 Triagem em meio sólido.....	20
3.3.1 Avaliação qualitativa de atividade enzimática	20
3.3.2 Avaliação do potencial de descoloração	20
3.4 Descoloração em meio líquido.....	21
3.5 Cinética de descoloração	21

3.6	Procedimentos analíticos.....	22
3.6.1	Medição da atividade enzimática.....	22
3.6.2	Medição da descoloração.....	22
3.6.3	Medição da produção de biomassa.....	23
3.7	Identificação molecular da cepa fúngica	23
4	Resultados e Discussão	24
4.1	Coleta e isolamento de fungos nativos.....	24
4.2	Triagem em meio sólido.....	26
4.2.1	Avaliação qualitativa de atividade enzimática	26
4.2.2	Avaliação do potencial de descoloração	27
4.3	Descoloração em meio líquido.....	28
4.4	Identificação molecular do isolado Trametes sp. PR01	30
4.5	Cinética de descoloração	30
4.5.1	Descoloração associada à atividade enzimática.....	30
4.5.2	Descoloração associada à biomassa produzida.....	32
5	Conclusões e Trabalhos Futuros.....	34
6	Referências.....	36
	Apêndices	41

Agradecimentos

Primeiramente, dedico esse trabalho aos meus falecidos avôs Antônio Augusto Magalhães e Paulo Mello Pereira, que Deus os tenha.

Em segundo lugar, quero agradecer as pessoas que de alguma forma se fizeram presente durante esse trabalho e que também foram fundamentais para eu ter chegado até aqui, por isso, agradeço:

A toda minha família, em especial aos meus pais Alexandre Martinez Magalhães e Ligia Iara de Paula Pereira, meu irmão Alexandre Pereira Magalhães Junior e a minha querida avó Dolores Martinez Magalhães por todo suporte e conselhos que me deram não só na minha trajetória acadêmica, mas durante toda a minha vida. Posso dizer que foram os grandes responsáveis por minha formação;

À Prof^a Mariliz pela orientação e pela oportunidade de ter realizado o trabalho de conclusão em uma das áreas que mais me identifiquei durante todo o curso;

Ao meu co-orientador Santiago Ortiz-Monsalve por todo apoio e orientação durante a execução deste trabalho, tanto na parte escrita quanto experimental;

Ao meu colega de curso Eduardo Rodrigues Poll, por ter sido meu braço direito em toda parte experimental;

A toda equipe do Laboratório de Micologia da UFRGS, em especial ao Mauricio Ramirez por ter ajudado na parte de identificação molecular;

A todos bolsistas, mestrandos e doutorandos do LACOURO, por simplesmente terem tornado o laboratório um ambiente saudável e ideal para se trabalhar;

Aos meus amigos, que de alguma forma e em algum momento fizeram a diferença, seja para conversar, sair, se divertir. Obrigado pela parceria!

Aos professores do Colégio Santa Inês, do cursinho Unificado e em especial professores da graduação da Engenharia Química da UFRGS por todo conhecimento compartilhado. Muito obrigado!

Resumo

A indústria do couro tem grande importância no cenário econômico brasileiro, pelo fato do Brasil ser um dos maiores produtores e exportadores de couro no mundo. A nível nacional, atualmente, o Rio Grande do Sul lidera o ranking dos estados que mais comercializaram couro com o mercado externo, revelando a importância desse segmento para a sociedade da região. No tingimento do couro, etapa principal do acabamento molhado, emprega-se uma grande variedade de produtos químicos, incluindo os corantes que são responsáveis por dar a cor e a tonalidade desejadas ao produto final. Os corantes são utilizados em excesso nesse processo e uma parte deles não se fixa ao couro, o que gera cargas residuais indesejáveis no efluente. Águas residuais contendo corantes, se não tratadas adequadamente, podem trazer consequências graves para o meio ambiente e saúde humana. Os tratamentos convencionais empregados, mesmo que aplicados em conjunto com tratamentos avançados, podem não conseguir remover certas substâncias recalcitrantes, além de serem opções de custo elevado e com limitações técnicas. No presente trabalho, foi avaliado o potencial de fungos de podridão branca nativos, coletados em Porto Alegre, Brasil, para descolorir corantes utilizados na etapa de tingimento do couro. Entre 15 amostras coletadas, 6 foram devidamente isoladas. Em seguida, as cepas isoladas foram avaliadas em triagem em meio sólido para produzir enzimas ligninolíticas e descolorir corantes. Na primeira triagem, 3 cepas apresentaram atividade enzimática sendo que o isolado PR01 se destacou sobre os demais, apresentando atividade enzimática para produção das enzimas lacase e peroxidases extracelulares. O isolado PR01 também demonstrou potencial para descoloração dos corantes Vermelho ácido 357, Preto ácido 210 e Azul ácido 161 em meio sólido. Em avaliação posterior, sob condições de fermentação submersa durante 8 dias a 30°C e 200 rpm, o isolado PR01 descoloriu 89,44 ± 2,78 %, 85,71 ± 1,20 %, 75,47 ± 0,74 %, 63,02 ± 0,19 %, 60,29 ± 1,34 % e 57,27 ± 1,85 % os corantes Azul ácido 161, Vermelho ácido 357, Amarelo ácido 79, Laranja ácido 142, Marrom ácido 414 e Preto ácido 210, respectivamente. Posteriormente, um novo ensaio em meio líquido foi realizado com o corante Amarelo ácido 79 para evidenciar a participação do mecanismo de biodegradação enzimática, através da ação da enzima lacase. Durante o tratamento foi evidenciada a produção dessa enzima chegando a valores máximos de 338,370 ± 8,066 UL⁻¹. Após 168 horas de tratamento se atingiu 81,75 ± 1,87 % de descoloração. O mecanismo de biodegradação foi caracterizado como o responsável por uma parte importante da descoloração; entretanto, outros mecanismos como biossorção que poderiam estar envolvidos não foram estudados. O isolado PR01, por ter apresentado bons resultados, foi identificado por análise molecular com 99 % de identidade como *Trametes villosa*. Por fim, a coleta e triagem de fungos nativos foi satisfatória, visto que foi encontrada uma cepa (*Trametes villosa* PR01) que atingiu bons resultados para descoloração de corantes utilizados no tingimento do couro.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura molecular de três corantes azoicos: (a) <i>Acid Red 2</i> ; (b) <i>Disperse Yellow 7</i> ; (c) <i>Direct Black 22</i>	6
Figura 2 - Amostras <i>in natura</i> de basidiocarpos dos fungos coletados: a) PR01; b) PR05; c) PR12; d) PR14.....	24
Figura 3 - Isolados puros após sete dias de incubação em meio MEA a 30°C: a) PR01; b) PR14.....	25
Figura 4 - Amostras após sete dias de incubação em meio MEA a 30°C que apresentaram contaminação cruzada: a) PR05; b) PR07; c) PR10.....	25
Figura 5 - Ensaio de produção de enzimas ligninolíticas: a) PR01 em MEA após 7 dias (controle); b) PR01 em meio MEA com GUA após 5 dias (vista superior); c) PR01 em MEA com ABTS após 5 dias (vista superior); d) PR01 em MEA com ABTS após 5 dias (vista inferior).....	26
Figura 6 - Controles positivos inoculados com isolado SC10 em MEA na presença de indicadores enzimáticos após 6 dias de incubação.....	27
Figura 7 - Descoloração de corantes em meio MEA, após 7 dias de incubação a 30°C. Corante AA161: a) Controle abiótico; b) PR01; c) SC10. Corante PA210: d) Controle abiótico; e) PR 01; f) SC10. Corante VA357: g) Controle abiótico; h) PR 01 e i) SC10.....	27
Figura 8 - Descoloração em meio líquido de seis corantes para couro utilizando os isolados nativos <i>Trametes</i> sp. PR01 e <i>T. villosa</i> SC10.....	28
Figura 9 - Avaliação qualitativa de remoção de cor, em ordem da esquerda para direita e de cima para baixo, pelo isolado <i>Trametes</i> sp. PR01 dos corantes: AA161, VA357, AA79, LA142, PA210 e MA414. Todas as fotos foram tiradas de amostras filtradas após 8 dias de incubação em meio MEB a 30°C e 200 rpm.	29
Figura 10 - Avaliação qualitativa de remoção de cor, em ordem da esquerda para direita e de cima para baixo, pelo isolado <i>Trametes villosa</i> SC10 dos corantes: AA161, VA357, AA79, PA210, MA414 e LA142. Todas as fotos foram tiradas de amostras filtradas após 8 dias de incubação em meio MEB a 30°C e 200 rpm.....	30
Figura 11 - Relação entre descoloração do corante AA79 e atividade da enzima lacase pelo isolado nativo <i>Trametes villosa</i> PR01. As barras indicam o desvio padrão entre três repetições.	32
Figura 12 - Comparativo diário dos espectros de absorção na região da luz visível (400 – 800nm) obtidos durante a descoloração do corante AA79 pelo isolado nativo <i>Trametes villosa</i> PR01.....	32

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Operações anteriores ao processo de tingimento do couro e suas influências ..	4
Tabela 2 - Estrutura molecular e características dos substratos indicadores de atividade enzimática.....	16
Tabela 3 - Características físico-químicas dos corantes utilizados no trabalho.....	17
Tabela 4 - Identificação qualitativa de atividade enzimática das cepas isoladas mediante reação com meio indicador.	20
Tabela 5 - Descoloração em meio líquido de seis corantes para couro utilizando os isolados nativos <i>Trametes</i> sp. PR01 e <i>T. villosa</i> SC10.....	28
Tabela 6 - Cinética de descoloração do corante AA79 e atividade enzimática da lacase utilizando o isolado nativo <i>T.villosa</i> PR01.	31
Tabela 7 - Biomassa gerada com a descoloração e atividade enzimática máxima atingidas para o tempo de 168 horas.	33

Lista de Equações

Equação 1 - Descoloração (%)	21
Equação 2 - Medida da atividade enzimática para enzima lacase (UL^{-1})	22
Equação 3 - Produção de Biomassa (gL^{-1})	23

Lista de Abreviaturas e Siglas

AA79	Corante Amarelo ácido 79
AA161	Corante Azul ácido 161
ABTS	2,2' –azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) sal diamônio
ABD	Meio comercial Ágar Batata Dextrose
CM	Cloreto de Manganês II, MnCl ₂
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONSEMA	Conselho Estadual do Meio Ambiente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GUA	Guaiacol, 2-metóxifenol
Lac	Enzima Lacase
LA142	Corante Laranja ácido 142
Lip	Enzima Lignina Peroxidase
MA414	Corante Marrom ácido 414
MEA	Meio de cultura sólido
MEB	Meio de cultura líquido
MnP	Enzima Peroxidase dependente de Manganês
PA210	Corante Preto ácido 210
PR01	Isolado <i>Trametes villosa</i> PR01
SC10	Isolado <i>Trametes villosa</i> SC10
VA357	Corante Vermelho ácido 357
WRF	Fungos de podridão branca, do inglês “ <i>White-rot fungi</i> ”

Lista de Símbolos e unidades

Símbolo	Definição	Unidade
ABS.	Absorbância, ABS_{λ}	I/I_0
AE	Atividade Enzimática	UL^{-1}
λ	Comprimento de onda	nm
λ_{max}	Comprimento de onda com maior absorbância	nm
pH	Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio numa solução	
T	Temperatura	$^{\circ}C$
t	Tempo	min; h; dia
rpm	revoluções por minuto	

1 Introdução

A indústria do couro tem crescido nos últimos anos e tem grande importância para o equilíbrio econômico brasileiro. Dados do ano de 2011 revelam que couros e peles tiveram a participação em 6,7 % da balança comercial brasileira. Dados de agosto de 2016 provenientes da Secretaria de Comércio Exterior do Ministério de Desenvolvimento, Indústria e comércio exterior, relataram que o Brasil exportou US\$178,5 milhões em couros e peles, representando um crescimento de 5,1 % em relação ao mesmo período de 2015. Além disso, o Rio Grande do Sul, estado que tem notório destaque na produção desse segmento, em 2016 lidera o ranking dos estados que mais comercializam couro junto ao mercado externo, respondendo por 21,6 % das exportações (CICB, 2016).

O tingimento do couro, considerado etapa vital na cadeia produtiva, é responsável por determinar as especificações mais requisitadas do produto final (cor, tonalidade). Esse processo é uma das etapas de acabamento molhado do couro, realizado em meio líquido que envolve grande quantidade de água (de 4 a 8 m³ por tonelada de pele transformada em couro) e faz uso de corantes orgânicos sintéticos. Em relação aos corantes, preferencialmente são empregados corantes ácidos e azoicos, devido à sua afinidade química pelo couro curtido com cromo e por promover maior uniformidade e estabilidade à cor, respectivamente. Para se garantir a cor e a tonalidade especificadas, os corantes muitas vezes são utilizados em excesso neste processo, o que acaba por gerar desperdícios e cargas indesejáveis no efluente.

Efluentes contaminados com corantes, principalmente os azoicos, quando não tratados adequadamente, podem trazer consequências graves tanto para o meio ambiente, quanto para a saúde humana. Em geral, para remoção de corantes dos efluentes de tingimento do couro, são empregados os tratamentos convencionais, como por exemplo, coagulação, floculação e decantação, em conjunto com tratamentos biológicos. Esses métodos, de certa forma, são eficientes para remoção da carga orgânica, entretanto podem ser incapazes de remover substâncias recalcitrantes como grupos azo, compostos fenólicos e etc. (GUTTERRES et al., 2015).

Diante desse problema, diversos pesquisadores se dedicaram a buscar novas tecnologias para tratar esses efluentes, como por exemplo, fazer o uso de tratamentos avançados em conjunto com o tratamento convencional, visando melhorar a qualidade

final do efluente. Entretanto, esses processos destacam-se por possuírem custo elevado e limitações técnicas. Assim, novas pesquisas de sistemas biológicos para tratamento estão ganhando importância, mediante a utilização de micro-organismos como bactérias, fungos e algas.

Os fungos de podridão branca têm sido objeto de muitas pesquisas, por serem os micro-organismos mais eficientes para degradação de corantes sintéticos (KAUSHIK; MALIK, 2009; ORTIZ-MONSALVE, 2015). O potencial de descoloração destes fungos está relacionado com a produção de enzimas ligninolíticas, responsáveis pela degradação da lignina. Entretanto, a maioria das pesquisas desenvolvidas são voltadas para o tratamento de corantes e efluentes utilizados na indústria têxtil ((Asgher; Shah; Iqbal, (2016); Deveci et al., (2016); Mahbub et al., (2015); Mota et al., (2015); Zuleta-Correa et al., (2016)). Poucos estudos são destinados à degradação de corantes para couro; entretanto Ortiz-Monsalve, (2015) através de seu trabalho, confirmou o potencial desses micro-organismos para descolorir alguns corantes para couro em grande extensão, abrindo portas para as pesquisas nesse segmento.

Levando em conta o reconhecido potencial dos fungos de podridão branca para descolorir corantes, o presente trabalho visa encontrar novas espécies desse tipo de fungo e testar sua capacidade para descolorir corantes utilizados no couro para, futuramente, representar uma alternativa de tratamento de efluentes do tingimento do couro. Para isso, serão feitas:

- Coleta e isolamento de fungos de podridão branca crescendo em árvores ou em galhos no chão;
- Avaliação do potencial dos fungos isolados mediante duas triagens em meio sólido, sendo a primeira para verificar a produção de enzimas ligninolíticas, utilizando-se substratos indicadores, e a segunda verificando o potencial de descoloração dos isolados que apresentarem atividade enzimática;
- Avaliar o potencial de descoloração, sob condições de fermentação submersa, dos isolados que apresentarem potencial de descoloração;
- Utilizar um dos corantes do estudo e o melhor isolado para comprovar ou refutar, mediante métodos analíticos, a ação das enzimas ligninolíticas na descoloração.
- Identificar a espécie do isolado com os melhores rendimentos de descoloração.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Processo de produção do couro

A produção de couro é baseada na transformação de uma pele animal para fabricação de artigos manufaturados como peças de vestuário, calçados, estofamento de veículos, revestimento de móveis, etc. De acordo com Covington (2009), a pele animal possui diversos componentes que impactam no processamento e nas propriedades do produto final, o couro. Portanto, para ser transformada em couro, a pele passa por uma série de operações unitárias que visam à limpeza, estabilização e qualidade de acabamento do produto final desejado. O processamento do couro é dividido, principalmente, em quatro fases de trabalho:

- Ribeira: é composta por uma série de operações químicas e mecânicas, a saber, remolho, depilação, caleiro, descarne, divisão, desencalagem, purga e píquel. Estas etapas têm o objetivo de efetuar limpeza e remoção de estruturas e substâncias da pele não formadoras de couro, tornando acessíveis os sítios de reação para o curtimento (FUCK, 2008; SANTOS, 2006; VIGANNICO, 2007).

- Curtimento: etapa responsável por tornar a pele imputrescível mediante a utilização de curtentes minerais, vegetais ou sintéticos. Os curtentes estabilizam a estrutura proteica existente na pele conferindo ao couro uma boa estabilidade hidrotérmica e resistência à degradação bacteriana (COVINGTON, 2009). Nessa etapa, os curtentes preferidos são os sais de cromo, embora os taninos também sejam utilizados (NAZER; AL-SA'ED; SIEBEL, 2006).

- Acabamento molhado: fase do processo que tem por finalidade atender às especificações do produto final. As operações de acabamento molhado são neutralização, recurtimento, tingimento e engraxe (VIGANNICO, 2007).

- Pré-acabamento e acabamento final: processo constituído por operações mecânicas que visam o ajuste das propriedades do couro, a saber, secagem, acondicionamento e amaciamento, lixamento e acabamento final. Por fim, o acabamento final consiste em um conjunto de etapas que conferem ao couro seu aspecto definitivo, devido à aplicação de produtos poliméricos formadores de filme sobre o couro, bem como prensagens e estampagens (COVINGTON, 2009; PICCIN, 2013).

2.2 Tingimento do couro

O tingimento do couro consiste em conferir a cor do produto final. A coloração é obtida através da fixação de moléculas de corantes orgânicos solúveis na superfície e no interior da rede de fibras da pele curtida (FUCK et al., 2012). Em curtumes, o tingimento é normalmente realizado em fulões com corantes fornecidos em pó pelos fabricantes (GOMES, 2014).

O couro é uma matéria-prima difícil de tingir, pois possui estrutura tridimensional complexa. Dentre as características dessa estrutura, destacam-se: distribuição irregular de gorduras remanescentes, imperfeições naturais da pele (rugas, cicatrizes, etc.), variações de espessura e densidade (KANTH et al., 2008).

Nessa etapa do processamento do couro, problemas como manchas, dificuldade de atravessamento do corante e falta de intensidade de cor podem aparecer devido a descuidos em etapas anteriores. A Tabela 1 apresenta algumas operações anteriores ao tingimento do couro e suas influências no tingimento.

Tabela 1 - Operações anteriores ao processo de tingimento do couro e suas influências

Operação Unitária	Possíveis problemas encontrados
Desencalagem	Presença de cálcio residual no interior do couro pode interferir na penetração do corante, além de alterar a maciez do produto.
Píquel	Pigmentação natural das peles deve ser eliminada, pois interfere na uniformidade da cor.
Desengraxa	A não eliminação da gordura natural do couro pode atrapalhar a dispersão dos curtentes, provocando manchas.
Curtimento	A maioria dos corantes utilizados no tingimento são ácidos (aniônicos) os quais apresentam grande afinidade pelo complexo de cromo. A má distribuição do cromo no curtimento pode levar à formação de manchas.
Engraxe	Os óleos engraxantes podem esmaecer os tingimentos e até fazer com que os corantes migrem para o banho.

Para se obter um tingimento uniforme, também é necessário compreender a influência dos parâmetros desse processo, a saber, pH, temperatura, volume de banho, dimensão do fulão, secagem, tempo de tingimento, qualidade da água, etc. (FUCK et al., 2012). Além disso, a escolha do tipo de corante é importante para obter a tonalidade de interesse, bem como prever seu consumo máximo de forma a evitar cargas residuais nos

efluentes (KANTH et al., 2008).

A cor final de um artigo de couro muitas vezes não é dada por apenas um corante, mas por uma mistura de corantes e de outros agentes químicos. Como exemplo, a cor final “*Acquatic TPX 14-4510*” (similar a um azul turquesa), aplicada no tingimento de sapatos e bolsas femininas, é composta por dois corantes: 0,4 % SELLA® *Fast Blue A* e 0,10 % SELLA® *Fast Yellow A*, onde os percentuais indicados referem-se ao peso do couro rebaixado. (Informações obtidas através do Catálogo “*Inspiring – TFL Colour Trends*” da empresa multinacional TFL).

2.3 Corantes

Os corantes são substâncias que quando aplicadas a um material lhe conferem cor. Em geral, são solúveis em meio ácido, neutro ou básico, possuindo estrutura molecular insaturada, sendo eletricamente instáveis. Os corantes podem ser classificados de três maneiras distintas: de acordo com sua estrutura química, forma de sua utilização ou método de aplicação (HUNGER, 2003). No entanto, devido às complexidades da nomenclatura de cor com base na estrutura química, a classificação com base na aplicação é muitas vezes considerada como mais vantajosa para fins industriais (YAGUB et al., 2014).

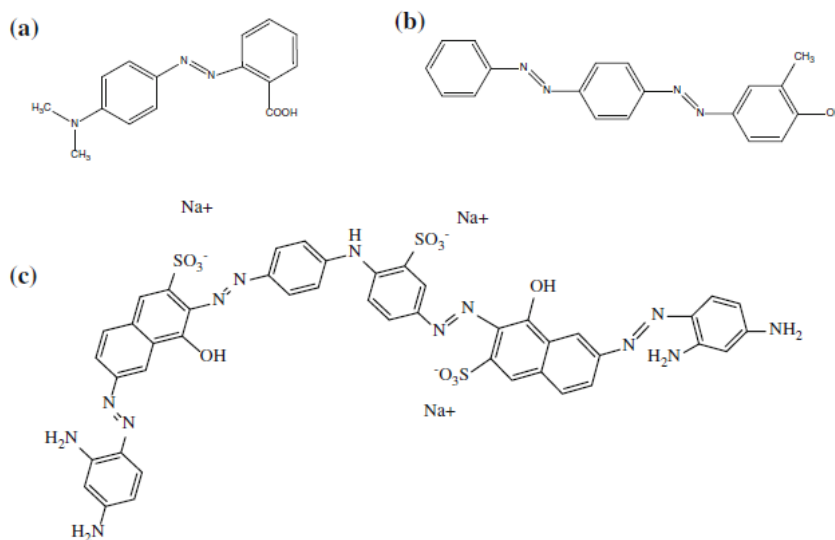
2.3.1 Classificação de acordo com a estrutura química

Os corantes são classificados de acordo com seu grupo funcional cromóforo, sendo essa estrutura a responsável pelo aparecimento de cor (IQBAL, 2008). Os principais grupos cromóforos são: azo, carbonila, ftalocianina, enxofre, etileno, nitro e nitroso.

Dentro dessa classificação, os corantes azoicos são os mais utilizados no tingimento do couro e representam mais de 60 % do total de corantes existentes (SHAH, 2014). Na Figura 1, são representados exemplos desse tipo de corantes. Em sua estrutura, ao menos uma ligação dupla entre átomos de nitrogênio é encontrada; no entanto, muitas estruturas diferentes são possíveis (GROWTHER et al., 2008). O grupo funcional, chamado de “azo” (-N=N-) está ligado, geralmente, a radicais aromáticos, que, por sua vez, estão ligados a outros grupos, como amino (NH₂), ácido sulfônico e sais de sódio (SO₃Na) e metila (CH₃). Esses grupos funcionais ligam-se covalentemente a outras espécies químicas das fibras onde se devem fixar, conferindo uma alta estabilidade de fixação no tingimento (GOMES, Carolina Scaraffuni, 2014). Devido a essas características, os corantes azoicos são os mais utilizados na indústria coureira do Brasil. Além disso, estima-se que entre 90 e 95 % dos

artigos em couro produzidos em todo o mundo são tingidos com esses corantes (FUCK; GUTTERRES, 2008).

Figura 1 - Estrutura molecular de três corantes azoicos: (a) *Acid Red 2*; (b) *Disperse Yellow 7*; (c) *Direct Black 22*.



Fonte: GÜRSES et al., (2016)

2.3.2 Classificação de acordo com os métodos de aplicação

A classificação dos corantes de acordo com o método de aplicação é mais útil e usual que a classificação química, pois leva em conta as características de fixação e os diferentes graus de aplicabilidade para o tingimento do couro (tingimento superficial, tingimento em profundidade ou tingimento em profundidade e superficial) (COVINGTON, 2009). De acordo com os métodos de aplicação, os corantes são classificados em corantes ácidos, básicos, diretos, reativos, de cuba e dispersos. Entre eles, os corantes ácidos são os mais usados na indústria do couro.

Os corantes ácidos são também chamados de corantes aniônicos, são obtidos comercialmente sob a forma de sais de sódio. Em geral, esta classe de corante tem baixo peso molecular, alta solubilidade em água, ligam-se por eletrovalência e seu modo de fixação é por acidificação devido à presença de grupos sulfonato (COVINGTON, 2009). São utilizados para tingimento em profundidade em certos tipos de fibras, tais como poliamida, lã, seda e em misturas de fibras, assim como no couro. Suas cores oferecem tonalidades

vivas, profundas e brilhantes (AYAD; EL-NASR, 2012). Em sua maioria, os corantes ácidos, contém grupos cromóforos azo, nitro, nitroso, antraquinona ou trimetilmetano.

2.4 Uso de Corantes para o tingimento e efluentes

A indústria do couro gera uma elevada carga poluidora, devido à diversidade de produtos químicos utilizados, e principalmente, pela quantidade de água utilizada nos processos, pois nem em todas as etapas de produção é possível fazer o reuso de correntes aquosas. Em relação à etapa de acabamento molhado, onde é realizado o tingimento do couro, a única alternativa para mitigar a geração de resíduos é a otimização dos processos, visando o máximo aproveitamento dos reagentes utilizados, diminuindo sua carga para posterior tratamento (SANTOS, 2006).

Os corantes utilizados para o tingimento do couro, em geral, apresentam diferentes taxas de exaustão, o que acaba interferindo na tonalidade do produto final, pois a afinidade entre o couro e o corante nem sempre é ideal. Por mais que se faça uso de agentes auxiliares para o tingimento, visando uma melhor fixação do corante na superfície do couro, ainda encontram-se quantidades residuais de corantes nos banhos, gerando resíduos que necessitam de tratamento (KANTH et al., 2008).

Os corantes, principalmente os azoicos, podem causar danos tanto ao meio ambiente, quanto à saúde humana. Devido à sua estrutura aromática, a maioria dos corantes deste tipo tem difícil biodegradabilidade, podendo ter ação cancerígena, causar alergias, dermatites, disfunção de órgãos como rim, fígado, cérebro; podendo ainda, comprometer o sistema nervoso central e reprodutivo (HIJAZI et al., 2015). Além disso, esses compostos podem apresentar toxicidade crônica e aguda quando há possibilidade de se degradarem em aminas aromáticas através do trato intestinal, pele, pulmões (JOTHIVENKATACHALAM e KARTHIKEYAN, 2013).

Do ponto de vista ambiental, esses corantes impedem a penetração de luz solar em camadas mais profundas dos corpos de água. Isso, por consequência, afeta a fauna e a flora desses sistemas aquáticos, pois a atividade fotossintética, bem como a difusão de gases, são diminuídas (PICCIN, 2013). Além disso o pH, a demanda bioquímica de oxigênio e a demanda química de oxigênio aumentam na presença de corantes em águas residuais (RODRÍGUEZ-COUTO, 2015).

2.5 Tratamento de efluentes e legislação ambiental

A legislação ambiental para emissão de efluentes no Estado do Rio Grande do Sul é regulamentada por três resoluções:

- Resolução CONAMA 357/2005: classifica os corpos de água e dá diretrizes ambientais para seu enquadramento, além de estabelecer condições e padrões de lançamento de efluentes;

- Resolução CONSEMA 128/2006: fixa padrões de emissões de efluentes líquidos para empresas que lançam seus efluentes em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul;

- Resolução CONSEMA 129/2006: define critérios e padrões para toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul;

Com relação aos corantes, a legislação não estabelece padrões de emissão para a cor, entretanto não pode ser atribuída coloração aos corpos de água (GOMES, 2014). Segundo Fuck e Gutterres (2008), na Europa, a Diretriz 2004/21/CE, em vigor desde 2005, limita o emprego dos corantes azoicos, que por clivagem redutora de um ou mais grupos “azo” (-N=N-), possam liberar determinadas aminas aromáticas.

Em geral, para remoção de corantes dos efluentes de tingimento do couro, são empregados os tratamentos convencionais, a saber, coagulação, floculação e decantação em conjunto com tratamentos biológicos. Esses métodos, de certa forma, são eficientes para remoção da carga orgânica, entretanto podem ser incapazes de remover substâncias recalcitrantes como grupos azo, compostos fenólicos e etc.(GUTTERRES et al., 2015).

Diante dessa problemática, diversas pesquisas se preocupam em aplicar novas tecnologias para o tratamento desses efluentes, visando reduzir os níveis de DQO e DBO bem como realizar a descoloração das águas residuais. Alguns exemplos são os processos de ozonização (BALAKRISHNAN; ARUNAGIRI; RAO, 2002; IACONI; RAMADORI; LOPEZ, 2009); filtração por membranas (GALLEGO-MOLINA et al., 2013); adsorção (IMMICH et al., 2009; PICCIN et al., 2016; PUCHANA-ROSETO et al., 2016), entre outros. O uso desses tratamentos avançados em conjunto com o tratamento convencional melhora a qualidade final do efluente; entretanto, são processos que possuem custo elevado e limitações técnicas.

Especificamente, os fungos de podridão branca (WRF), do inglês “White Rot Fungi”, têm sido objeto de muitas pesquisas para remoção de corantes nos últimos anos, por serem os micro-organismos mais eficientes para degradação de corantes sintéticos

(KAUSHIK; MALIK, 2009). A capacidade de descoloração destes fungos está relacionada com a produção de enzimas ligninolíticas, responsáveis pela degradação da lignina. Uma vez descoberta a habilidade dos WRF para biodegradar efluentes com corantes, intensificou-se o número de pesquisas nesta área de maneira a substituir ou complementar os processos de tratamento utilizados industrialmente (ALI, 2010).

2.6 Fungos de podridão branca e biodegradação da lignina

Os fungos de podridão branca são o maior grupo de organismos que degradam compostos lignocelulósicos da madeira. São caracterizados pela aparência esbranquiçada que deixam ao degradar os três principais componentes da madeira, a saber, a celulose, a hemicelulose e a lignina (PELCZAR et al., 2005). Esse tipo de fungo secreta enzimas capazes de despolimerizar e mineralizar completamente a lignina em CO₂ e H₂O, sendo essenciais para o ciclo do carbono nos ecossistemas terrestres (BOYLE; KROPP; REID, 1992; KIRK; CULLEN, 1998).

A lignina é um dos constituintes da parede celular de todas as plantas vasculares, com função principal de proteger a planta contra a degradação de suas paredes por ação de micro-organismos. É um polímero amorfo complexo e recalcitrante, composto de unidades fenilpropanóicas (C₆C₃) unidas por diferentes tipos de ligação. A irregularidade do polímero deve-se ao mecanismo de sua biossíntese, que é dado através do acoplamento de várias formas de ressonância de radicais livres. Dessa maneira, a lignina possui uma estrutura tridimensional aleatória, não apresentando uma unidade de repetição típica (BETTS et al., 1991). Uma das possíveis estruturas da lignina é ilustrada no Apêndice A.

A capacidade dos WRF em degradar a lignina é dependente de um complexo enzimático extracelular ligninolítico, o qual é formado, principalmente, por quatro enzimas extracelulares e não específicas: lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP), peroxidase dependente de manganês (MnP) e peroxidase versátil (VP). Os WRF são agrupados em quatro categorias, no que se diz respeito à produção de enzimas ligninolíticas: WRF produtores de MnP, LiP e Lac; WRF produtores de Lac e alguma peroxidase (LiP, MnP ou VP); WRF produtores de peroxidases (LiP, MnP e VP) e WRF produtores de Lac (LOURDES et al., 2014). Essas enzimas geram radicais livres que atacam aleatoriamente a macromolécula da lignina, quebrando ligações covalentes e liberando uma gama de compostos fenólicos de baixo peso molecular. As enzimas ligninolíticas podem funcionar

cooperativamente ou separadamente umas das outras. Entretanto, enzimas auxiliares como a aril álcool oxidase, se fazem necessárias para obter a degradação completa da lignina, pois produzem espécies ativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila responsáveis por atacar o substrato (WONG, 2009).

2.7 Fungos de podridão branca e tratamento de corantes: mecanismos envolvidos

Os WRF são amplamente utilizados na biodegradação de corantes, devido à sua versatilidade metabólica e produção de enzimas extracelulares capazes de atuar na desagregação química da estrutura da lignina que, por sua vez, apresenta grande similaridade com a estrutura dos corantes (SANTOS; CORSO, 2014; SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P., 2015). Entretanto, além da biodegradação enzimática, outros dois processos participam na remoção de corantes, a saber, biossorção e bioacumulação.

A biossorção é um mecanismo que envolve uma fase sólida (biossorvente) e uma fase líquida que contém a substância a ser adsorvida (corantes) (AKSU; TEZER, 2000). Esse processo se inicia com a difusão do composto adsorvido para a superfície da célula microbiana. Em seguida, a ligação desse composto à superfície celular ocorre de acordo com a afinidade química, sendo esse, um processo que ocorre de forma rápida e reversível (AKSU, 2005). A descoloração de corantes por biomassa envolve vários mecanismos complexos como quelação, complexação, adsorção química e física, microprecipitação, permuta iônica e interação eletrostática (SANGHI; VERMA, 2013).

A bioacumulação é definida como uma variante especial da biossorção, onde é observada a acumulação de corante na célula fúngica em crescimento ativo. Esse processo é mediado pela biossorção inicial (independente do metabolismo), seguido da posterior acumulação do corante no citoplasma da célula (dependente do metabolismo). Logo, a bioacumulação é compreendida como um processo de adsorção seguido da absorção (LOURDES et al., 2014).

2.8 Estado da arte da biodescoloração e biodegradação de corantes por fungos de podridão branca

O estudo de descoloração de corantes por fungos de podridão branca teve seu início na década de 80. Os pioneiros nessa linha de pesquisa foram Glenn e Gold (1983),

responsáveis por testar a descoloração de corantes poliméricos sulfonados através da atividade ligninolítica de culturas do fungo *Phanerochaete chrysisporium*.

Uma década mais tarde, Spadaro et al. (1992) mostraram a capacidade do fungo *Phanerochaete chrysisporium* para degradar e descolorir sete corantes azóicos. Após esse estudo, essa espécie de fungo foi alvo de muitas pesquisas dedicadas a descolorir corantes azoicos bem como biodegradar outros compostos recalcitrantes (RODRÍGUEZ-COUTO, 2015).

O sucesso dos resultados obtidos por outros trabalhos que utilizaram o *Phanerochaete chrysisporium* para biodegradar uma gama de corantes azoicos não só alavancou o interesse nessa espécie, mas, intensificou a busca de novas espécies de WRF visando esse mesmo propósito. De acordo com Rodríguez-Couto (2015), os quatro principais WRF que tiveram a capacidade comprovada de degradar corantes azoicos além do *Phanerochaete chrysisporium* são: *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma sp.* e *Bjerkandera adusta*.

Até então, inúmeras pesquisas foram desenvolvidas visando utilizar novas espécies de WRF capazes de biodegradar corantes utilizados na indústria, bem como otimizar condições de operação e uso das enzimas produzidas pelos WRF diretamente no tratamento, além de desenvolver estudos analíticos para entender os mecanismos de degradação, bem como de ação enzimática durante o processo (KAUSHIK; MALIK, 2015).

Devido à existência de inúmeras publicações referentes ao uso dos WRF para descolorir e biodegradar corantes, e visando uma abordagem mais prática dos trabalhos disponíveis na literatura, a seguir, serão consideradas algumas pesquisas publicadas no último ano:

- Zuleta-Correa et al., (2016) utilizaram três espécies diferentes de WRF (*T. versicolor*, *Pleurotus pulmonarius* e *P. ostreatus*) visando a degradação do corante *Basic Red 46* através da fermentação em estado sólido. Os autores reportaram um percentual de degradação máximo de 63 %, obtido após 17 dias de incubação utilizando o fungo *Trametes versicolor*, enquanto que *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* conseguiram chegar a um percentual máximo de 69,3 % e 63,1 %, respectivamente, após 25 dias de incubação.

- Adnan et al., (2016) conseguiram atingir 97,17 % de biodegradação do corante *Acid Red 27* em apenas 72 horas de incubação, mediante a inoculação do basidiomiceto

Armillaria sp. F022. Além disso, os autores avaliaram os metabólitos formados durante a biodegradação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

- Lu et al., (2016) estudaram a descoloração de efluentes têxteis simulados com três tipos de corantes (*Remazol Brilliant Blue R*, *indigo carmine* e *methyl green*) utilizando culturas do fungo *Ganoderma* sp. En3 e enzimas puras produzidas pelo mesmo. Esse trabalho demonstrou a enorme capacidade do WRF em descolorir esses corantes, chegando até 98,2 % de remoção do corante *Indigo carmine* (concentração inicial de 2000 mg L⁻¹). Testes com a enzima pura lacase produzida pelo fungo permitiram atingir 93,4 % de descoloração para a mesma concentração inicial de corante. O estudo revelou o potencial de *Ganoderma* sp. En3 para o tratamento de corantes industriais bem como de efluentes da indústria têxtil.

- Kunjadia et al., (2016) estudaram a biodegradação de corantes azoicos utilizando enzimas ligninolíticas produzidas por três espécies de WRF (*P. ostreatus*, *P. sapidus* e *P. florida*). Os autores reportaram a enzima lacase como a principal responsável pela remoção de 88, 92 e 98 % de corante, respectivamente, para os fungos *P. ostreatus*, *P. sapidus* e *P. florida*.

- Asgher; Shah; Iqbal, (2016) utilizaram uma cepa de *T. versicolor* IBL-04 para a biodegradação do corante *Remazol Brilliant Yellow 3-GL*, corante reativo tipicamente utilizado na indústria têxtil. Na primeira triagem o fungo conseguiu uma descoloração de 93,5 % sob condições específicas (pH: 4; temperatura: 30 °C; sob agitação). Sob condições ótimas, adquiridas via otimização estatística de diferentes fatores físicos e nutricionais, a cepa removeu 100 % do corante estudado. A lacase foi a principal enzima secretada pelo fungo.

- Deveci et al., (2016) estudaram a descoloração dos corantes *Acid Red 88* e *Reactive Red 180* mediante a utilização do fungo *P. chrysosporium* em um processo híbrido constituído por um biorreator de membrana fúngica em conjunto com um reator de membrana fotocatalítico. Os autores relataram que, após ajustes no pH ótimo (4,5), foi possível a remoção de 99,9 % da cor para ambos os corantes.

- Ling et al., (2015) isolaram a enzima lacase, obtida através de fermentação submersa do fungo *Trametes* sp. LAC-01. Em seguida, realizaram testes de descoloração em diversos corantes aplicados na indústria têxtil. Os autores relataram que, após 24 horas

de incubação, alcançaram descoloração de 65,4 % e 75,8 % para o corante *Bromothymol Blue* e *Malachite Green*, respectivamente.

- Mota et al., (2015) utilizaram a enzima lacase, produzida pelo fungo *Ganoderma lucidum*, para descoloração do corante vermelho congo (*Direct Red 28*) largamente utilizado na indústria têxtil. Os autores relataram que, após 6 horas de tratamento, sob condições de pH 4,0 e temperatura a 40 °C, a enzima removeu 80 % da cor.

- Yildirim; Yesilada, (2015) fizeram um estudo de descoloração dos corantes *Acid Blue 74* e *Reactive Blue 198*. Para isso, utilizaram os fungos *Trametes versicolor* e *Funalia trogii* livres e imobilizados em carvão ativado, madeira de pinho e células fúngicas aprisionadas em esferas de alginato. Os autores relataram que o corante *Acid Blue 74*, em apenas 2 horas de tratamento, obteve descoloração de 96 e 94 %, respectivamente, para os fungos livres *Trametes versicolor* e *Funalia trogii*. A descoloração do corante *Reactive Blue 198* alcançou 87 e 84% sob mesmas condições. Além disso, os fungos imobilizados na madeira de pinho obtiveram uma descoloração mais rápida e eficiente.

-Chen; Ting, (2015), avaliaram a descoloração dos corantes *Crystal Violet*, *Methyl Violet*, *Cotton Blue* e *Malachite Green* a partir do isolado *Corioloopsis* sp. 1c3, sendo que soluções de 100mg L⁻¹ foram utilizadas para tratamento. Após 7 dias de tratamento, os corantes *Crystal Violet* e *Methyl Violet* alcançaram 94 e 97 % de descoloração, respectivamente. Entretanto, o corante *Malachite Green* foi o mais recalcitrante, alcançando apenas 52 % de descoloração após 9 dias de tratamento. Os autores reportam que tanto os mecanismos de bioabsorção, quanto biodegradação foram responsáveis pela descoloração desses corantes.

Um resumo de todos os estudos reportados nessa seção é mostrado no Apêndice B, onde se relaciona cada fungo empregado para o tratamento, os corantes estudados, tempo de tratamento e a descoloração alcançada.

2.9 Os WRF no tratamento de corantes para o couro e efluentes de tingimento de curtume

A grande maioria das pesquisas encontradas na literatura envolvendo WRF para a descoloração e biodegradação é voltada à indústria têxtil ou para biorremediação de compostos xenobióticos. Entretanto, a seguir serão relatados alguns estudos que foram realizados para tratamento de corantes para o couro e seus efluentes:

- Rodriguez-Couto et al., (2004) utilizaram a enzima lacase, produzida pelo fungo *T. hisurta* em crescimento para biodegradação de dois corantes empregados na indústria do couro (*Luganil Green* e *Sella Solid Red*). Através de um biorreator de imersão, com peneiras de aço inoxidável agindo como imobilizador celular, os autores reportaram que, em apenas 2 horas de tratamento, atingiram 40 e 16,2 % de remoção de cor para os corantes *Luganil Green* e *Sella Solid Red*, respectivamente.

- Gómez-Bertel et al., (2008) utilizaram células imobilizadas de três fungos (*P. chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Aspergillus niger*) em espuma de poliuretano para descolorir um efluente de curtume. O melhor resultado foi alcançado após 10 dias de tratamento, quando conseguiram 67 % de descoloração desse efluente utilizando o fungo *P. chrysosporium*.

- Baccar et al., (2011) estudaram o potencial de três fungos para biodegradar o corante comercial *Black Dycem* utilizado para o couro. As cepas do *T. versicolor*, *G. lucidum* e *I. lacteus*, foram submetidas a duas triagens, sendo a primeira em meio sólido e a segunda em meio líquido. Após essa triagem, os autores identificaram o *T. versicolor* como a cepa com maior capacidade de descoloração, em termos de extensão e rapidez. Em seguida, a cepa do *T. versicolor* foi utilizada em um biorreator do tipo *air-lift* em lotes individuais e em bateladas fazendo-se reutilização de biomassa. Por fim, os autores relataram que o fungo conseguiu uma descoloração de 86 a 89 % no tratamento.

- Pazarbasi et al., (2012) utilizaram o fungo *T. trogii* TEM H2 para descoloração de corantes para o couro. Primeiramente, os autores avaliaram a descoloração do corante *Acid Blue 7* e após otimização das condições de operação (pH 5 e 27°C) atingiram 99,9 % de descoloração sob agitação e 63,5 % em condições estáticas. Após os bons resultados obtidos, foi avaliada a descoloração de outros oito corantes (*Acid Black 210*, *Acid Green 20*, *Acid Yellow 36*, *Acid Black 24*, *Acid Black 234*, *Acid Violet 17*, *Acid Blue 134* e *Acid Brown 349*), bem como a mistura desses oito corantes com o *Acid Blue 7* e de um efluente real de curtume contendo *Acid Blue 7*. Os autores reportam que, após as primeiras 24 horas de tratamento atingiram a descoloração de 88 e 48 %, respectivamente, para a mistura de corantes e para o efluente contendo *Acid Blue 7*.

- Ortiz-Monsalve, (2015), reportou a habilidade do isolado *Trametes villosa* SC10, para descoloração de quatro corantes para o couro (Azul 161, Marrom 414, Vermelho 357 e Preto 210). O isolado em meio líquido, sob condições de fermentação submersa, removeu

96,07 %, 90,66 %, 83,90 % e 95,88 %, respectivamente, dos corantes Azul 161, Marrom 414, Vermelho 357 e Preto 210. O autor realizou ensaios adicionais com o corante Vermelho 357 para elucidar mecanismos envolvidos na descoloração, chegando à conclusão de que a enzima lacase desempenhou papel importante na descoloração, aliada ao mecanismo de bioadsorção. Sob condições ótimas (pH 4,5, 25°C, 200 rpm e 100 mgL⁻¹ de corante) atingiu 96,58 % de descoloração do corante Vermelho 357.

3 Materiais e Métodos

Este capítulo apresenta os materiais e reagentes utilizados neste trabalho e a descrição dos procedimentos adotados para a obtenção dos fungos e realização dos ensaios de descoloração.

3.1 Reagentes

Todos os reagentes usados nesta pesquisa foram de grau analítico, os quais incluem indicadores de atividade enzimática, corantes para couro e compostos usados como nutrientes nos meios de cultura.

3.1.1 Compostos indicadores de atividade enzimática e corantes para couro

Os reagentes ABTS (ABTS: 2,2' –azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) sal diamônio, guaiacol (GUA: 2- metóxifenol) e cloreto de manganês (CM: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$), usados nos testes enzimáticos, foram fornecidos pela Sigma-Aldrich e Santa Cruz Biotechnology. A estrutura e características desses substratos é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Estrutura molecular e características dos substratos indicadores de atividade enzimática

Substrato	Estrutura Molecular	Fórmula Molecular	Massa Molar ($g\text{mol}^{-1}$)
ABTS		$C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$	548,68
GUA		$C_7H_8O_2$	124,14

Para os estudos de descoloração foram utilizados seis corantes comerciais empregados no tingimento do couro: Azul ácido 161 (AA161), Marrom ácido 414 (MA414), Preto ácido 210 (PA210), Vermelho ácido 357 (VA357), Amarelo ácido 79 (AA79) e Laranja ácido 142 (LA142). Os corantes foram fornecidos pela Companhia Lanxess Ltda, Ind. de Produtos Químicos e Plásticos (São Leopoldo, RS, Brasil). A Tabela 3 mostra, de maneira

resumida, algumas características físico-químicas dos corantes. A estrutura química de cada corante é apresentada no Apêndice C.

Na determinação do comprimento de onda com maior absorbância para cada corante (λ_{Max}), informação usada na avaliação da descoloração, foram feitas análises dos espectros de absorção dentro da faixa da luz visível (400 nm a 800 nm). Todos os ensaios de espectrofotometria foram realizados em um espectrofotômetro UV-VIS T80 de PG Instruments Ltd. (Leicester, LEC, UK).

Tabela 3 - Características físico-químicas dos corantes utilizados no trabalho.

	Laranja ácido 142	Azul ácido 161	Preto ácido 210	Vermelho ácido 357	Marrom ácido 414	Amarelo ácido 79
Nome comercial	BAYGENAL® Laranja 3GR	BAYGENAL® Azul Escuro 2S	SOLVADER® 21C	BAYGENAL® Red GT	BAYGENAL® Dark Brown L-N2G	BAYGENAL® Amarelo 4GL
Nome C.I.^a	Acid Orange 142	Acid Blue 161	Acid Black 210	Acid Red 357	Acid Brown 414	Acid Yellow 79
Número CAS^b	55809-98-8	12392-64-2	99576-15-5	57674-14-3	82640-18-4	72828-69-4
Massa Molar (g mol⁻¹)	956,7	394,4	938,02	956,7	599,23	1115,16
Pureza (%)	71	77	70	80	75	90
λ_{Max} (nm)	472	578	420	494	420	420
Fórmula Linear	C ₃₂ H ₂₀ CrN ₁₀ O ₁₄ S ₂ 3Na	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	C ₄₇ H ₄₂ N ₁₀ O ₁₂ S ₄ 2Na

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

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

3.1.2 Meios de cultura

Para preparação dos meios de cultura foram utilizados os seguintes reagentes: Glicose, Ágar, Extrato de Levedura, Extrato de Malte e Meio comercial Ágar Batata Dextrose (ABD), fornecidos pela Himedia Laboratories e Difco Laboratories. Diferentes meios de cultura foram preparados ao longo de toda parte experimental, sendo cada um utilizado para determinado objetivo:

- Meio de Isolamento e reativação de micro-organismos: para essa etapa foi utilizado o meio MEA, composto por Extrato de Malte a 2 % (m/v), Extrato de Levedura a 0,4 % (m/v), Glicose 1 % (m/v) e Ágar 1,5 % (m/v). Para isolamento, o meio MEA foi

complementado com o antibiótico Cloranfenicol[®] a 0,01 % (m/v) e o fungicida Benomyl[®] a 1 % (m/v) (KIISKINEN et al., 2004). Para a reativação dos isolados foi usado MEA;

- Meio de Conservação: visando a preservação dos micro-organismos isolados, foi utilizado o meio comercial Ágar Batata Dextrose (ABD) a 2 % (m/v);

- Meio para triagem da atividade enzimática: para esse experimento, foi utilizado o meio sólido MEA complementado individualmente com os indicadores enzimáticos ABTS, GUA e CM (todos a 0,01 % (m/v)). (BACCAR et al., 2011; BARRASA et al., 2014; JAROSZ-WILKOŁAZKA et al., 2002);

- Meio para triagem do potencial de descoloração: foi usado o meio sólido MEA complementado individualmente com corantes AA161, VA357 e PA210 em concentração de 200 mgL⁻¹;

- Meio para ensaios de descoloração: os ensaios de descoloração foram realizados usando o meio de cultura líquido Caldo extrato de malte (MEB) composto por extrato de malte a 2 % (m/v), extrato de levedura a 0,4 % (m/v) e glicose a 1 % (m/v). No caldo nutritivo, foram adicionados, separadamente, os corantes AA161, VA357, PA210, MA414, AA79 e LA142 a 200 mgL⁻¹ (BACCAR *et al.*, 2011).

Todos os meios de cultura usados foram esterilizados em autoclave sob condições específicas (temperatura de 121°C e pressão de 1 atm) durante 15 minutos, antes de serem inoculados com as cepas fúngicas.

3.2 Micro-organismos

3.2.1 Coleta de fungos nativos

A coleta de micro-organismos foi realizada no Parque Farroupilha, popularmente conhecido como Parque da Redenção (Porto Alegre, RS, Brasil). O objetivo desta etapa consistiu em coletar amostras ambientais constituídas por pedaços de madeira em decomposição contendo corpos de frutificação (basidiocarpos) de fungos de podridão branca. Cada basidiocarpo foi removido sob corte, utilizando-se estilete previamente desinfetado em álcool 70°. Posteriormente, o material foi submetido à lavagem com água destilada estéril e desinfecção com uma solução de 3 % de peróxido de hidrogênio (HERNÁNDEZ-LUNA et al., 2008). Após a desinfecção, pedaços de micélio (1 cm²) foram removidos de cada basidiocarpo, e foram armazenados para posterior incubação (ORTIZ-

MONSALVE, 2015). Foram realizados registros fotográficos de cada amostra para uma posterior identificação morfológica dos fungos.

3.2.2 *Isolamento de cepas fúngicas*

O isolamento de cada fungo foi realizado em placas de Petri com 90 mm de diâmetro contendo 20 mL do meio de isolamento. Os pedaços de micélio coletados foram incubados em estufa a 30°C durante uma semana. Repicagens sucessivas foram realizadas até obter culturas puras. O tamanho, forma e cor dos micro-organismos em crescimento foi acompanhado diariamente para identificação do isolamento (ORTIZ-MONSALVE, 2015).

3.2.3 *Cepa de referência*

A cepa *Trametes villosa* SC-10, previamente isolada por Ortiz-Monsalve, (2015) foi utilizada como cepa de referência, pois de acordo com os estudos do autor foi uma espécie de WRF que apresentou excelentes resultados para descoloração de corantes para couro.

3.2.4 *Conservação dos micro-organismos*

Os isolados foram conservados em geladeira sob temperatura controlada (4°C) em meio ABD. Sub-culturas foram realizadas a cada 60 dias, para preservação da estirpe. Antes de qualquer experimento, cada cepa foi reativada por incubação em meio MEA (30°C durante 5 dias).

3.2.5 *Preparação do inóculo*

Todos os inóculos foram preparados por reativação das cepas conservadas em ABD. A reativação consistiu em incubar um pedaço de micélio em meio MEA, durante 5 dias a 30°C. Para os ensaios em meio sólido (triagem de atividade enzimática e potencial de descoloração) foi usado um *pellet* retirado do entorno da suspensão de micélio em crescimento da cultura reativada, para incubação em placa de Petri contendo o meio de cultura MEA com indicadores enzimáticos ou os corantes.

Já os inóculos utilizados para experimentos de descoloração em meio líquido foram preparados a partir da cepa que apresentou os melhores resultados na triagem em meio sólido. Após reativação, três *pellets* foram cortados do micélio em crescimento e adicionados, assepticamente, a cada Erlenmeyer contendo o meio de cultura MEB com o respectivo corante.

3.3 Triagem em meio sólido

Após coleta e isolamento, cada cepa pura foi submetida a duas triagens em meio sólido. A primeira triagem foi realizada para avaliar a produção de enzimas ligninolíticas. Posteriormente, as cepas que apresentaram atividade enzimática positiva foram usadas para uma segunda triagem que avaliou o potencial de descoloração dos corantes.

3.3.1 Avaliação qualitativa de atividade enzimática

Para esse experimento, placas de Petri incubadas com cepas puras em meio MEA contendo indicadores enzimáticos (ABTS, GUA e CM) foram monitoradas seguindo a metodologia utilizada por Jarosz-Wilkolazka et al., (2002). Em complemento a esse método, placas inoculadas com a cepa *Trametes villosa* SC-10 foram utilizadas como controle biótico positivo e placas sem inóculo foram utilizadas como controle negativo de atividade enzimática. A participação de cada enzima foi comprovada, de acordo com algumas características mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Identificação qualitativa de atividade enzimática das cepas isoladas mediante reação com meio indicador.

Meio indicador	Enzima envolvida	Características observadas	Referência
MEA com GUA	Oxidases e/ou peroxidases extracelulares	Aparição de um halo marrom avermelhado no entorno da zona de crescimento do micro-organismo, caracterizando a reação de oxidação do guaiacol	HERNÁNDEZ-LUNA et al., (2008)
MEA com ABTS	Lacase	Aparição de uma coloração verde escura no entorno do micélio em crescimento, caracterizando a oxidação do ABTS para ABTS ⁺	JAROSZ-WILKOLAZKA et al., (2002)
MEA com CM	Peroxidase dependente de manganês	Formação de flocos marrons	JAROSZ-WILKOLAZKA et al., (2002)

3.3.2 Avaliação do potencial de descoloração

O estudo do potencial de descoloração foi conduzido em três testes (controle abiótico sem inóculo, cepa *Trametes villosa* SC-10 e cepa isolada) para cada corante (PA210, AA161 e VA357). Segundo Baccar et al., (2011) e Barrasa et al., (2014), o potencial

de descoloração foi confirmado pela aparição de um halo de descoloração ao redor da zona de crescimento do fungo.

3.4 Descoloração em meio líquido

Após triagem em meio sólido, a melhor cepa foi selecionada para descolorir os corantes AA161, PA210, VA357, AA79, LA142 e MA414 em condições de fermentação submersa. Foram preparados 6 meios de cultura líquido (MEB) para cada corante (triplicata para melhor cepa até então, duplicata para *Trametes villosa* SC10 e controle abiótico), totalizando 36 ensaios que permaneceram durante 8 dias em câmara incubadora refrigerada com agitação de Marconi Equipamentos (MA832 – Piracicaba, SP, Brasil) a 30°C e 200 rpm.

Após 8 dias de experimento, os meios líquidos foram filtrados em sistema de filtração à vácuo (Papel filtro de porosidade 6,0 µm). Em seguida, tomaram-se amostras de 3 mL. O filtrado foi usado para medir a absorvância no comprimento de onda máximo de cada corante (λ_{Max}). A descoloração foi medida de acordo com a Equação 1.

Equação 1 - Descoloração (%)

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

Sendo:

$\% Des$: Porcentagem de descoloração obtida

$Abs. i$: Absorvância inicial no λ_{Max}

$Abs. f$: Absorvância final no λ_{Max}

3.5 Cinética de descoloração

Nesta etapa foi realizado um estudo cinético que relacionou a descoloração com a atividade enzimática da lacase e a produção de biomassa para o corante que apresentou os melhores resultados nos experimentos de descoloração em meio líquido. Amostras de 6 mL coletadas assepticamente de cada Erlenmeyer foram centrifugadas a 6000 rpm durante 10 min, e o sobrenadante foi analisado de acordo com os procedimentos analíticos descritos a seguir.

3.6 Procedimentos analíticos

3.6.1 Medição da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada a partir de análise espectrofotométrica. Essa, consistiu em medir, durante 5 min e a $\lambda = 405\text{nm}$, a variação da absorbância levando em conta a reação oxidativa entre o sobrenadante com uma solução de ABTS 1 mM tamponada com Acetato de Sódio 0,2 M a pH 4,5 (HEINZKILL et al., 1998; WANG; NG, 2006). Para cada leitura, foi utilizada a seguinte mistura reacional:

- 750 μL de solução de ABTS tamponada com acetato de sódio;
- 750 μL de sobrenadante do meio de cultura;
- 1500 μL de água destilada.

A Equação 2, considerada uma variante da lei de Lambert-Beer, foi utilizada para quantificar a atividade enzimática, dada em UL^{-1} (sendo $U = \mu\text{mol min}^{-1}$).

Equação 2 - Medida da atividade enzimática para enzima lacase (UL^{-1})

$$AE = \frac{\Delta Abs * Vtotal * 1000 * df}{\epsilon_{sub} * L * Vcaldo * t}$$

Sendo:

AE : Atividade Enzimática (UL^{-1})

ΔAbs : Absorbância final – Absorbância inicial

$Vtotal$: Volume da mistura reacional na cubeta de quartzo (mL)

ϵ_{sub} : Coeficiente de extinção molar do ABTS oxidado ($36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

t : Tempo em minutos

df : Fator de diluição

L : Espessura da cubeta (cm)

$Vcaldo$: Volume de sobrenadante de cada meio de cultura utilizado (mL)

1000: Fator de conversão de mL a L

3.6.2 Medição da descoloração

A descoloração foi medida por espectrofotometria seguindo a metodologia e Equação 1 apresentados na seção 3.4.

3.6.3 Medição da produção de biomassa

A produção de biomassa foi mensurada através do método gravimétrico de peso seco, utilizado por Máximo et al. (2003). Para isso, os meios de cultura foram filtrados em sistema de filtração a vácuo, utilizando papel filtro. Em seguida, os filtros contendo biomassa foram dispostos em placas de Petri e levados para secar em estufa durante 24 horas a 105°C. Passadas as 24 horas, os papéis foram retirados da estufa e pesados em balança analítica. A biomassa seca produzida por litros de meio de cultura foi calculada através da Equação 3.

Equação 3 - Produção de Biomassa (gL^{-1})

$$B = \frac{Fc - F}{V}$$

Sendo:

B: Biomassa gerada na fermentação (gL^{-1})

Fc: Peso final do papel filtro com a biomassa seca (g)

F: Peso do papel filtro (g)

V: Volume do meio de cultura MEB (200mL para todos os casos)

3.7 Identificação molecular da cepa fúngica

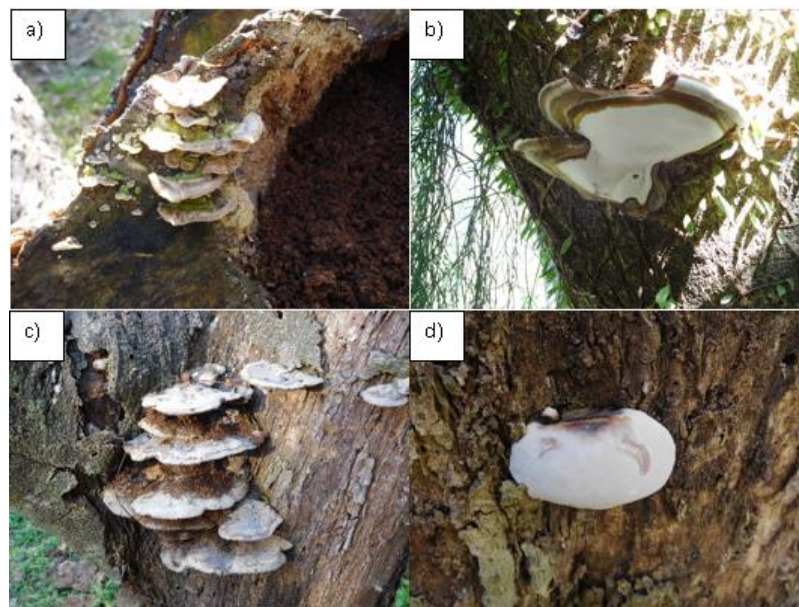
A identificação molecular do isolado que mostrou os melhores resultados foi realizada no laboratório de Micologia, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Esta etapa consistiu na amplificação e análise da sequência do DNA ribossômico (DNAr). Para isso, a cepa foi incubada em MEA (7 dias, 30 °C) e o micélio fresco foi utilizado para extração do DNA genômico usando um kit específico (UltraClean[®] Soil DNA - MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA).

4 Resultados e Discussão

4.1 Coleta e isolamento de fungos nativos

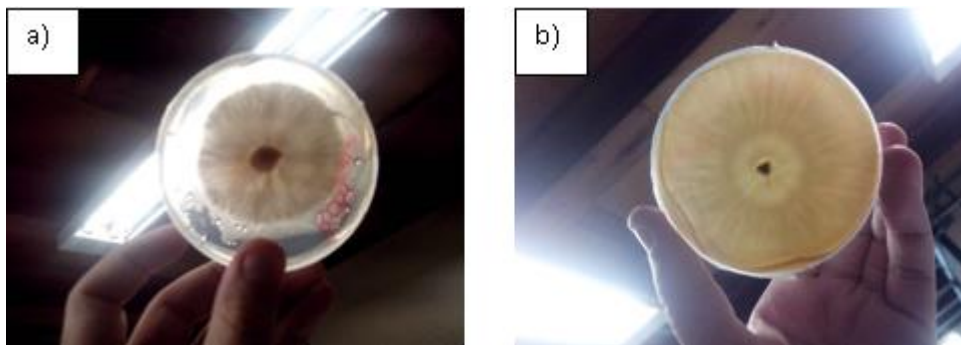
Foram coletadas quinze amostras de basidiocarpos crescendo em árvores ou em galhos no chão, em sua grande parte, apresentando características similares aos gêneros *Trametes* e *Coriolopsis*. Para efeito de identificação, cada amostra foi nomeada de acordo com o local de coleta (Parque Redenção-PR) e ordem cronológica, a saber: PR01, PR02, até o último fungo PR15. A Figura 2, mostra algumas das amostras coletadas “*in natura*”.

Figura 2 - Amostras *in natura* de basidiocarpos dos fungos coletados: a) PR01; b) PR05; c) PR12; d) PR14



Após coleta, as amostras seguiram para a etapa de isolamento. Por mais que a metodologia de coleta e isolamento tenham sido seguidas com todos os cuidados possíveis, apenas duas amostras conseguiram ser isoladas no meio MEA, a saber, os fungos PR01 e PR14. Essas cepas apresentaram grandes semelhanças visuais com a cepa SC10 isolada por Ortiz-Monsalve, (2015), pois cresceram em disposição concêntrica em relação ao inóculo, sem a presença de outros micro-organismos e com micélio apresentando coloração branca. A Figura 3 mostra as amostras referidas, após sete dias de incubação em MEA.

Figura 3 - Isolados puros após sete dias de incubação em meio MEA a 30°C: a) PR01; b) PR14



Por outro lado, a contaminação cruzada com outros micro-organismos ambientais, tais como bactérias, leveduras e outros fungos fizeram com que o isolamento das amostras PR03, PR04, PR05, PR07, PR10, PR11, PR12 e PR13 não fosse possível. A extensão da contaminação dessas amostras, não deu a possibilidade de se tentar realizar repicagens sucessivas. A Figura 4 mostra algumas das amostras que não conseguiram ser isoladas, destacando-se a extensão da contaminação devido à presença de grânulos de diversas colorações e tamanhos, caracterizando a contaminação por colônias bacterianas e leveduras.

Figura 4 - Amostras após sete dias de incubação em meio MEA a 30°C que apresentaram contaminação cruzada: a) PR05; b) PR07; c) PR10



As demais amostras (PR02, PR06, PR08, PR09 e PR15), no primeiro momento, não foram isoladas puras e nem obtiveram grau elevado de contaminação. Dessa maneira, repicagens sucessivas foram aplicadas a elas buscando culturas puras. Esperou-se mais uma semana, para verificar o crescimento do micélio de cada amostra. Passado esse período, apenas o fungo PR15 não foi isolado.

Concluída a primeira etapa experimental, de quinze amostras, seis seguiram para as triagens em meio sólido (PR01, PR02, PR06, PR08, PR09 e PR14).

4.2 Triagem em meio sólido

4.2.1 Avaliação qualitativa de atividade enzimática

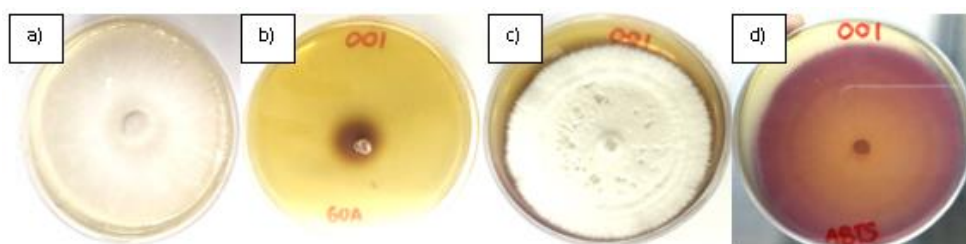
Nesse ensaio qualitativo, as cepas isoladas (PR01, PR02, PR06, PR08, PR09 e PR14) foram avaliadas quanto à produção de enzimas ligninolíticas. Os resultados obtidos para elas foram comparados com o que foi obtido pela cepa de referência (*Trametes villosa* SC10) e com resultados da literatura.

Das seis cepas avaliadas nesse ensaio, três apresentaram atividade enzimática. As cepas PR06, PR08 e PR14 cresceram em meios MEA complementados com os indicadores enzimáticos (ABTS, GUA e CM) sem apresentar qualquer reação, portanto, não sendo identificada a existência de atividade das enzimas avaliadas.

As cepas PR01, PR02 e PR09 foram capazes de oxidar o substrato Guaiacol, do meio MEA contendo GUA, formando um halo marrom avermelhado ao redor da zona de crescimento. O mesmo resultado foi obtido para o controle positivo utilizado (estudo contendo o isolado SC10), confirmando a produção de enzimas oxidases e/ou peroxidases extracelulares. Entretanto, as mesmas cepas não apresentaram formação de flocos marrons no meio de cultura MEA contendo CM o que iria sugerir produção da enzima peroxidase dependente de manganês, responsável por oxidar o cloreto de manganês II presente no meio, como reportaram Jarosz-Wilkolazka et al.,(2002) e Hernández-Luna et al., (2008).

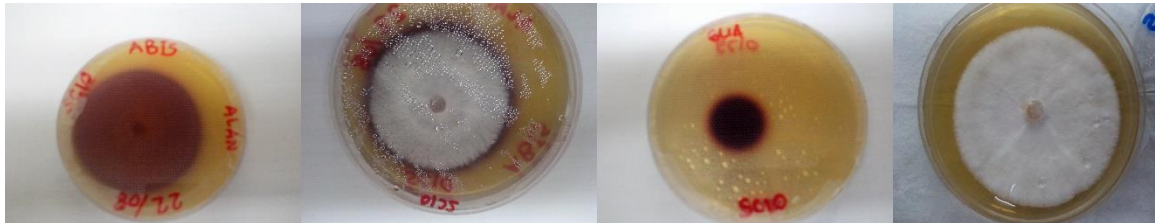
Em relação ao meio MEA contendo ABTS, somente o fungo PR01 apresentou produção da enzima lacase. Isso foi identificado devido à formação de um halo escuro de cor roxa ao redor do micélio, de mesma extensão, cor e tonalidade observada no controle positivo (isolado SC10). A Figura 5 mostra a produção de enzimas ligninolíticas pela cepa PR01.

Figura 5 - Ensaio de produção de enzimas ligninolíticas: a) PR01 em MEA após 7 dias (controle); b) PR01 em meio MEA com GUA após 5 dias (vista superior); c) PR01 em MEA com ABTS após 5 dias (vista superior); d) PR01 em MEA com ABTS após 5 dias (vista inferior).



De maneira a confirmar a produção de lacase para o fungo PR01, a Figura 6 mostra os controles positivos utilizados nesse estudo (isolado SC10 em MEA nos meios com GUA, ABTS e CM).

Figura 6 - Controles positivos inoculados com isolado SC10 em MEA na presença de indicadores enzimáticos após 6 dias de incubação.

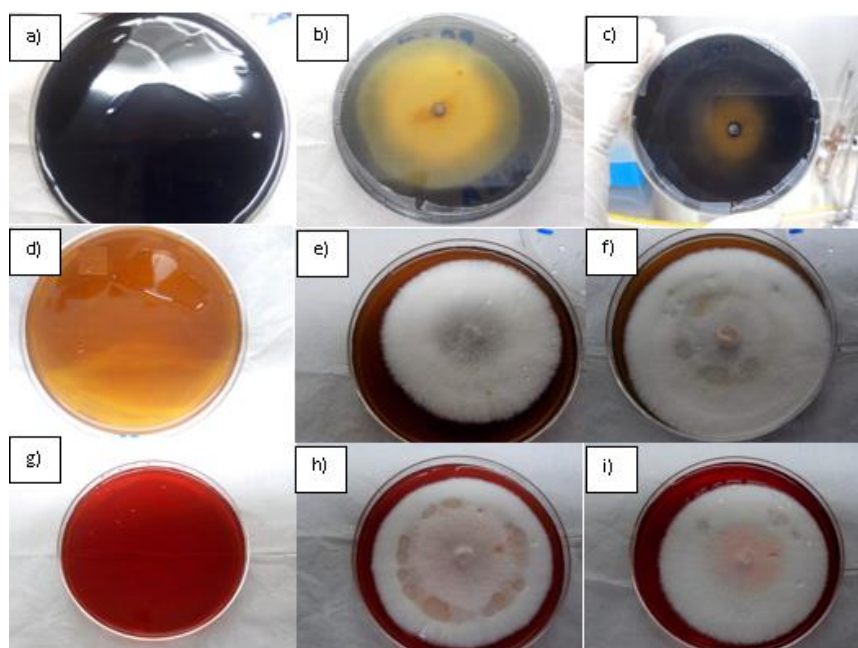


A comparação de resultados (controles positivos x PR01) comprovou que o fungo PR01 produziu as enzimas lacase e oxidases e/ou peroxidases extracelulares, sendo único fungo selecionado para seguir no ensaio de descoloração em meio sólido.

4.2.2 Avaliação do potencial de descoloração

Nessa etapa, o isolado PR01, foi avaliado para descolorir os corantes AA161, PA210 e VA357 em meio MEA. Para comparação de resultados, foram utilizados: controle abiótico e controle positivo (placa inoculada com o isolado SC10), conforme mostra a Figura 7.

Figura 7 - Descoloração de corantes em meio MEA, após 7 dias de incubação a 30°C. Corante AA161: a) Controle abiótico; b) PR01; c) SC10. Corante PA210: d) Controle abiótico; e) PR 01; f) SC10. Corante VA357: g) Controle abiótico; h) PR 01 e i) SC10



O potencial de descoloração do isolado PR01 foi confirmado, pois foi observado um halo de descoloração ao redor do micélio em crescimento em todos os corantes, bem como a diminuição da intensidade da cor conforme os estudos realizados por Barrasa et al., (2014) que observaram o mesmo comportamento ao descolorir, em meio sólido os corantes *Reactive Blue 38* e *Reactive Black 5*.

4.3 Descoloração em meio líquido

Após notório potencial do isolado *Trametes* sp. PR01 para descolorir os corantes AA161, PA210 e VA357 em meio sólido, avaliou-se seu potencial para descoloração em meio líquido desses corantes e de outros três (AA79, MA414 e LA142). Para comparação de resultados, a cepa *Trametes villosa* SC10 também foi avaliada.

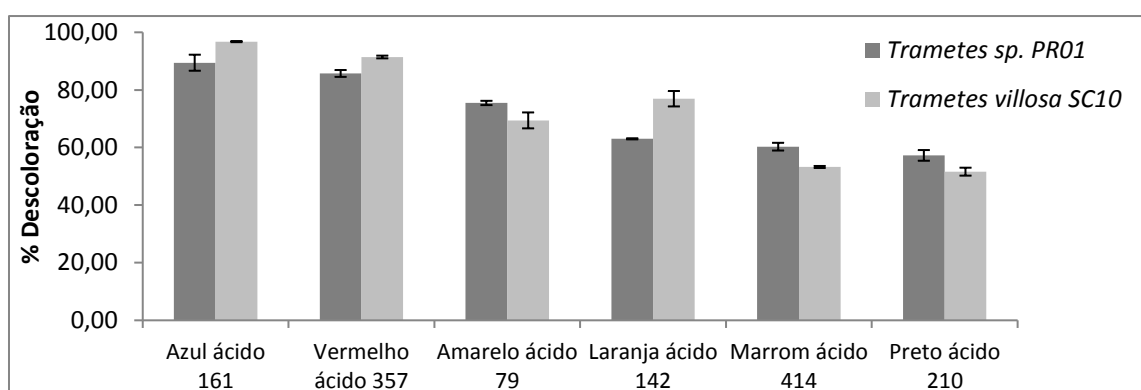
Após 8 dias de incubação, em fermentação submersa sob condições específicas (30°C e 200 rpm) as cepas PR01 e SC10 atingiram bons valores de descoloração. A Tabela 5 e a Figura 8 exibem os resultados, sendo os valores de descoloração obtidos através da média de três e duas repetições independentes, para as cepas PR01 e SC10, respectivamente.

Tabela 5 - Descoloração em meio líquido de seis corantes para couro utilizando os isolados nativos *Trametes* sp. PR01 e *T. villosa* SC10

Fungo	Descoloração de corantes para couro (%)					
	AA161	VA357	AA79	LA142	MA414	PA210
<i>Trametes</i> sp. PR01	89,44 ± 2,78	85,71 ± 1,20	75,47 ± 0,74	63,02 ± 0,19	60,29 ± 1,34	57,27 ± 1,85
<i>T. villosa</i> SC10	96,78 ± 0,20	91,43 ± 0,47	69,42 ± 2,77	76,94 ± 2,68	53,25 ± 0,35	51,62 ± 1,38

AA161: Azul ácido 161; VA357: Vermelho ácido 357; AA79: Amarelo ácido 79; LA142: Laranja ácido 142; MA414: Marrom ácido 414; PA210: Preto ácido 210. Os valores de descoloração são média de três e duas repetições independentes, para *Trametes* sp. PR01 e *T. villosa* SC10, respectivamente complementados com o desvio padrão.

Figura 8 - Descoloração em meio líquido de seis corantes para couro utilizando os isolados nativos *Trametes* sp. PR01 e *T. villosa* SC10



A Figura 9 e Figura 10, mostram, qualitativamente a descoloração para cada corante obtida pelo isolado *Trametes* sp. PR01 e *T. villosa* SC10. Ficando à esquerda de cada figura o Erlenmeyer com controle abiótico. Os espectros de absorção gerados para a avaliação quantitativa da descoloração podem ser vistos no Apêndice D.

Figura 9 - Avaliação qualitativa de remoção de cor, em ordem da esquerda para direita e de cima para baixo, pelo isolado *Trametes* sp. PR01 dos corantes: AA161, VA357, AA79, LA142, PA210 e MA414. Todas as fotos foram tiradas de amostras filtradas após 8 dias de incubação em meio MEB a 30°C e 200 rpm.



Diante desses resultados, observou-se que a maior e menor remoção de cor para ambos os isolados foram para os corantes AA161 e PA210, respectivamente. De acordo com Kaushik; Malik, (2009) isso pode ser relacionado com as características e estrutura química desses corantes, pois estes diferem na quantidade de ligações azo e grupos doadores e aceptores de elétrons presentes em sua estrutura (ver Apêndice B).

Levando em conta a notória e comprovada habilidade do isolado SC10 para descolorir corantes para o couro segundo trabalho de Ortiz-Monsalve, (2015), seria interessante para o andamento do estudo trabalhar com corantes que o isolado PR01 apresentou melhor descoloração que o isolado SC10 (o que ocorreu com os corantes AA79, PA210 e MA414). Entretanto, dentre esses três corantes, o AA79 obteve resultados mais expressivos. Por

esse motivo, esse corante foi escolhido para relacionar a descoloração com a atividade enzimática da lacase e a produção de biomassa.

Figura 10 - Avaliação qualitativa de remoção de cor, em ordem da esquerda para direita e de cima para baixo, pelo isolado *Trametes villosa* SC10 dos corantes: AA161, VA357, AA79, PA210, MA414 e LA142. Todas as fotos foram tiradas de amostras filtradas após 8 dias de incubação em meio MEB a 30°C e 200 rpm.



4.4 Identificação molecular do isolado *Trametes* sp. PR01

A identificação molecular do isolado *Trametes* sp. PR01 foi realizada após os resultados obtidos nos ensaios de descoloração em meio líquido, quando essa cepa demonstrou uma boa capacidade de remoção de cor. Seguindo a metodologia abordada na seção 3.7, o micro-organismo isolado *Trametes* sp. PR01 foi identificado com uma identidade de 99 % como *Trametes villosa*.

4.5 Cinética de descoloração

4.5.1 Descoloração associada à atividade enzimática

A Tabela 6, mostra os resultados de descoloração do corante AA79 em relação à atividade enzimática da lacase. Em seguida, a Figura 11 ilustra um gráfico com esses dados.

Neste ensaio, a descoloração do corante AA79 e a produção da lacase pelo isolado PR01 foram medidas a cada 24 horas. A maior atividade enzimática foi alcançada em 72 h de tratamento ($338,370 \pm 8,066 \text{ UL}^{-1}$), entretanto o isolado PR01 apresentou uma notória atividade enzimática a partir das primeiras 24 h de tratamento ($21,185 \pm 1,561 \text{ UL}^{-1}$), chegando a $276,741 \pm 12,613 \text{ UL}^{-1}$ após transcorridas 48 h.

A hipótese de que a descoloração esteve associada ao mecanismo de biodegradação dos WRF através da ação de enzimas ligninolíticas (enzima lacase para esse caso) foi confirmada. Isso porque, durante todo o período de tratamento que a atividade enzimática teve valores significativos (48 h – 120 h) a descoloração atingida passou de $27,77 \pm 1,69 \%$ para $80,92 \pm 1,45 \%$, evidenciando o progresso da descoloração em virtude da presença da enzima lacase. Os autores Asgher; Shah; Iqbal, (2016); Kunjadia et al., (2016) e Lu et al., (2016) conseguiram resultados similares aos obtidos nesse estudo, e destacaram em seus estudos a relação direta entre atividade da lacase e a descoloração alcançada.

Por outro lado, Lu et al., (2016) monitoraram a atividade enzimática e descoloração com e sem presença do agente inibidor ácido Kójico para descoloração do corante *Remazol Brilliant Blue R*. Os autores reportaram que a descoloração obtida na presença do agente inibidor atingiu somente 23,2 % após 30 horas de tratamento, e nas mesmas condições sem o agente inibidor alcançou 90,4 %. Dessa maneira, comprovaram a relação direta entre descoloração e atividade enzimática da lacase.

Tabela 6 - Cinética de descoloração do corante AA79 e atividade enzimática da lacase utilizando o isolado nativo *T.villosa* PR01.

Tempo (h)	Descoloração (%)	Atividade Enzimática para lacase - AE (UL^{-1})
0	0,00	0,000
24	$5,39 \pm 1,35$	$21,185 \pm 1,561$
48	$27,77 \pm 1,69$	$276,741 \pm 12,613$
72	$43,09 \pm 6,35$	$338,370 \pm 8,066$
96	$55,59 \pm 2,63$	$299,852 \pm 8,078$
120	$80,92 \pm 1,45$	$261,037 \pm 12,899$
144	$81,34 \pm 1,48$	$45,926 \pm 4,794$
168	$81,75 \pm 1,87$	$14,667 \pm 8,444$

Os valores de descoloração e de atividade enzimática foram obtidos através da média entre três repetições independentes, complementados com o desvio padrão.

Figura 11 - Relação entre descoloração do corante AA79 e atividade da enzima lacase pelo isolado nativo *Trametes villosa* PR01. As barras indicam o desvio padrão entre três repetições.

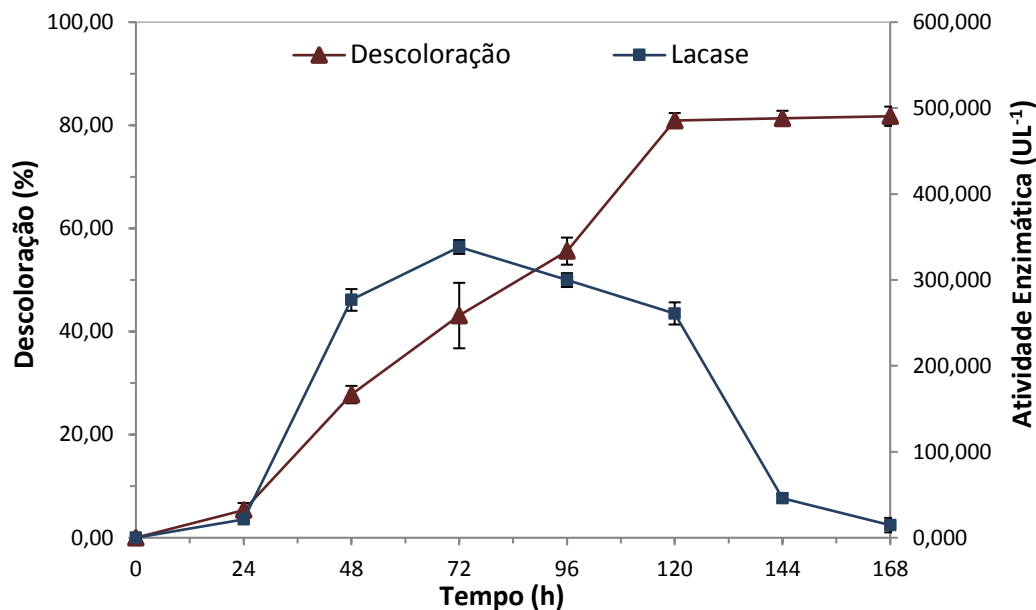
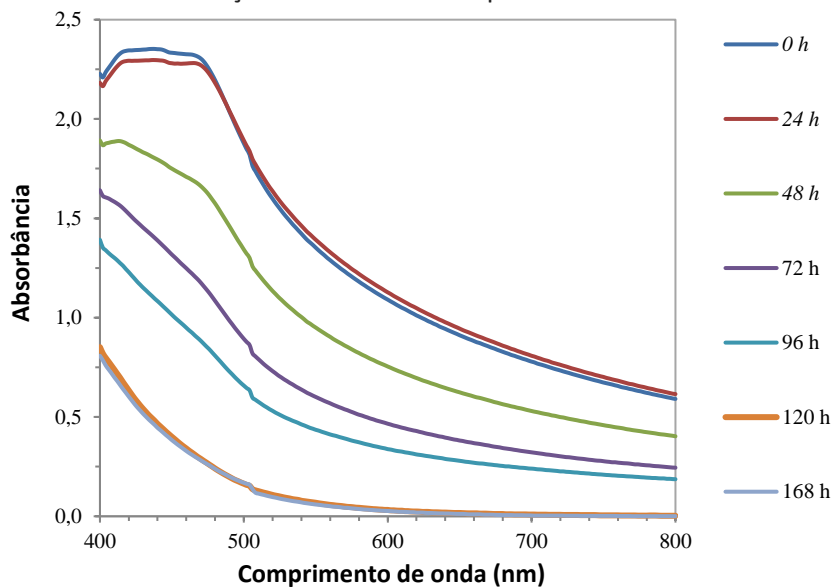


Figura 12 - Comparativo diário dos espectros de absorção na região da luz visível (400 – 800nm) obtidos durante a descoloração do corante AA79 pelo isolado nativo *Trametes villosa* PR01.



4.5.2 Descoloração associada à biomassa produzida

Ao final das 168 horas de experimento cinético, a triplicata contendo o isolado PR01 foi filtrada e seguiu-se o procedimento descrito na seção 3.6.3. Os resultados obtidos, relacionando a biomassa gerada com a descoloração alcançada e atividade enzimática máxima obtidas nos estudos independentes, são mostrados na Tabela 7.

Os resultados indicaram que a maior descoloração e atividade enzimática máxima obtidas foram da amostra que obteve a maior biomassa gerada. Entretanto, esses resultados não avaliaram o progresso da biomassa com o tempo, o que seria essencial para avaliar, mesmo que qualitativamente, o envolvimento de outro mecanismo de descoloração, como por exemplo a bioissorção.

Tabela 7 - Biomassa gerada com a descoloração e atividade enzimática máxima atingidas para o tempo de 168 horas.

Amostra	Biomassa gerada (gL⁻¹)	Descoloração atingida (%)	Atividade Enzimática Máxima observada (UL⁻¹)
PR01A	4,72	83,81	347,556
PR01B	4,66	80,15	335,111
PR01C	4,71	81,3	332,444

Por mais que se tenha destacado a influência da enzima lacase na descoloração do corante AA79 nesse estudo, não se pode descartar a participação de outro mecanismo de bioissorção envolvido. Isso é baseado nas conclusões a que Chen e Ting, (2015) chegaram ao descolorir os corantes *Crystal Violet*, *Methyl Violet*, *Cotton Blue* e *Malachite Green* a partir do isolado *Corioloopsis* sp. 1c3, pois houve participação dos mecanismos de bioissorção e de biodegradação por ação da lacase.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Pelo presente trabalho, confirmou-se a capacidade que os fungos de podridão branca têm para descolorir corantes para couro. O isolado nativo *Trametes villosa* PR01, através do mecanismo de biodegradação por ação da enzima lacase foi capaz de descolorir corantes utilizados na etapa de tingimento do couro, obtendo melhores resultados para o corante AA79. Essa conclusão foi tirada a partir de muitos resultados obtidos ao longo do trabalho:

- A metodologia de coleta e isolamento foi considerada simples, entretanto essa deve ser aperfeiçoada ou realizada com mais cautela, pois muitas amostras coletadas foram perdidas devido à contaminação cruzada com outros micro-organismos (do total de 15 amostras, somente 6 foram isoladas);

- A triagem em meio sólido para avaliação da produção de enzimas ligninolíticas foi satisfatória, visto que 3 das 6 amostras analisadas apresentaram alguma atividade enzimática de acordo com a literatura. Entretanto, o isolado PR01 se destacou dos demais, por produzir lacase e/ou peroxidases extracelulares;

- A triagem em meio sólido para verificar o potencial de descoloração também foi satisfatória, visto que o isolado PR01 conseguiu descolorir em parte todos os corantes testados;

- Em meio líquido, o fungo PR01 apresentou bons resultados, destacando-se a descoloração do corante AA79 ($75,47 \pm 0,74$ %) superior à do fungo SC10 ($69,42 \pm 2,77$ %), motivo que levou o estudo cinético ser realizado com o corante AA79;

- Os métodos analíticos utilizados para cinética de descoloração evidenciaram o mecanismo de biodegradação, através da ação da enzima lacase, como um dos responsáveis pela descoloração do corante AA79 pelo isolado PR01. Entretanto, outros mecanismos como bioadsorção que poderiam estar envolvidos não foram estudados.

Por fim, os resultados obtidos confirmaram que fungos nativos, principalmente os WRF têm habilidade para descolorir corantes para o tingimento do couro. Esse estudo, ainda em fase inicial, pode ter continuidade em diversas pesquisas, pois a cepa PR01 pode ser testada para: tratar efluentes reais de curtumes; modelar biorreatores imobilizados em diferentes escalas de operação; otimizar a descoloração dos mesmos corantes através de

estudo monovariável; verificar a extensão e influência dos outros mecanismos de degradação como cinética de adsorção, isolar enzima lacase para outros fundamentos, etc.

6 Referências

ADNAN, L. A. et al. Biodegradation pathway of acid red 27 by white-rot fungus *Armillaria* sp. f022 and phytotoxicity evaluation. **Clean – soil, air, water**, 2016. v. 44, n. 3, p. 239–246.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process biochemistry**, 2005. v. 40, n. 3, p. 997–1026.

AKSU, Z.; TEZER, S. Equilibrium and kinetic modelling of biosorption of remazol black b by *rhizopus arrhizus* in a batch system: effect of temperature. **Process biochemistry**, 2000. v. 36, n. 5, p. 431–439.

ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes: a review. **Water, air, & soil pollution**, 2010. v. 213, n. 1–4, p. 251–273.

ASGHER, M.; SHAH, S. A. H.; IQBAL, H. M. N. Statistical correlation between ligninolytic enzymes secretion and remazol brilliant yellow-3gl dye degradation potential of *Trametes versicolor* IBL-04. **Water environment research**, 2016. v. 88, n. 4.

AYAD, M. M.; EL-NASR, A. A. Anionic dye (acid green 25) adsorption from water by using polyaniline nanotubes salt/silica composite. **Journal of nanostructure in chemistry**, 2012. v. 3, n. 1, p. 3.

BACCAR, R. et al. Decolorization of a tannery dye: from fungal screening to bioreactor application. **Biochemical engineering journal**, out. 2011. v. 56, n. 3, p. 184–189.

BALAKRISHNAN, P. A.; ARUNAGIRI, A.; RAO, P. G. Ozone generation by silent electric discharge and its application in tertiary treatment of tannery effluent. **Journal of electrostatics**, 2002. v. 56, n. 1, p. 77–86.

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**, 2014. v. 72, p. 106–114.

BETTS, W. B. et al. Biosynthesis and structure of lignocellulose. *In*: BETTS, W. B. (Org.). **Biodegradation: natural and synthetic materials**. London: Springer London, 1991, p. 139–155.

BOYLE, C. D.; KROPP, B. R.; REID, I. D. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. **Applied and environmental microbiology**, 1992. v. 58, n. 10, p. 3217–3224.

CHEN, S. H.; TING, A. S. Y. Biodecolorization and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Corioloopsis* sp. isolated from compost. **Journal of environmental management**, 2015. v. 150, p. 274–280.

CICB. Centro das indústrias de Curtume do Brasil. Disponível em <<http://www.cicb.org.br/?p=13817>>. Acesso em: 13 nov.2016

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

DEVECI, E. Ü. et al. Degradation of recalcitrant textile dyes by coupling fungal and photocatalytic membrane reactors. **Clean - soil, air, water**, 2016. v. 44, n. 10, p. 1345–1351.

FUCK, W. F. ; GRASELLI, L. P.; GUTTERRES, M. Estado da arte e desenvolvimento de biocorantes produzidos por fungos para tingimento de couro. **Xviii congresso latino americano dos químicos e técnicos da indústria do couro**, 2012 , Montevideo 2012. n. Xviii.

FUCK, W. F. Influência do teor de cromo e do tipo de óleo na formação de cromo hexavalente no couro. Tese de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2008.

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

GALLEGO-MOLINA, A. et al. Reducing pollution from the deliming--bating operation in a tannery. wastewater reuse by microfiltration membranes. **Chemical engineering research and design**, 2013. v. 91, n. 2, p. 369–376.

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

GOMES, C. S. Otimização da operação de adsorção no tratamento de efluentes de tingimento de couro. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

GÓMEZ-BERTEL, S. et al. Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles. **Revista internacional de contaminación ambiental**, 2008. v. 24, n. 3, p. 93–106.

GROWTHER, L. et al. Biotechnological approaches to combat textile effluents. **The internet journal of microbiology**, 2008. v. 7, n. 1, p. 1–7.

GÜRSES, A. et al. **Dyes and pigments**. Springer, 2016.

GUTTERRES, M. et al. Characterisation of raw wastewater from tanneries. **Journal of the society of leather technologists and chemists**, 2015. v. 99, n. 6, p. 280–287.

HEINZKILL, M. et al. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family coprinaceae). **Applied and environmental microbiology**, 1998. v. 64, n. 5, p. 1601–1606.

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

HIJAZI, A. et al. Biosorption of methylene blue from waste water using Lebanese

cymbopogon citratus (citronnelle). **European scientific journal**, 2015. v. 11, n. 21, p. 293–307.

HUNGER, K. **Industrial dyes: chemistry, properties, applications**. Freiburg: Wiley, 2003.

IACONI, C. DI; RAMADORI, R.; LOPEZ, A. The effect of ozone on tannery wastewater biological treatment at demonstrative scale. **Bioresource technology**, 2009. v. 100, n. 23, p. 6121–6124.

IMMICH, A. P. S. et al. Removal of remazol blue rr dye from aqueous solutions with neem leaves and evaluation of their acute toxicity with daphnia magna. **Journal of hazardous materials**, 2009. v. 164, n. 2, p. 1580–1585.

IQBAL, M. **Textile dyes**. Rehbar Publishers Karachi, 2008.

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

JOTHIVENKATACHALAM, J.; KARTHIKEYAN, K. . Removal of acid yellow 17 dye from aqueous solution using turmeric industrial waste activated carbon. **Journal of environmental nanotechnology**, 2013. v. 3, p. J. Environ. Nanotechnol. Volume 3, No.2 p. 69–80.

KANTH, S. V et al. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. cited By 27: **Dyes and pigments**, 2008. v. 76, n. 2, p. 338–347.

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

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Mycoremediation of synthetic dyes: an insight into the mechanism, process optimization and reactor design. **Microbial degradation of synthetic dyes in wastewaters se - 1**. Environmental Science and Engineering. 1. ed. Springer International Publishing, 2015, p. 1–25.

KIISKINEN, L.-L.; RÄTTÖ, M.; KRUIUS, K. Screening for novel laccase-producing microbes. **Journal of applied microbiology**, 2004. v. 97, n. 3, p. 640–646.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. wiley, new york**, 1998. p. 273–307.

KUNJADIA, P. D. et al. Role of ligninolytic enzymes of white rot fungi (*Pleurotus* sp.) grown with azo dyes. **Springerplus**, 2016. v. 5, n. 1.

LING, Z. et al. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes* sp . LAC-01. **International journal of biological macromolecules**, 2015. v. 81, p. 785–793.

LOURDES, M. De et al. **Fungal enzymes**. CRC Press: Taylor & Francis Group, 2014.

LU, R. et al. White-rot fungus *Ganoderma* sp . en3 had a strong ability to decolorize and

tolerate the anthraquinone , indigo and triphenylmethane dye with high concentrations. 2016. p. 381–390.

MAHBUB, K. R. et al. Decolourization of novacron blue and novacron super black azo dyes by *Bacillus* sp isolated from textile effluents in bangladesh. **Journal of scientific research**, 2015. v. 7, n. 1–2, p. 45–53.

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

MOTA, T. R. et al. Decolourization of congo red by ganoderma lucidum laccase: evaluation of degradation products and toxicity. **Water, air, & soil pollution**, 2015. v. 226, n. 10, p. 351.

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**, 2006.

ORTIZ-MONSALVE, S. Estudos de descoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa* SC10. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2015.

PAZARBASI, M. B. et al. Decolorization of various leather dyes and leather industry effluent by *Trametes troglitii* TEMH2. **Fresenius environmental bulletin**, 2012. n. 21, p. 1410–1416.

PELCZAR, J. et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Pearson Makron Books, 2005.

PICCIN, J. S. Resíduo sólido da indústria coureira como adsorvente alternativo de corantes. Tese de Doutorado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

PICCIN, J. S. et al. Color removal from real leather dyeing effluent using tannery waste as an adsorbent. **Journal of environmental chemical engineering**, 2016. v. 4, n. 1, p. 1061–1067.

PUCHANA-ROSETO, M. J. et al. Microwave-assisted activated carbon obtained from the sludge of tannery-treatment effluent plant for removal of leather dyes. **Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects**, 2016. v. 504, p. 105–115.

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**, 2004. v. 4, n. 3, p. 233–238.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Degradation of azo dyes by white-rot fungi. In: SINGH, S. N. (Org.). **Microbial degradation of synthetic dyes in wastewaters se - 14**. Environmental Science and Engineering. New York: Springer International Publishing, 2015, p. 315–331.

SANGHI, R.; VERMA, P. Decolorisation of aqueous dye solutions by low-cost adsorbents: a review. **Coloration technology**, 2013. v. 129, n. 2, p. 85–108.

SANTOS, G. C.; CORSO, C. R. Comparative analysis of azo dye biodegradation by *aspergillus oryzae* and *phanerochaete chrysosporium*. **Water, air, & soil pollution**, 2014. v. 225, n. 7, p. 1–11.

SANTOS, M. L. DOS. Influência das propriedades dos óleos e das variáveis do processo de engraxe na obtenção de couros macios. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

SHAH, M. Effective treatment systems for azo dye degradation: a joint venture between physico-chemical & microbiological process. **International journal of environmental bioremediation & biodegradation**, 2014. v. 2, n. 5, p. 231–242.

SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes e a review. **International biodeterioration & biodegradation**, 2015. v. 104, p. 21–31.

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

VIGANNICO, I. Utilização de hidrolisado proteico de couro como produto recurtente. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*. **Applied microbiology and biotechnology**, 2006. v. 69, n. 5, p. 521–525.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied biochemistry and biotechnology**, 2009. v. 157, n. 2, p. 174–209.

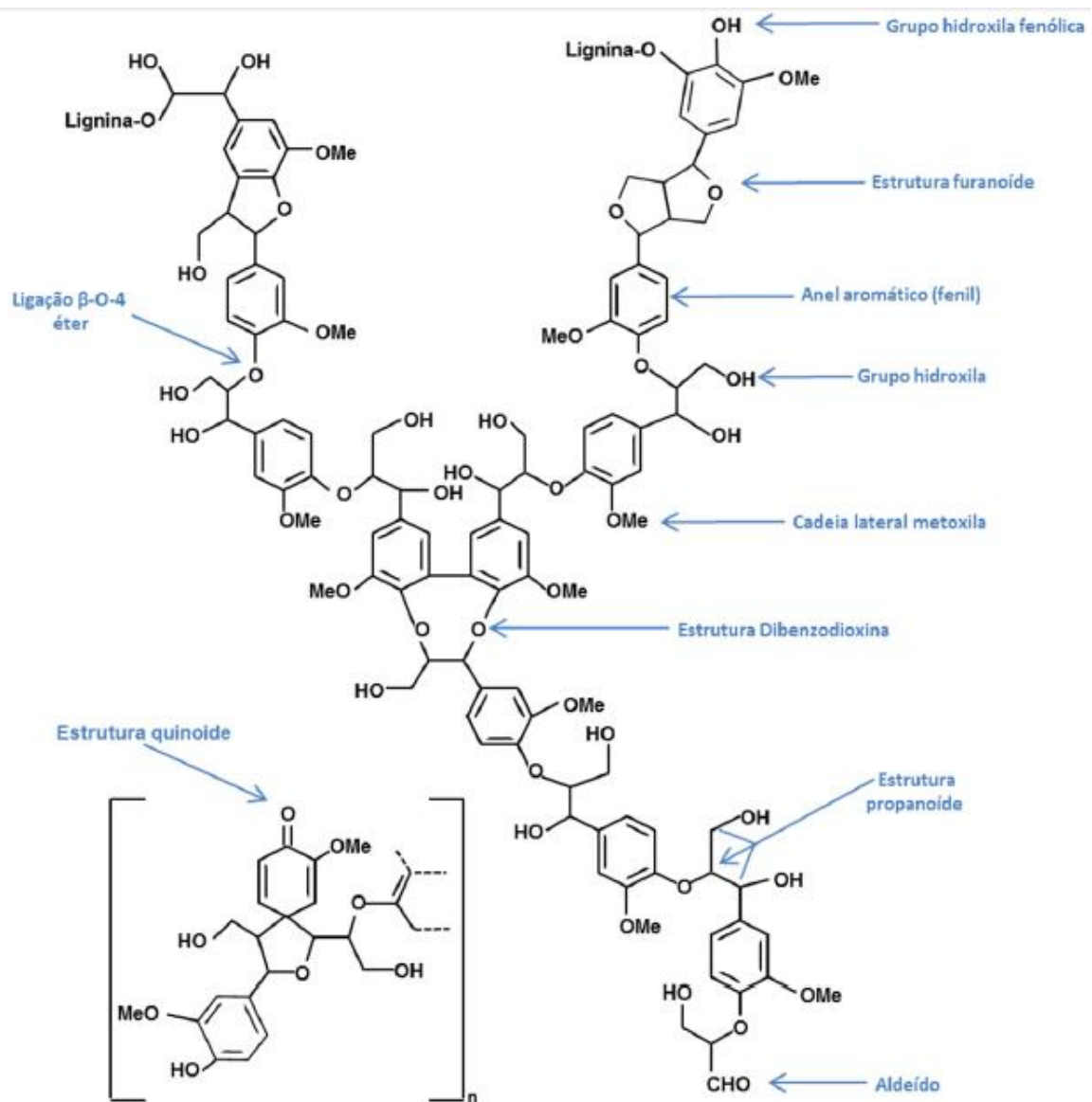
YAGUB, M. T. et al. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review. **Advances in colloid and interface science**, 2014. v. 209, p. 172–184.

YILDIRIM, S. C.; YESILADA, O. A comparative study on decolorization of reactive azo and indigoid dyes by free/immobilized pellets of *trametes versicolor* and *funalia trogii*. **Journal of environmental biology**, 2015. v. 36, n. 6, p. 1393–1400.

ZULETA-CORREA, A. et al. Use of white rot fungi in the degradation of an azo dye from the textile industry. **Universidad Nacional de Colombia**, 2016. v. 83, n. 198, p. 128–135.

Apêndices

Apêndice A – Estrutura Molecular da Lignina

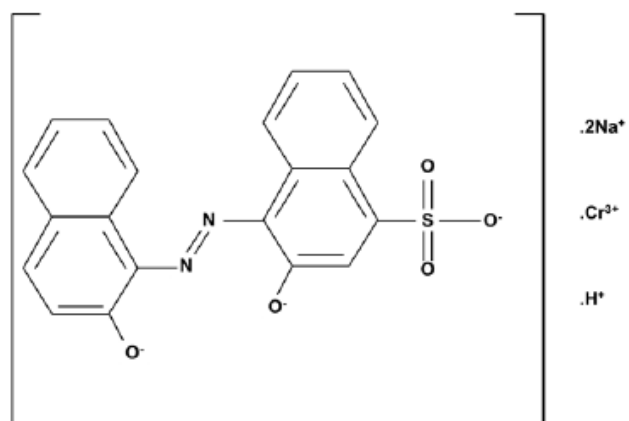


Modelo de estrutura química da lignina. Indicados em azul, estruturas que têm similaridade com estruturas de corantes sintéticos.

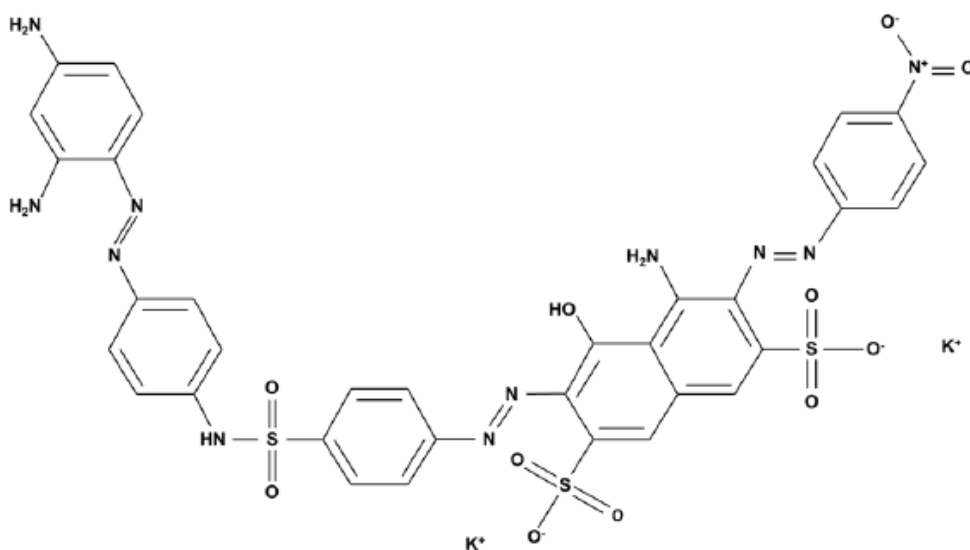
Apêndice B – Pesquisas sobre biodescoloração de corantes envolvendo o uso de WRF publicadas entre 2015 e 2016.

Referência	Espécie Fúngica	Corante(s) utilizado(s)	Tempo de tratamento (dias)	% Descoloração
ZULETA-CORREA et al., (2016)	<i>T.versicolor</i>	<i>Basic Red 46</i>	17	63,00
	<i>Pleurotus pulmonarius</i>		25	63,10
	<i>P. ostreatus</i>		25	69,30
ADNAN et al., (2016)	<i>Armillaria</i> sp. F022	<i>Acid Red 27</i>	3	97,17
LU et al., (2016)	<i>Ganoderma</i> sp.En3	<i>Remazol Brilliant Blue R</i>	4	97,00
		<i>Indigo carmine</i>		98,20
		<i>Methyl green</i>		93,70
KUNJADIA et al., (2016)	<i>P. ostreatus</i>	Mistura de três corantes azoicos (<i>Coralene Golden Yellow, Coralene Navy Blue e Coralene Dark Red</i>)	3	88,00
	<i>P. sapidus</i>			92,00
	<i>P. florida</i>			98,00
ASGHER; SHAH; IQBAL, (2016)	<i>T. versicolor</i> IBL-04	<i>Remazol Brilliant Yellow 3-GL</i>	7	93,5
DEVECI et al., (2016)	<i>P. chrysosporium</i>	<i>Acid Red 88</i>	7	99,90
		<i>Reactive Red 180</i>		
LING et al., (2015)	<i>Trametes</i> sp. LAC-01	<i>Bromothymol Blue</i>	2	65,40
		<i>Malachite Green</i>		75,80
MOTA et al., (2015)	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Direct Red 28</i>	6 horas	80,00
YILDIRIM; YESILADA, (2015)	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Acid Blue 74</i>	2 horas	96,00
		<i>Reactive Blue 198</i>		87,00
	<i>Funalia trogii</i>	<i>Acid Blue 74</i>		94,00
		<i>Reactive Blue 198</i>		84,00
CHEN; TING, (2015)	<i>Corioloipsis</i> sp. 1c3	<i>Crystal Violet</i>	7	94,00
		<i>Methyl Violet</i>		97,00
		<i>Malachite Green</i>	9	52,00

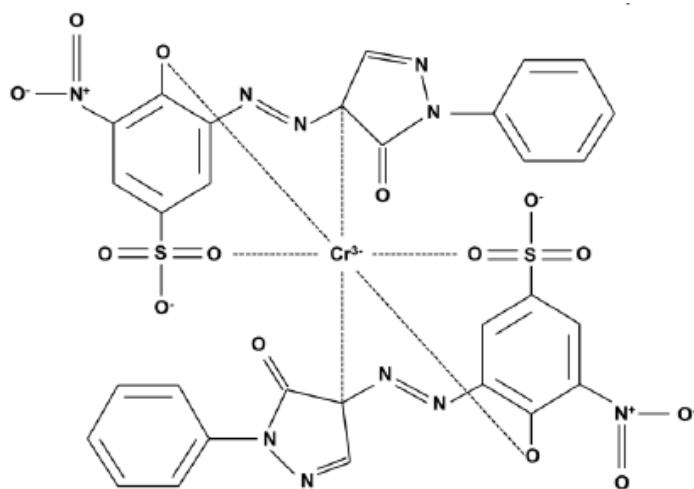
Apêndice C – Estrutura Molecular dos Corantes



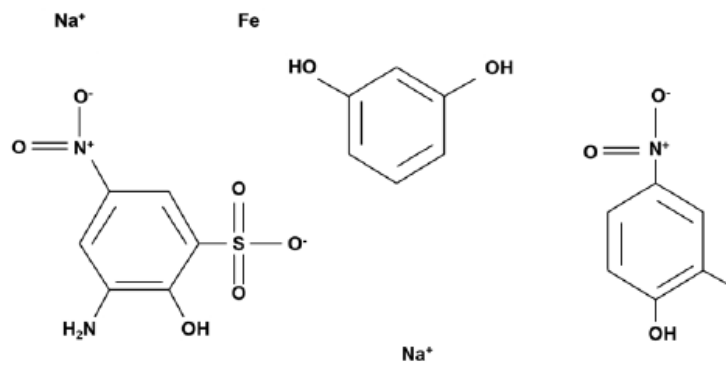
Azul ácido 161



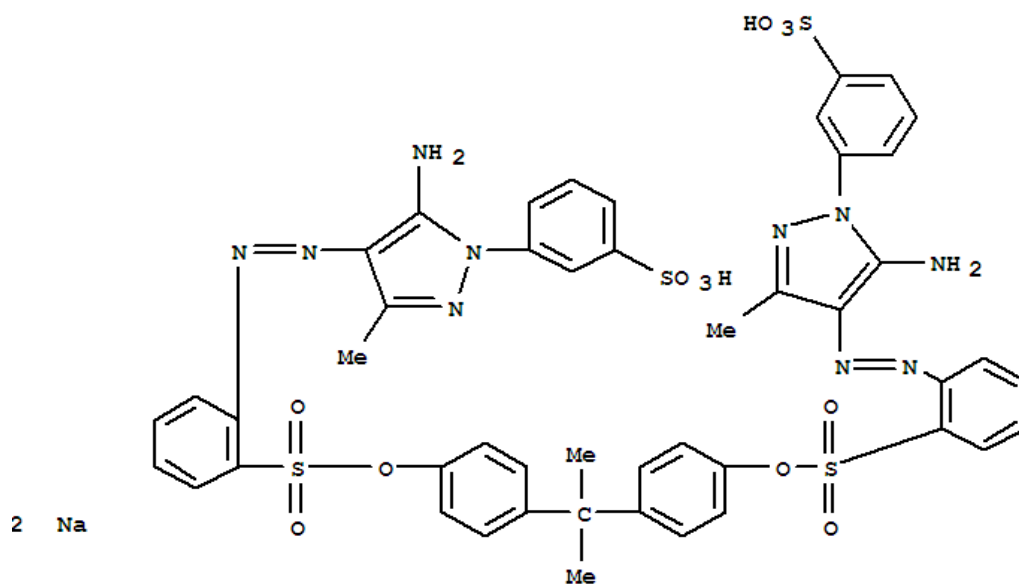
Preto ácido 210



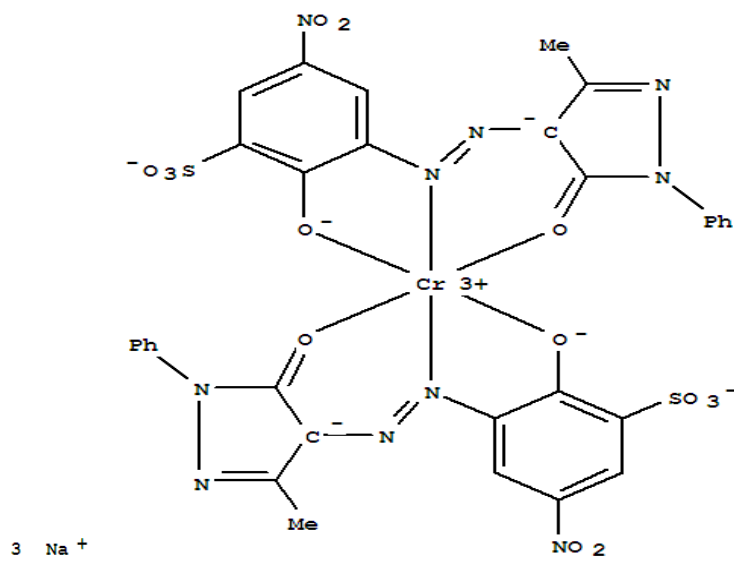
Vermelho ácido 357



Marrom ácido 414



Amarelo ácido 79



Laranja ácido 142

Apêndice D – Espectros de absorção obtidos dos ensaios de descoloração em meio líquido