

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MICORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE  
TINGIMENTO DE COURO USANDO CEPAS DE  
FUNGOS NATIVOS

TESE DE DOUTORADO

SANTIAGO ORTIZ-MONSALVE

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MICORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE TINGIMENTO DE  
COURO USANDO CEPAS DE FUNGOS NATIVOS

SANTIAGO ORTIZ-MONSALVE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Mariliz Gutterres Soares, Dr.<sup>a</sup>  
Prof.<sup>a</sup> do Departamento de Engenharia Química  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Co-Orientadora: Patrícia Valente, Dr.<sup>a</sup>  
Prof.<sup>a</sup> do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado “Micorremediação de efluentes de tingimento de couro usando cepas de fungos nativos”, elaborada por Santiago Ortiz Monsalve, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Universidade de Santa Cruz do Sul

---

Prof. Dr. Fernando Almeida Santos

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dra. Débora Faccin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dra. Caroline Borges Agustini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*In memoriam*

Maruja Gómez de Ortiz

1921 – 2019

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ao Departamento de Engenharia Química (DEQUI) e ao programa de pós-graduação em Eng. Química (PPGEQ), pela estrutura oferecida.

Ao Departamento Administrativo de Ciência, Tecnologia e Inovação da Colômbia (COLCIENCIAS) pela concessão do auxílio de estudos de doutorado no exterior (COLCIENCIAS, c. 679, 2015).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE, 88881.189891, 2018).

À IULTCS, IUR e Lear Corporation pelo auxílio financeiro no incentivo *Young Leather Scientist Grant* (YLSG, 2017).

Às minhas orientadoras, Mariliz Gutterres e Patrícia Valente, pela orientação e apoio.

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

A todos os meus amigos e familiares, pelo apoio e carinho.

À Lizaveta Romanov, pelo amor e apoio incondicional.

## RESUMO

A micorremediação consiste na aplicação de fungos no tratamento de poluentes. Este tipo de biorremediação é apresentada como uma alternativa promissora para o tratamento de efluentes industriais. No processo de manufatura de couro, são produzidos efluentes da etapa de tingimento contendo corantes sintéticos que podem ser uma ameaça para o meio ambiente e para a saúde humana. Neste estudo, a cepa nativa do fungo *Trametes villosa* SCS-10, foi avaliada por sua capacidade na micorremediação de corantes para couro a partir de soluções aquosas, efluentes de tingimento e matrizes sólidas. Na primeira etapa, foi avaliada a biodescoloração e biodegradação dos corantes Vermelho Ácido 357, Preto Ácido 210 e Azul Ácido 161, em solução aquosa. Em uma segunda etapa, o fungo foi avaliado pelo seu potencial de micorremediação de efluentes reais de tingimento contendo os corantes Vermelho Ácido 357 e Laranja Ácido 142. Nas etapas em meio líquido, a cepa apresentou alta eficiência de biodescoloração, obtendo mais de 90% de remoção de cor para os corantes e efluentes avaliados. Durante o tratamento, *T. villosa* tolerou altas concentrações de corantes (até 1000 mg L<sup>-1</sup>) e uma ampla faixa de pH (4,0–8,0). No processo, foram observados picos notáveis de atividade da enzima lacase (até 1550 U L<sup>-1</sup>). A inibição da lacase reduz a eficiência de biodescoloração, indicando que a biodegradação enzimática foi a principal responsável pela remoção de cor. Os experimentos *in vitro* e as análises no espectro visível (UV-Vis) e no infravermelho (FT-IR) confirmaram a ocorrência de biodegradação. No tratamento dos efluentes, *T. villosa* mostrou mais de 80% de remoção da demanda química de oxigênio e carbono orgânico total, e 50–70% de biodetoxificação. Na etapa final, foi avaliada a eficiência de um tratamento combinado, usando adsorção e cultivo em fase sólida, sobre o corante Azul Ácido 161. Biocarvão produzido a partir de resíduos de madeira foi eficiente na adsorção do corante. O corante retido no material foi tratado mediante biodegradação por cultivo em fase sólida com *Trametes villosa* SCS-10. A cepa atingiu 91.36 ± 1.32% de biodegradação, associada aos picos de atividade lacase (1000 U L<sup>-1</sup>). Os resultados promissores obtidos neste estudo demonstraram que o fungo *T. villosa* SCS-10 é adequado para o tratamento de efluentes de tingimento de couro. São necessários mais estudos para melhorar a aplicabilidade em grande escala.

## ABSTRACT

Mycoremediation refers to the use of fungi in the treatment of pollutants. This kind of bioremediation is presented as a promising alternative for the treatment of industrial wastewaters. In the leather manufacturing process, dye-containing wastewaters are produced, which could be a threat to the environment and human health. In the current study, a native strain of *Trametes villosa* SCS-10 was evaluated for its ability in the treatment of leather dyes from aqueous solutions, real wastewaters and solid matrices. In the first step, it was evaluated the biodecolourisation and biodegradation of the dyes Acid Red 357, Acid Blue 161 and Acid Black 210, from aqueous solution. In a second step, the strain was evaluated for its mycoremediation potential over real wastewaters containing Acid Red 357 and Acid Orange 142 dyes. In the liquid media assays, the strain showed high efficiency of biodecolourisation, obtaining more than 90% colour removal for the dyes and effluents assessed. During treatment, *T. villosa* tolerated high concentrations of dyes (up to 1000 mg L<sup>-1</sup>) and a wide pH range (4.0–8.0). In the process, remarkable peaks of laccase activity (over 1550 U L<sup>-1</sup>) were observed. Inhibition of laccase reduced the colour removal efficiency, indicating that biodegradation was the main responsible for the biodecolourisation. In the *in vitro* assays, UV–vis and FT–IR analyses confirmed the occurrence of biodegradation via laccase. In the treatment of the wastewaters, *T. villosa* showed more than 80% of reduction of chemical oxygen demand and total organic carbon, and 50–70% of biodegradation. In the final step, the biodegradation efficiency of a combined treatment, using adsorption and solid-state fermentation, over Acid Blue 161 was evaluated. Wood-chip biochar was efficient in the adsorption of the dye. The retained dye onto the adsorbent was treated by solid state fermentation biodegradation with *Trametes villosa* SCS-10. The strain reached 91.36±1.32% of biodegradation, related with peaks of laccase activity (1000 U L<sup>-1</sup>). The promising results obtained in this study demonstrated that the fungus *T. villosa* SCS-10 is suitable for the treatment dye-containing wastewaters from the leather industry. Further studies are needed to improve the applicability on a large scale.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xvii
INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	5
ESTRUTURA DO TRABALHO.....	7
CAPÍTULO I REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
1.1. FUNGOS E BIODEGRADAÇÃO .....	9
1.2. BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS LIGNOCELULÓSICOS .....	13
1.2.1. Estrutura e composição da madeira.....	13
1.2.2. Fungos de podridão branca.....	17
1.2.3. Sistema enzimático modificador de lignina.....	19
1.3. MICORREMEDIAÇÃO .....	22
1.3.1. Micorremediação com fungos de podridão branca.....	23
1.3.2. Micorremediação de corantes por fungos de podridão branca .....	24
1.3.3. Micodegradação .....	28
1.3.4. Biossorção e bioacumulação .....	34
1.3.5. Fatores que afetam a micorremediação .....	36
1.5. AVANÇOS RECENTES NO TRATAMENTO DE CORANTES POR WRF .....	44
1.6. COURO.....	47
1.6.1. Processamento do couro.....	49
1.6.2. Tingimento de couro .....	49
1.6.3. Efluentes de tingimento .....	51
1.6.4. Processos físico - químicos de tratamento .....	52
REFERÊNCIAS.....	53
CHAPTER II Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of <i>Trametes villosa</i> .....	67
ABSTRACT.....	69
CHAPTER III Biodecolourisation and biodetoxification of dye - containing wastewaters from leather dyeing by the native fungal strain <i>Trametes villosa</i> .	71
ABSTRACT.....	73
CAPÍTULO IV Remoção do corante para couro Azul Ácido 161 pela combinação de adsorção em biocarvão e degradação por cultivo de <i>Trametes villosa</i> SCS-10 em fase sólida .....	75
RESUMO.....	77

OUTROS TRABALHOS.....	79
ARTIGOS .....	79
CAPÍTULO DE LIVRO .....	79
CONGRESSOS .....	79
PRÊMIOS E DESTAQUES .....	80
PUBLICAÇÕES EM COAUTORIA .....	81
CONCLUSÕES.....	83
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	84

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo de vida dos basidiomicetos e formação de fíbulas .....	10
Figura 1.2. Corpos de frutificação de basidiomicetos saprófitos .....	12
Figura 1.3. Diagrama da estrutura celular da madeira .....	14
Figura 1.4. Estrutura química dos monolignóis e das subunidades da lignina ..	16
Figura 1.5. Modelo da estrutura química da lignina e corantes para couro .....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Fungos de podridão branca na micorremediação de xenobióticos ...	25
Tabela 1.2. Comparação entre os mecanismos de micorremediação dos fungos de podridão branca. ....	29
Tabela 1.3. Biodegradação de corantes por fungos.....	33
Tabela 1.4. Biossorção/Bioacumulação de corantes por fungos. ....	37
Tabela 1.5. Estado da arte recente envolvendo o uso de WRF no tratamento de corantes e efluentes de tingimento.....	48

# INTRODUÇÃO

Os fungos têm um papel fundamental no funcionamento da vida no planeta, regulando o fluxo de carbono e da energia, e mediando os ciclos biogeoquímicos de vários elementos nos ecossistemas. Os fungos de podridão branca (WRF, do inglês “*white-rot fungi*”), são um grupo de basidiomicetos com capacidade de biodegradar a matéria orgânica presente em resíduos lignocelulósicos, como folhas, talos, galhos, tocos, etc. Muitos desses resíduos são difíceis de degradar, portanto os WRF desenvolveram características evolutivas que lhes permitem usar o carbono presente nesses compostos (DIGHTON, 2016). Entre as principais características desses fungos cabe ressaltar o crescimento micelial e a produção de enzimas extracelulares

Na micorremediação, uso de fungos no tratamento de poluentes, essas habilidades dos WRF para degradar a matéria orgânica recalcitrante são aproveitadas para biotransformar diferentes compostos xenobióticos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, bifenilas policloradas, nitroaromáticos e corantes (DAO et al., 2019; LEVIN et al., 2016; LI et al., 2018; PANDI et al., 2019). Dentro desses poluentes, os WRF têm mostrado grande potencial no tratamento de corantes e efluentes contendo corantes. A indústria de couro, juntamente com a têxtil, são dois dos setores que mais demandam o uso de corantes (KATHERESAN et al., 2018).

A indústria de couro tem significativa importância na economia brasileira devido ao fato de que o país ostenta o maior rebanho comercial bovino do mundo, estimado em mais de 215 milhões de cabeças (IBGE, 2017), sendo um dos principais produtores e exportadores de couro a nível global (ABQTIC, 2019). Segundo a Secretaria Brasileira de Comércio Exterior (SECEX), a exportação anual brasileira de couros e peles movimentou mais de US\$ 1,4 bilhões em 2018. Do total de couros produzidos e exportados pelo país, 8,8% correspondeu a couros *crust* (semi-acabados) e 43,8% a couros acabados (ABQTIC, 2019). Os couros acabados e semi-acabados são submetidos aos processos de tingimento na etapa de acabamento molhado. Nesta etapa, adicionam-se corantes e outros compostos com o objetivo de transmitir as características sensoriais do produto, como cor, saturação, uniformidade e estabilidade (GOMES et al., 2016).

O tingimento é realizado em meio aquoso, envolvendo alto volume de água. Os corantes têm diferentes taxas de exaustão do meio aquoso e diferentes maneiras de fixação. Além disso, o tingimento de couro é um processo complexo devido à natureza heterogênea da pele (PÜNTENER, 2002). Algumas vezes, visando garantir uma maior fixação, os corantes são aplicados em excesso. Os problemas de difusão e afinidade podem provocar o esgotamento incompleto dos corantes, restando uma porção remanescente no efluente. A concentração de corante no efluente é muito variável, dependendo da tecnologia de curtimento e tingimento aplicada, da capacidade da planta e do tipo de couro e do corante selecionados (PÜNTENER, 2000).

A descarga de efluentes contendo corantes sem tratamento adequado é motivo de preocupação, pela poluição visual associada à cor das águas residuais, inibição da fotossíntese aquática, a depleção de oxigênio dissolvido e a toxicidade que afeta a flora, a fauna e seres humanos (MULLAI et al., 2017). Tecnologias de tratamento físico-químicas e biológicas são usadas para o tratamento de águas residuais contendo corantes, como, por exemplo, coagulação, floculação e lodos ativados. No entanto, essas tecnologias não são completamente adequadas para o tratamento de corantes por causa de seu custo, aplicabilidade limitada, baixa eficiência e as grandes quantidades de lodo remanescente, que envolvem manipulação e disposição dos resíduos produzidos e/ou regeneração de materiais adsorventes (SAROJ et al., 2014). O tratamento dos efluentes contendo corantes continua sendo um desafio que motiva a aplicação de novas tecnologias, como processos eletroquímicos (CRUZ et al., 2017), ozonização (MELLA et al., 2017a), e emprego de materiais adsorventes alternativos (DA FONTOURA et al., 2017; GOMES et al., 2016).

A micorremediação desses efluentes usando WRF aparece como uma alternativa rápida, menos dispendiosa e ambientalmente compatível. O potencial dos WRF está relacionado à sua capacidade de biodegradação enzimática, realizada pelo seu sistema enzimático extracelular, altamente oxidativo, não específico, composto principalmente por lacase (Lac), lignina peroxidases (LiP) e peroxidase dependente de manganês (MnP) (ALI, 2010). Outros mecanismos, como bioissorção e bioacumulação, também podem estar envolvidos na remoção de corantes (KAUSHIK; MALIK, 2015).

A maioria dos estudos desenvolvidos para tratar efluentes contendo corantes, envolvendo WRF, estiveram principalmente focados na remoção de corantes têxteis, e foram poucas as pesquisas que avaliaram a micorremediação de corantes e efluentes da indústria de couro (RODRIGUEZ-COUTO et al., 2004; ANASTASI et al., 2010; BACCAR et al. 2011; PANDI et al., 2019;).

É importante salientar que os corantes para couro podem ser estruturalmente diferentes dos corantes têxteis, uma vez que são sintetizados para tingir diferentes tipos de textura (fibras de couro e algodão). Os efluentes de acabamento molhado de couro também são diferentes dos da indústria têxtil, devido à presença de produtos químicos específicos utilizados na produção de couro, como sais de cromo, taninos, óleos, ácidos, corantes e surfactantes (PANDI et al., 2019).

São poucos os estudos na literatura que investigam a diminuição de outros parâmetros de poluição, tais como demanda química de oxigênio, demanda biológica de oxigênio, carbono orgânico total e a determinação da toxicidade após o micotratamento (ANASTASI et al., 2010; 2012; MA et al., 2014; PLÁCIDO et al., 2016).

É necessária, portanto, a busca de novas cepas de WRF com uma maior resistência e habilidade na micorremediação de corantes específicos para couros e os efluentes de tingimento.

## OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo é a micorremediação de efluentes de tingimento contendo corantes para couro, por meio de cepas nativas de fungos de podridão branca, avaliando-se a biodescoloração, a biodegradação e a biodetoxificação.

Os objetivos específicos desse estudo de micorremediação são:

Avaliar o potencial de biodescoloração da cepa nativa *T. villosa*, sobre os diferentes corantes para couro Azul Ácido 161, Preto Ácido 210, Vermelho Ácido 357 e Laranja Ácido 142, a partir de soluções aquosas, efluentes e matrizes sólidas;

Avaliar a aplicabilidade de técnicas microscópicas (óptica e eletrônica) e espectrofotometria (UV-Vis e FT-IR) para elucidação dos métodos de biodescoloração dos corantes selecionados;

Avaliar o efeito de inibidores enzimáticos nos mecanismos de biodescoloração pela cepa nativa *T. villosa*;

Comparar condições de tratamento *in vitro* e *in vivo* na biodescoloração e na biodegradação dos corantes;

Otimizar o efeito de variáveis operacionais como pH, temperatura e concentração inicial de corante na biodescoloração e na atividade enzimática da cepa fúngica selecionada;

Avaliar o potencial da cepa *T. villosa* SCS-10 na micorremediação de efluentes reais de tingimento de couro;

Quantificar os rendimentos de micorremediação dos efluentes com base na remoção de cor (biodescoloração) e diminuição do carbono orgânico total (COT), demanda biológica de oxigênio (DBO) e biodetoxificação;

Analisar o efeito da suplementação de diferentes concentrações de nutrientes sobre a micorremediação de efluentes contendo os corantes selecionados;

Comparar o desempenho da biodegradação de corantes em condições de cultivo em fase líquida e cultivo em fase sólida.

## ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho de qualificação de doutorado está estruturado em 6 capítulos.

No capítulo 1 é apresentada uma revisão teórica sobre os conceitos relevantes para os temas abordados na pesquisa. A revisão é dividida em três partes. Inicialmente é apresentado o papel dos fungos nos ecossistemas, destacando-se os fungos de podridão branca e a caracterização bioquímica da biodegradação da matéria orgânica lignocelulósica. Na segunda parte, na terceira parte é apresentado o conceito de micorremediação, salientando-se o tratamento de corantes e efluentes de tingimento por fungos de podridão branca. Explicam-se alguns fundamentos teóricos sobre os mecanismos envolvidos e parâmetros que podem afetar o processo e apresenta-se o estado da arte, analisando-se antecedentes de pesquisas recentes relacionadas ao tema e planteando perspectivas futuras do trabalho. Finalmente é apresentado o processo de produção de couro, dando ênfase à etapa de acabamento molhado, aos corantes, à geração e às características dos efluentes de tingimento de couro.

No capítulo 2 é apresentado o artigo “*Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of Trametes villosa*”, onde se avaliou o potencial da cepa *T. villosa* SCS-10 no tratamento de três corantes para couro. Nesse artigo a biodescoloração foi analisada usando-se espectrometria UV-vis. A biodegradação foi estudada por análises FT-IR e utilizando-se inibidores enzimáticos. Os ensaios *in vitro* foram realizados para confirmar a biodegradação enzimática. Por fim, o efeito de variáveis operacionais sobre o rendimento do tratamento foi analisado e otimizado.

No capítulo 3 é apresentado o artigo “*Biodecolourisation and biodegradation of dye-containing wastewaters from leather dyeing by the native fungal strain T. villosa SCS-10*”, onde se avaliou a micorremediação de efluentes produzidos em fulão em escala de laboratório. O rendimento do tratamento foi avaliado em termos de biodescoloração, diminuição do carbono orgânico total (COT) e demanda química de oxigênio (DQO) e biodetoxificação.

No capítulo 4 é apresentado o artigo “*Degradation of the leather dye Acid Blue 161 by the combination of depolymerised wood-chip biochar adsorption and solid-state fermentation with T. villosa*”. O artigo descreve a seleção de um material derivado de biocarvão como adsorvente do corante e suporte para cultivo em fase sólida com *Trametes villosa*. O Processo de adsorção foi otimizado utilizando um planejamento de experimentos Box-Behnken (BBD) e Metodologia da Superfície de Resposta (RSM). Adicionalmente foi estudada a biodegradação do corante adsorvido através do cultivo em fase sólida com *T. villosa*. Finalmente, o material adsorvente regenerado foi reusado em um novo ciclo de adsorção.

No capítulo 5 são apresentados outros trabalhos, participações em congressos e publicações.

No capítulo 6 são apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

# CAPÍTULO I

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. FUNGOS E BIODEGRADAÇÃO

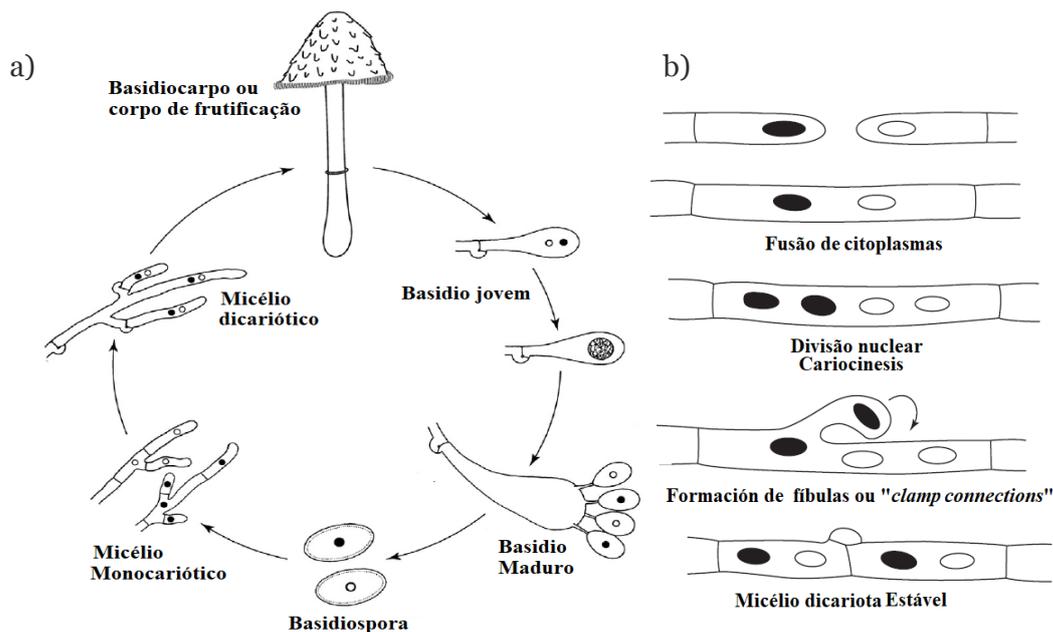
Os fungos pertencem a um grupo de organismos que não fixam a energia e os nutrientes de modo direto. Eles evoluíram para acessar e usar a energia armazenada na biomassa vegetal e animal, e assim desenvolver seu próprio metabolismo. Os fungos são importantes para o funcionamento da vida no planeta, relacionando-se com outros organismos e interagindo com o ambiente abiótico para regular os processos dos ecossistemas (DIGHTON, 2016). Nesta seção serão descritas algumas características da estrutura e da fisiologia dos fungos, especialmente dos basidiomicetos, que têm importância na biodegradação da matéria orgânica e na micorremediação.

Os fungos são organismos eucariotas, com células contendo membrana plasmática, núcleo definido e sistema endomembranar. A parede celular é formada por quitina, característica diferencial que não se encontra em outros eucariotas. O citoesqueleto fúngico é formado pelos polímeros tubulina e actina (MONEY, 2016).

As unidades vegetativas básicas da maioria dos fungos são as hifas, constituídas por um conjunto de células cilíndricas que formam uma rede de filamentos tubulares. As hifas desenvolvem um sistema de conectividade citoplasmática contínua entre células adjacentes. Nos basidiomicetos, as hifas estão divididas por tabiques transversais internos chamados septos, que as separam em compartimentos. Os septos possuem poros que permitem a passagem de citoplasma. Cada compartimento contém um ou mais núcleos (DIGHTON, 2016).

O micélio é formado por uma rede interligada de hifas que cresce apicalmente. Esse crescimento em forma apical permite abarcar uma grande superfície, ideal para o fungo ter acesso aos nutrientes em ecossistemas heterogêneos. O micélio possui a capacidade de permear tecidos de plantas e outras fontes de nutrientes, chamada de crescimento invasivo. Esse mecanismo envolve os processos interligados de digestão enzimática extracelular e penetração por pressão (FRICKER et al., 2008).

Figura 1.1. Ciclo de vida dos basidiomicetos e formação de fíbulas



(a) Ciclo de vida dos basidiomicetos; (b) formação de fíbulas.

Fonte: adaptado de Money (2016); Margulis e Chapman (2009).

Os fungos podem reproduzir-se de forma sexuada ou assexuada. Em ambos os casos os novos organismos formam-se a partir de esporos (assexuadamente). Esses esporos são produzidos nos corpos de frutificação. Os corpos de frutificação são estruturas multicelulares formados por hifas filamentosas que crescem a partir do micélio vegetativo. Em basidiomicetos, essa estrutura é chamada de basidiocarpo (DIGHTON, 2016; MONEY, 2016). Os basidiomicetos exibem estruturas diferentes dependendo do estado de desenvolvimento: micélio monocariótico e micélio dicariótico.

Quando um basidiósporo germina forma o micélio monocariótico, que se conjuga com um micélio compatível formando o micélio dicariótico. O micélio dicariótico possui dois núcleos. Um dos núcleos divide-se sobre o eixo principal, enquanto o outro o faz dentro de um prolongamento da célula, formando-se em seguida dois septos perpendiculares a ambos eixos de divisão. Posteriormente, a parte proeminente que dará lugar à fíbula ou “*clamp connection*”, funde-se com a célula subapical, voltando a ter dois núcleos. A presença de septos e fíbulas é uma característica única dos basidiomicetos. A Figura 1.1 mostra o ciclo de vida dos basidiomicetos e a formação de fíbulas.

Com base no papel-chave dos fungos na regulação fluxo de carbono e da energia nos ecossistemas, eles podem ser divididos em quatro grupos funcionais (DIGHTON, 2016):

- (1) Saprófitos, que atuam na biodegradação da matéria orgânica, conduzindo o ciclo global do carbono;
- (2) Micorrizas, que formam associações simbióticas com as raízes das plantas, facilitando a absorção de água e nutrientes do solo;
- (3) Líquens, que formam associações simbióticas com algas ou cianobactérias, participando do ciclo biogeoquímicos de minerais;
- (4) Parasitas, que regulam a dinâmica populacional de seus hospedeiros

No presente trabalho dá-se maior ênfase aos basidiomicetos, um filo de fungos que tem um papel essencial como saprófitos e micorrizas. A Figura 1.2 mostra o corpo de frutificação (basidiocarpo) de diferentes espécies de basidiomicetos.

Os basidiomicetos saprófitos participam da biodegradação da matéria orgânica presente na biomassa de produtores primários como as plantas. Nos ecossistemas, a biodisponibilidade da matéria orgânica é bastante heterogênea, sendo principalmente constituída por biomassa lignocelulósica como folhas, talos e raízes de plantas, galhos, tocos de madeira, etc. Para sobreviverem, os basidiomicetos devem adquirir esses recursos dispersos descontinuamente no espaço e no tempo. Duas das principais características evolutivas destes fungos, que os tornaram fundamentais na biodegradação e biotransformação da matéria orgânica, são o crescimento em forma de micélio e a produção de enzimas extracelulares (FRICKER et al., 2008).

O micélio está encarregado da absorção de água e nutrientes, sustentação do crescimento, penetração e colonização de substratos, busca de novos recursos, proteção e isolamento do ambiente externo e resposta a fatores externos (BODDY; JONES, 2007). As redes de micélio podem ser remodeladas continuamente através das respostas aos estímulos ambientais abióticos (*e. g.* busca de fontes de nutrientes ou eventos destrutivos) e bióticos (*e.g.* depredação, interação ou competição com outros organismos). A resposta se expressa em forma de mudanças morfológicas e fisiológicas. A morfologia da rede de micélio se altera em forma de crescimento ativo em ramificações e fusões de hifas. As mudanças fisiológicas estão associadas à absorção, armazenamento e redistribuição de nutrientes (FRICKER et al., 2008).

Figura 1.2. Corpos de frutificação de basidiomicetos



(a) *Trametes villosa*; (b), (c) *Schizophyllum commune*; (d), (e) *Pleurotus ostreatus*; (f) *Ganoderma lucidum*.

Fonte: Müller (2018). Utilização de fotografias com a autorização do autor.

A outra característica dos basidiomicetos que os torna eficientes na biodegradação é a secreção de enzimas extracelulares. A matéria orgânica usada pelos fungos saprófitos é composta, principalmente, por polissacarídeos e biopolímeros de origem vegetal (celulose, hemiceluloses, lignina e pectina), polissacarídeos de parede celular de fungos (quitina), polissacarídeos de reserva de nutrientes (amido) e proteínas. A utilização desses polímeros requer a produção de enzimas extracelulares como celulasas, hemicelulasas, liases, oxidases e peroxidases específicas. No caso da lignina é necessário um sistema enzimático mais complexo que envolve enzimas inespecíficas, co-substratos e espécies reativas de oxigênio (WATKINSON, 2016). Esse sistema é abordado nas Seções 1.2.2 e 1.2.3 do presente capítulo.

## 1.2. BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS LIGNOCELULÓSICOS

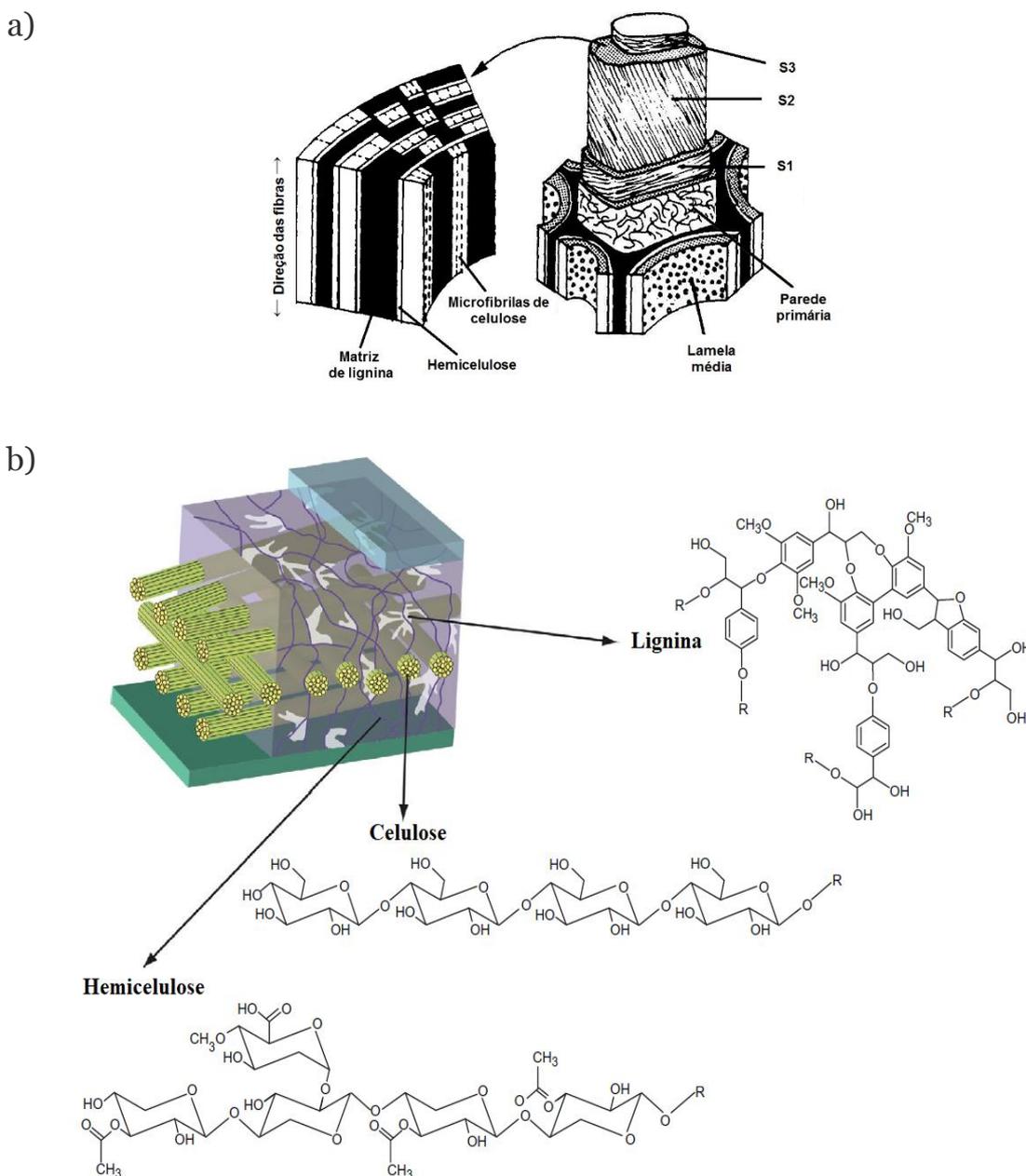
Os fungos são importantes na degradação da matéria orgânica e na regulação do ciclo global do carbono. Os compostos lignocelulósicos são a fonte de carbono mais comum e abundante do planeta e a maior parte desses compostos estão presentes nas plantas e na madeira. Os basidiomicetos saprófitos evoluíram para aproveitar esses compostos, formados principalmente por polímeros de parede celular de origem vegetal, como celulose, hemiceluloses, pectina e lignina.

Dentro dos basidiomicetos, os fungos de podridão branca são o maior e mais efetivo grupo de micro-organismos que degradam compostos lignocelulósicos. A utilização desses polímeros pelos WRF requer um complexo sistema enzimático extracelular (BODDY; JONES, 2007). Esse grupo de fungos apresenta características que os fazem úteis em micorremediação. Alguns aspectos bioquímicos da biodegradação dos compostos lignocelulósicos serão abordados nesta seção.

### 1.2.1. Estrutura e composição da madeira

A biomassa lignocelulósica é a fonte mais importante de carbono nos ecossistemas. Na natureza, essa biomassa é composta por resíduos vegetais e plantas, como folhas, caules e raízes, e, principalmente, madeira de tocos, troncos, ramos e casca de árvores.

Figura 1.3. Diagrama da estrutura celular da madeira



(a) Distribuição celular e (b) Localização e estrutura dos componentes da madeira.  
 Fonte: adaptado de Kirk e Cullen (1998); Watkinson (2016).

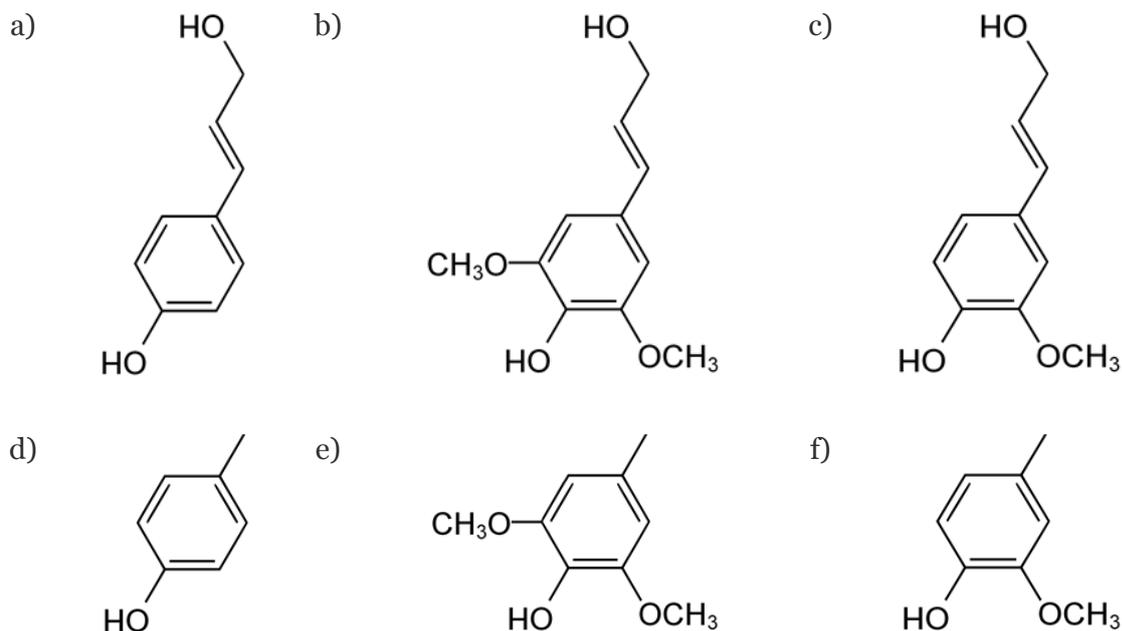
A madeira é constituída por um tecido fibroso de células com parede celular que se caracterizam por serem estruturas bastante complexas e semirrígidas, compostas por três substâncias poliméricas naturais: celulose, hemiceluloses e lignina. A Figura 1.3 mostra um diagrama da estrutura celular da madeira.

A estrutura é formada pela lamela média, a parede primária e a parede secundária. A lamela média é uma camada fina que une as células em conjunto para formar o tecido. Na parede primária encontram-se as células vegetais vivas, que fornecem uma fonte de nutrientes facilmente disponíveis para fungos e outros micro-organismos. Na parede secundária, as microfibrilas de celulose estão organizadas paralelamente em lamelas, formando as camadas S1, S2 e S3. As camadas S2 são ricas em celulose e se encontram intercaladas nas camadas S1 e S3, além disso, são repletas de lignina (WATKINSON, 2016). As camadas S1, S2 e S3, que formam a estrutura rígida da madeira, contêm celulose, hemiceluloses, lignina e menos pectina do que a paredes celular primária e lamela média (EVANS; HEDGER, 2001).

A celulose e as hemiceluloses são polímeros formados por monossacarídeos. O monômero base da celulose é a D-glucose. As unidades monoméricas se ligam por enlaces glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), formando longas cadeias lineares unidas por ligações de hidrogênio e forças de Vander Waals, constituindo microfibrilas de celulose. As microfibrilas formam estruturas cristalinas insolúveis de caráter fibroso, proporcionando o suporte estrutural da parede e resistência à hidrólise (WATKINSON, 2016). As hemiceluloses ou polioses são polímeros de unidades monoméricas como hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e pentoses (D-xilose e L-arabinose). As polioses têm menor massa molar que a celulose e apresentam cadeias mais curtas, com diferentes tipos de ramificações como açúcares e ésteres (BETTS et al., 1991).

A lignina é um polímero fenólico hidrofóbico de alta massa molar. A diferença da celulose, formada pela união linear de uma unidade monomérica típica, a lignina apresenta uma estrutura tridimensional e aleatória. Essa natureza estrutural deve-se ao processo de formação, a lignificação, que consta de uma etapa enzimática e uma química. Na etapa enzimática, lacases e/ou peroxidases, oxidam os monolignóis precursores da lignina, resultando na formação de radicais livres 4-hidroxifenila (unidade de lignina H), guaiacila (unidade de lignina G) e siringila (unidade de lignina S) (Figura 1.4)(EVANS; HEDGER, 2001).

Figura 1.4. Estrutura química dos monolignóis e das subunidades da lignina



Monolignóis: (a) Álcool cumarílico; (b) Álcool sinapílico; (c) Álcool coniferílico.  
 Subunidades aromáticas da lignina: (d) Lignina H; (e) Lignina S: Siringila (S);  
 (f) Lignina G: Guaiacila.

Fonte: adaptado de Ralph et al. (2004).

Na etapa química ocorre o “acoplamento aleatório”, onde as unidades de lignina H, G e S, reagem “aleatoriamente” entre si, formando diferentes compostos fenilpropanóides ressonantes (Figura 1.4). As subunidades da lignina estão unidas por diferentes tipos de enlaces muito estáveis e não hidrolisáveis, como ligações tipo éter entre um átomo de carbono da cadeia lateral de propano de um monômero e um átomo de carbono do anel de benzeno de outra unidade fenilpropanóide (ligações aril-alkiléter ou  $\beta$ -O-4), ligações bifenila (5-5) e bifenil-éter (5-O-4) (ARORA; SHARMA, 2010).

As características estruturais da lignina, como a complexidade, heterogeneidade, elevada massa molar, natureza aromática e enlaces estáveis e não hidrolisáveis, estão relacionadas com as funções que realizam na planta. A lignina é responsável por dar rigidez, suporte e proteção às células da parede celular, proporcionando resistência a estresses mecânicos e bioquímicos (BETTS et al., 1991).

A biodegradação da celulose é realizada pelos fungos com atividade celulolítica. Desse processo participam enzimas extracelulares, como exoglucanases, beta-glicosidases, celobiohidrolase e celobiase. Nas hemiceluloses, a biodegradação fúngica ocorre pela atividade catalítica de enzimas galactanases e hemicelulases (xilanase, mananase, arabinase) (WATKINSON, 2016).

Diferentemente da celulose e das hemiceluloses, a lignina é um composto recalcitrante e a sua biodegradação é bastante complexa. A biodegradação da lignina está associada à decomposição da madeira, que ocorre como um processo de nutrição de vários tipos de micro-organismos, principalmente basidiomicetos. Os fungos que participam na ligninólise da madeira são divididos em três grupos: fungos de podridão branda/mole, fungos de podridão marrom/castanha e fungos de podridão branca. Os basidiomicetos de podridão branca, destacam-se como os mais eficientes, devido ao seu crescimento em forma de micélio que permite a penetração da madeira, a secreção de enzimas com atividade degradadora e aos mecanismos de ataque (ARORA; SHARMA, 2010). Esses fungos são abordados na próxima seção.

### 1.2.2. Fungos de podridão branca

A madeira contém entre 20–30% de lignina, fato pelo qual a sua degradação é bastante importante para o ciclo global do carbono e o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas (WATKINSON, 2016). Dentro dos grupos de fungos com capacidade de degradar a lignina, os fungos de podridão branca são os únicos organismos reportados com capacidade de mineralizar completamente a lignina em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (CULLEN, 2014). Os outros grupos, fungos de podridão branda/mole e fungos de podridão marrom, modificam a lignina de forma limitada. Por isso, neste estudo se concede relevância aos WRF. Esses fungos degradam a lignina como estratégia de acesso aos carboidratos da célula vegetal, a celulose e as hemiceluloses, para posteriormente usá-los como fonte de energia. Alguns desses fungos se caracterizam pela aparência esbranquiçada que conferem à madeira sendo descomposta, motivo pelo qual lhes foi outorgado esse nome (WATKINSON, 2016).

Entre os basidiomicetos de podridão branca, destacam-se os fungos da ordem agaricomycetos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus*, que têm sido amplamente estudados e usados como modelos para elucidar o mecanismo, fisiologia, e genética do seu sistema ligninolítico. Os poliporáceos, como *Ganoderma lucidum*, também são eficientes na degradação da lignina (CULLEN, 2014; MONEY, 2016). Os WRF são bastante heterogêneos e a maioria das espécies apresenta preferência por um tipo de madeira, gimnospermas ou angiospermas, que tem diferentes proporções de lignina, celulose e hemiceluloses. No entanto, algumas espécies não diferenciam qual tipo de madeira degradar (CULLEN, 2014). Outras espécies atacam tipos de lignina específicos, como a lignina siringila (S), que são menos recalcitrantes do que as unidades de guaiacila (G) (HATAKKA, 2005). Algumas espécies preferem crescer sobre árvores vivas, enquanto outras crescem em tocos recém-cortados, e além disso, existem espécies que degradam a madeira de árvores mortas (CULLEN, 2014; MONEY, 2016). Os WRF apresentam dois mecanismos conhecidos de degradação da madeira: o mecanismo não seletivo ou simultâneo e o mecanismo seletivo. No mecanismo não seletivo, a lignina, celulose e hemiceluloses são degradadas simultaneamente, sem importar a ordem em que a degradação acontece (WATKINSON, 2016). Nesse mecanismo, o micélio penetra no lúmen e cresce apicalmente, aproveitando as perfurações naturais na estrutura da parede celular das células da madeira. Uma vez colonizado o lúmen, o micélio produz enzimas extracelulares que causam a erosão ou escamação da parede celular. Todos seus componentes são degradados ao mesmo tempo e na mesma proporção em que se encontram na célula (ERIKSSON, 2010; HATAKKA, 2005).

No mecanismo seletivo, primeiro são biodegradadas a lignina e as hemiceluloses, mas a celulose das camadas da parede celular permanece intacta. A lignina é degradada na parede celular e na parede secundária das células, mas não existem zonas de lise ou erosões, portanto a natureza cristalina da celulose não é destruída até que a lignina seja degradada. Os fungos *P. ostreatus* e *G. lucidum* usam esse mecanismo (CULLEN, 2014; ERIKSSON, 2010).

### 1.2.3. Sistema enzimático modificador de lignina

A resposta biológica usual para quebrar um polímero é usar enzimas altamente específicas. Isto é bastante eficaz, uma vez que uma quantidade mínima de enzima deve ser sintetizada pelo micro-organismo para romper uma ligação repetitiva entre as unidades monoméricas do polímero. Na celulose e nas hemiceluloses, por exemplo, as enzimas catalisam reações hidrolíticas para as ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) e/ou  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3). Essas enzimas, entre outras, também são produzidas pelos WRF para degradar a celulose e as hemiceluloses (EVANS; HEDGER, 2001).

A lignina, como previamente discutido, é um macropolímero tridimensional heterogêneo, formado por ligações aleatórias de diversos monómeros fenilpropanóides. Portanto, a lignina não tem um padrão repetitivo de ligações e é altamente hidrofóbico. Além disso, a lignina não tem sítios ativos no qual as enzimas possam se ligar para hidrolisar enlaces específicos. Os basidiomicetos desenvolveram um complexo sistema enzimático com características especiais, que lhes permite contornar a recalcitrância da lignina. Essas características também são aplicáveis na micorremediação de compostos aromáticos estruturalmente semelhantes à lignina. As principais características são:

i) Sistema enzimático extracelular: a degradação da lignina, denominada "combustão enzimática", é uma reação violenta que não pode ocorrer dentro de uma célula viva. Além disso, a lignina tem uma estrutura aromática de alta massa molar, a qual não pode ser transportada dentro da célula para ser degradada intracelularmente. As enzimas, mediadores e indutores são secretadas para reagir extracelularmente com a lignina (WATKINSON, 2016).

ii) Sistema enzimático não estereosseletivo e não específico pelo substrato: a irregularidade estrutural da lignina faz com que as enzimas não possam ser específicas para um substrato típico, já que o substrato muda constantemente. Além disso, a lignina não tem sítios ativos ou ligações específicas que possam ser reconhecidas, razão pela qual as enzimas não são estereosseletivas (ARORA; SHARMA, 2010; CULLEN, 2014).

iii) Enzimas com alto potencial oxidativo: como já mencionado anteriormente, unidades de lignina estão unidas por ligações C–C e tipo éter bastante estáveis. O mecanismo para romper estas ligações deve ser altamente oxidativo e não hidrolítico (CULLEN, 2014).

O sistema enzimático modificador da lignina, LME (do inglês: “*lignin modifying enzymes*”), é constituído pelas enzimas peroxidases dependentes de manganês E.C. 1.11.1.13 (MnPs, do inglês “*manganese peroxidases*”, lignina peroxidases E.C. 1.11.1.14 (LiPs, do inglês “*lignin peroxidases*”), peroxidases versáteis E.C. 1.11.1.16 (VPs, do inglês “*versatile peroxidases*”) e lacase E.C. 1.10.3.2 (Lac). LiPs, MnPs e VPs são peroxidases enquanto Lac são feniloxidasas. A produção dessas enzimas não é homogênea, e diferentes WRF podem produzir uma ou mais destas enzimas, ou usar só algumas delas na degradação da lignina (ARORA; SHARMA, 2010; WESENBERG, 2003).

As peroxidases LiPs, MnPs e VPs são todas glicoproteínas denominadas peroxidases de Classe II, que se diversificaram em basidiomicetos. A peroxidase LiP foi isolada pela primeira vez do WRF *P. chrysosporium*. A enzima catalisa a oxidação da lignina aromática não fenólica, tem capacidade para oxidar cadeias laterais da lignina e compostos relacionados por supressão de um elétron para formar radicais reativos. Também foi relatada a clivagem de estruturas de anel aromático. As enzimas LiPs não são essenciais para a degradação da lignina, e vários WRF não excretam essa enzima. O álcool veratrílico é produzido extracelularmente como metabolito secundário que aumenta a atividade das LiPs, provavelmente protegendo a enzima da inativação por excesso de  $H_2O_2$  (CULLEN, 2014; WESENBERG, 2003).

MnP também foi descoberta no fungo *P. chrysosporium*. A enzima oxida o  $Mn^{2+}$  para  $Mn^{3+}$  usando  $H_2O_2$  como oxidante. Ácidos orgânicos, como o ácido oxálico, estimulam a MnP através da estabilização de  $Mn^{3+}$  e formam quelatos oxidantes difusíveis. O  $Mn^{3+}$  quelado atua como um mediador redox altamente reativo com potencial oxidativo suficiente para oxidar as principais unidades fenólicas da lignina, porém a enzima não consegue oxidar as estruturas não fenólicas. A excisão dessas estruturas fenólicas é mediada por mecanismos de peroxidação (CULLEN, 2014; WESENBERG, 2003).

VPs podem ser consideradas um híbrido entre MnPs e LiPs, uma vez que podem oxidar não só  $Mn^{2+}$ , mas também compostos aromáticos fenólicos, como álcool veratrílico, e não fenólicos, em ausência de manganês. As VPs foram descritas pela primeira vez em espécies de *Pleurotus* e *Bjerkandera* (CULLEN, 2014).

As enzimas lacases são produzidas por quase todos os basidiomicetos. As Lac são enzimas polifenol oxidases da família oxidase que contém cobre. Também são chamadas de oxidases azuis. Essas enzimas contêm quatro átomos de cobre no sítio ativo, que são distribuídos entre diferentes locais. As lacases catalisam a oxidação de uma variedade de compostos aromáticos doadores de hidrogênio com a redução concomitante de  $O_2$  para  $H_2O$ . Além disso, as lacases oxidam os ácidos fenólicos, metoxifenólicos e seus grupos metoxilo (demetilação) (CULLEN, 2014; WESENBERG, 2003).

Enzimas auxiliares, extracelulares e intracelulares, como as geradoras de peróxido de hidrogênio, glioxal oxidase, aril-álcool oxidases, metanol oxidase, metil-transferases e piranose-2 oxidase, também podem ser consideradas componentes do LMS (CULLEN, 2014; WATKINSON, 2016).

Devido à natureza heterogênea da lignina e a das enzimas do LME, as interações diretas e específicas entre os substratos e as enzimas são improváveis (EVANS; HEDGER, 2001). Compostos de baixa massa molar com fácil difusão e elevado potencial redox, são usados como mediadores na degradação da lignina. Entre eles destacam-se os compostos de origem natural que são produzidos pelo fungo, como  $H_2O_2$ ,  $Mn^{3+}$ , ácidos orgânicos, como oxalato e málico, tióis e álcool veratrílico. Outros compostos sintéticos têm sido testados satisfatoriamente em laboratório como indutores das enzimas que participam da degradação da lignina, tais como HBT (1-Hidroxibenzotriazol), ABTS [(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6 ácido sulfônico)] e siringaldazina (4-hidróxi-3,5-dimetóxi-benzaldeído azina).

### 1.3. MICORREMEDIAÇÃO

A diversidade metabólica dos micro-organismos e a sua capacidade de biodegradar e biotransformar substratos orgânicos e inorgânicos estão sendo exploradas e aplicadas no tratamento de poluentes. A biorremediação pode ser definida como o processo de uso de organismos e/ou suas enzimas no tratamento desses poluentes. Esses organismos podem ser micro-organismos como bactérias, fungos, algas e arqueas (biorremediação microbiana) e plantas (fitorremediação). A biorremediação é geralmente considerada um método eficiente, ambientalmente compatível e menos dispendioso para a remoção de contaminantes (SINGH; WARD, 2004).

Conforme a Seção 1.1, os fungos têm função essencial no processo de biodegradação da matéria orgânica e são um componente essencial do fluxo da energia e carbono no ambiente. As características dos fungos como a ubiquidade, a diversidade morfológica, dada pelo crescimento em forma de micélio, e a diversidade metabólica, relacionada com a secreção de enzimas, os tornam eficientes na biorremediação de diversos tipos de xenobióticos. A aplicação de fungos no tratamento de poluentes é chamada de micorremediação. Os fungos possuem vários mecanismos que podem ser aplicados em micorremediação, como biodegradação enzimática e biossorção.

A biodegradação enzimática envolve a biotransformação desses compostos orgânicos em metabolitos menos complexos. Em alguns casos, a biodegradação é tão eficiente que é atingida a mineralização: biotransformação completa do composto (*e.g.* poluente) em H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> e minerais (SINGH; WARD, 2004). No caso de compostos inorgânicos como metais tóxicos e cátions radioativos, que não podem ser degradados, são biotransformados em produtos menos nocivos para o ambiente ou são alteradas suas características para sua posterior remoção por outros métodos (SINGH et al., 2014).

A biossorção é um mecanismo que permite a remoção dos poluentes pela adsorção na superfície da biomassa fúngica (micélio) (KULSHRESHTHA et al., 2014).

Na micorremediação podem ser aplicadas as características intrínsecas do micro-organismo, como, por exemplo, a capacidade dos WRF de degradar a lignina pode ser aplicada na biodegradação de poluentes aromáticos que possuem similaridade estrutural a da lignina. Esses fungos são abordados na Seção 1.3.1. Em outros casos, os fungos se aclimatam e adaptam a alguns tipos de poluentes. Isso pode ocorrer por adaptação natural ou por indução do homem. A diversidade morfológica e ubiquidade dos fungos permite que a micorremediação seja aplicada em diferentes matrizes como no solo, sedimentos, efluentes e resíduos sólidos. Isso é importante para a aplicação de técnicas de biorremediação *in situ* (e.g. tratamento de solos contaminados) ou *ex situ* (e.g. remediação de efluentes em plantas de tratamento ou laboratório).

### 1.3.1. Micorremediação com fungos de podridão branca

Os fungos de podridão branca (WRF) têm a capacidade de biodegradar uma gama bastante diversificada de poluentes recalcitrantes. Esses poluentes incluem hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHAs), bifenilos policlorados (PCBs), nitroaromáticos, inseticidas e pesticidas, corantes e efluentes coloridos, hidrocarbonetos BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos), clorofenóis, clorobenzenos, tricloroetileno, etc. Para se compreender a capacidade desses basidiomicetos de biodegradar essa grande variedade de poluentes, deve-se considerar a função dos fungos nos ecossistemas, especialmente na biodegradação dos compostos lignocelulósicos (Seção 1.2).

Os fungos de podridão branca têm características morfológicas e metabólicas que permitem a biodegradação de estruturas aromáticas similares à lignina, como as dos poluentes mencionados anteriormente. Essas características são apresentadas a continuação:

- i) Ubiquidade: permite que os WRF se desenvolvam em ambientes naturais ubíquos, facilitando o a adaptação e crescimento em matrizes diferentes (solo, efluentes e sedimentos) contendo diferentes poluentes.
- ii) Crescimento micelial: permite que os WRF colonizem em diferentes tipos de ambientes, incluindo o solo e meios sólidos e líquidos;

iii) Sistema enzimático não específico: a natureza heterogênea da lignina faz com que as enzimas dos WRF sejam não específicas pelo substrato, o que permite a degradação de poluentes com estruturas similares.

iv) Sistema enzimático extracelular: a lignina é uma macromolécula que não pode ser degradada intracelularmente. Isso é uma vantagem, tendo em vista que a produção de enzimas extracelulares evita a incorporação de poluentes tóxicos no interior da célula.

v) Enzimas não induzíveis: a produção das enzimas ligninolíticas não é necessariamente induzida pela lignina e, portanto, nem pelos compostos xenobióticos similares. Isso permite a degradação dos poluentes em baixas concentrações e evita fases de adaptação.

Desde que as enzimas ligninolíticas do fungo de podridão branca *P. chrysosporium* foram identificadas e isoladas (TIEN; KIRK, 1983; KUWAHARA et al., 1984) e posteriormente aplicadas em processos de micorremediação (BUMPUS et al., 1985), centenas de pesquisas têm sido desenvolvidas procurando achar novos fungos com capacidade de biodegradar diferentes compostos xenobióticos. Na Tabela 1.1 são apresentadas pesquisas recentes (desde 2015) focadas no tratamento de xenobióticos por fungos de podridão branca.

### 1.3.2. Micorremediação de corantes por fungos de podridão branca

Os WRF demonstraram ser os micro-organismos mais eficientes na biorremediação de corantes sintéticos e efluentes contendo corantes (KAUSHIK; MALIK, 2015). De forma similar ao tratamento de outros poluentes, descritos na Seção 1.3.1, a eficiência destes basidiomicetos na remoção de corantes é atribuída ao crescimento em forma de micélio e ao sistema enzimático (LMS) altamente oxidativo, não específico pelo substrato, e extracelular. Essas características dão vantagens aos WRF sobre outros micro-organismos para o tratamento de corantes.

Tabela 1.1. Fungos de podridão branca na micorremediação de xenobióticos

Classificação do poluente	Composto	Fungo – Enzima	Remoção (%)	Referência
Pesticidas	Nitenpyram e Dinotefuran	<i>Phanerochaete sordida</i>	20–31	WANG et al. (2019)
	Diuron (Herbicida)	<i>Trametes versicolor</i>	30– 35	MORI et al. (2018)
	Endrin	<i>Phlebia acanthocystis</i>	80	XIAO et al. (2019)
	Clotianidina	<i>Phanerochaete sordida</i> – MnP	37	MORI et al. (2017)
	Atrazina (herbicida)	<i>Trametes maxima</i> – Lac	100	CHAN-CUPUL et al. (2016)
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs)	Fenantreno e Benz(a)antraceno	<i>Pycnoporus sanguineu</i> – Lac	45–90	LI et al. (2018)
	Naftaleno, fenantreno e pireno	<i>P. chrysosporium</i> – Lac	80	TAHA et al. (2017)
	Fenantreno e fluorueno	<i>Trametes</i> sp. – MnP	90–95	ZHANG et al. (2016)
	Fluoranteno	<i>Pleurotus pulmonarius</i> – Lac	100	WIRASNITA et al. (2016)
Nitroaromáticos (Explosivos)	4-Nitrofenol	<i>T. versicolor</i> – Lac	97	LEVIN et al. (2016)
	2,4,6-trinitrotolueno (TNT)	<i>Phanerochaete velutina</i> – Lac	79	ANASONYE et al. (2015)
Medicamentos	Tiamulin (Antibiótico)	<i>T. versicolor</i> – MnP	85	NGUYEN et al. (2017)
	Diclofenaco e ibuprofeno	<i>T. versicolor</i> – Lac e MnP	100	VASILIADOU et al. (2016)
Outros	Dioxina	<i>Rigidoporus</i> sp. – Lac	73	DAO et al. (2019)
	Solos poluídos com PCBs	<i>P. ostreatus</i> e <i>Irpex lacteus</i>	40–50	STELLA et al. (2017)

O crescimento em forma micelial permite que os WRF sejam aplicados ao tratamento em diferentes matrizes (médio sólido ou líquido). Por exemplo, o fungo *Trametes versicolor* foi usado eficientemente na micodegradação de resíduos sólidos agroindustriais contendo o corante Vermelho 40. O processo foi realizado em condições de cultivo em fase sólida (JARAMILLO et al., 2017). No entanto, outra cepa de *T. versicolor* permitiu mais de 90% de degradação de diferentes corantes (Vermelho 114, Azul 62 e Preto 172) mas em condições de cultivo em fase líquida (YANG et al., 2017).

O sistema enzimático extracelular permite que os corantes sejam degradados fora das células, evitando possíveis efeitos tóxicos relacionados à alta concentração de corante. O fungo *Ganoderma* sp., por exemplo, permitiu mais de 90% de biodegradação dos corantes Azul de Remazol, Índigo de Carmim e Verde de Metila em altas concentrações (800–1000 mg L<sup>-1</sup>) (LU et al., 2016). De maneira similar, *T. versicolor*, mostrou tolerância a altas concentrações iniciais dos corantes Azul 62 e Preto 172 (até 800 mg L<sup>-1</sup>) (YANG et al., 2017). Adicionalmente, os extratos enzimáticos também podem ser usados na degradação dos corantes *in vitro*. O fungo *Leptosphaerulina* sp., por exemplo, foi eficiente na biodegradação do corante têxtil Preto de Remazol 5. Os melhores resultados foram atingidos com o fungo crescendo no efluente, mas os experimentos com um extrato enzimático com alta atividade lacase, produzido pelo fungo, também permitiram a degradação do corante (PLÁCIDO et al., 2016). Similarmente, o fungo *Trametes* sp. mostrou eficiência no tratamento *in vitro* dos corantes Vermelho Congo e Índigo de Carmim (LI et al., 2014).

A pouca especificidade das enzimas ligninolíticas com o substrato permite que os WRF sejam aplicados no tratamento de diferentes classes de corantes ou misturas entre eles, algo comum nos efluentes industriais. Por exemplo, *Trametes versicolor* permitiu a degradação de diferentes classes de corantes (ácidos, dispersos e reativos) (YANG et al., 2017). Similarmente, *Trametes polyzona* se mostrou eficiente na biodegradação de vários corantes têxteis, mas além disso permitiu a biodescoloração de uma mistura contendo corantes como Amarelo Levafix, Azul de Remazol e Vermelho Cibacron (CERRON et al., 2015).

Como já foi mencionada, a produção de enzimas ligninolíticas nos WRF não é homogênea e diferentes fungos podem produzir uma ou mais dessas enzimas (ARORA; SHARMA, 2010). Isso é uma vantagem na biodegradação de corantes por WRF, uma vez que todas as enzimas do LMS já foram reportadas pela atividade de degradação. O fungo selecionado para o tratamento não precisa ser necessariamente produtor de todas elas. Em alguns casos a cepa só produz uma dessas enzimas ou só algumas participam na biodegradação. *T. versicolor*, por exemplo, mostrou atividade Lac e MnP. No entanto, apenas Lac participou da biodegradação de corantes (JARAMILLO et al., 2017). Diferentemente, MnP de *Trametes* sp. foi a responsável na biodegradação de diferentes tipos de corantes (ZHANG et al. 2016).

As enzimas ligninolíticas são induzíveis. Vários compostos de baixa massa molar, com fácil difusão e alto potencial redox, estão envolvidos como mediadores, cofatores e indutores da degradação enzimática da lignina. Muitos deles, como  $H_2O_2$ ,  $Mn^{3+}$ , oxalato e ácido málico, tióis e álcool veratrílico, são secretados pelos WRF. Isso é uma vantagem para o tratamento de corantes, já que esses compostos podem ser adicionados para aumentar a eficiência do tratamento. Cofatores de peroxidase como  $MnCl_2$  e  $H_2O_2$  e mediadores redox como HBT (1-Hidroxibenzotriazol) e ABTS [(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6 ácido sulfônico)] foram reportados por melhorar a atividade de biodegradação de corantes por diferentes fungos (LI et al., 2014; LU et al., 2016; MA et al., 2014).

Outra vantagem dos WRF no tratamento de corantes é que podem ser usadas as cepas puras (PLÁCIDO et al., 2016; YANG et al., 2017) ou consórcios microbianos. Um consórcio microbiano formado por um WRF não identificado e a bactéria *Bacillus subtilis* resultou em 82% de degradação do corante Vermelho de Metila (JUSOH et al., 2017). O fungo *P. ostreatus* também mostrou melhores resultados no tratamento do corante Azul de Remazol quando foi usada a co-cultura com bactérias (lodo ativado) em biorreator. O consórcio atingiu 95% de degradação. A monocultura do fungo, no entanto, apenas permitiu 77% de remoção de cor (SVOBODOVA et al., 2016). A co-cultura de fungos também foi empregada através de um consórcio dos WRF *P. florida* e *R. solani* resultando em 98% de degradação do corante Verde Brillante. As monoculturas de cada fungo mostraram apenas entre 60–80% de remoção de cor (KUMARI; NARAIAN, 2016).

Existem diferentes metodologias que podem ser usadas no tratamento de corantes ou de efluentes coloridos. As formas de aplicação de micro-organismos no tratamento dependem do mecanismo do fungo a ser usado. Existem três mecanismos principais envolvidos no processo de remoção de corantes por intermédio dos fungos de podridão branca: biodegradação, bioacumulação e bioissorção. Nos mecanismos de biodegradação e bioacumulação se usa o fungo metabolicamente ativo. Na bioissorção, se utiliza a biomassa fúngica viva ou morta, usualmente pré-tratada física ou quimicamente. A bioissorção é um processo metabolicamente independente. (SEN et al., 2016).

No mecanismo de biodegradação, as moléculas de corante são mineralizadas ou degradadas a compostos mais simples através da ação das enzimas ligninolíticas. Na bioacumulação as moléculas de corantes são acumuladas dentro do citoplasma das células fúngicas. Na bioissorção, o mecanismo de remoção está relacionado à ligação das moléculas de corante aos grupos funcionais da superfície da biomassa fúngica (KAUSHIK; MALIK, 2015). Na Tabela 1.2 é apresentada uma comparação dos três mecanismos envolvidos na micorremediação.

### 1.3.3. Micodegradação

O termo biodegradação faz referência à transformação biológica de um composto químico. Na natureza, a biodegradação refere-se à decomposição enzimática da matéria orgânica, principalmente catalisada por enzimas produzidas por micro-organismos. A biodegradação é um processo essencial para os ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio, e outros elementos que participam do funcionamento dos sistemas vivos (CRAWFORD, 2011; DAS; DASH, 2014).

Em micorremediação, a biodegradação ou micodegradação, refere-se à degradação enzimática de moléculas complexas a compostos menores e mais simples. As moléculas originais são frequentemente compostos xenobióticos e recalcitrantes. Depois da biodegradação, esses poluentes são eliminados ou biotransformados em substâncias, quase sempre, menos nocivas ou tóxicas para o ambiente (SINGH; SINGH, 2015).

Tabela 1.2. Comparação entre os mecanismos de micorremediação dos fungos de podridão branca.

Característica	Mecanismo		
	Biodegradação	Bioacumulação	Biossorção
Metabolismo e energia	Processo ativo, dependente do metabolismo, existe crescimento celular.	Processo ativo, dependente do metabolismo, existe crescimento celular.	Processo não depende de metabolismo. Para células vivas pode ocorrer crescimento celular
Estado da biomassa	Organismo vivo, crescendo no efluente	Organismo vivo, crescendo no efluente	Organismo vivo ou morto
Ligação com as moléculas de corante	Reação extracelular	Ligação inicial à superfície celular, seguido da incorporação ao citoplasma da célula	Ligação à superfície celular
Princípio do mecanismo	Adsorção inicial seguida de mineralização ou biotransformação	Adsorção e absorção	Adsorção
Reversibilidade	Processo irreversível	Processo reversível	Processo reversível
Tempo	Processo longo de duas etapas	Processo de duas etapas: etapa rápida e etapa lenta	Processo rápido de uma etapa

Fonte: adaptado de Kaushik e Malik (2015).

A biodegradação pode ser total ou parcial. A biodegradação total é chamada de mineralização e define-se como a transformação de moléculas orgânicas em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, minerais e qualquer outro produto inorgânico. Na biodegradação parcial ou biotransformação, os compostos não são totalmente degradados, sendo alterados e fragmentados até moléculas menores e mais simples, chamadas de metabolitos de biodegradação. Nessas alterações, os novos fragmentos podem ser recombinados para produzir sua forma original ou outra estrutura (KAUSHIK; MALIK, 2015).

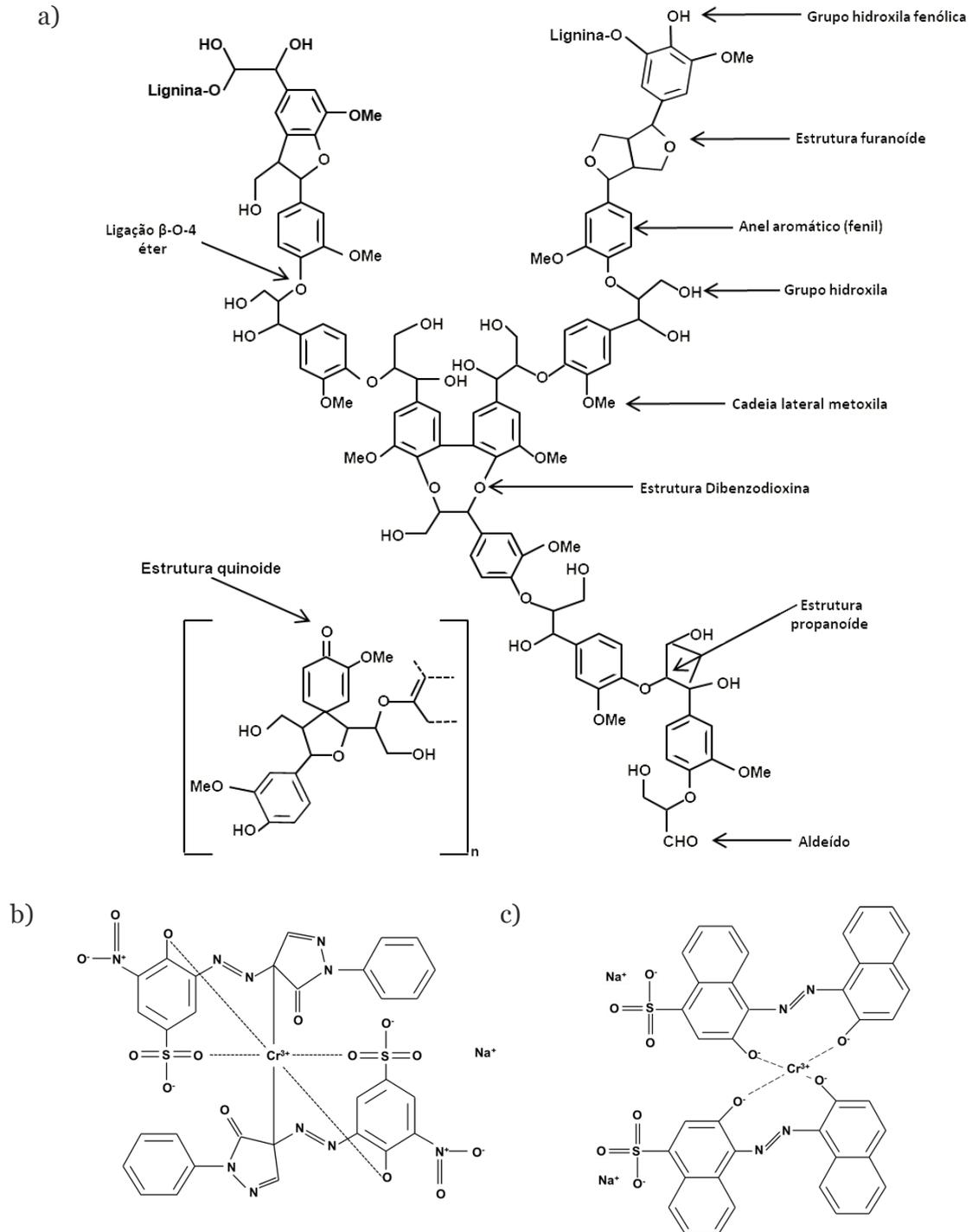
Conforme já mencionado, as enzimas ligninolíticas são inespecíficas, e podem ser usadas na biodegradação de compostos aromáticos semelhantes à lignina. Devido à semelhança entre a estrutura química da lignina e a da maioria dos corantes sintéticos, o uso de fungos de podridão branca e/ou suas enzimas têm sido amplamente aplicado no tratamento de corantes e efluentes de tingimento da indústria têxtil (RODRÍGUEZ-COUTO, 2015). Na Figura 1.5 é apresentado um modelo estrutural da lignina e a estrutura de alguns corantes.

Em geral, o mecanismo de micodegradação de corantes refere-se à quebra das ligações dentro da estrutura do corante (*e.g.* ligações tipo azo em cromóforos de corantes azoicos), resultando na formação de subprodutos. (KAUSHIK; MALIK, 2015; VIKRANT et al. 2018). Nos fungos de podridão branca, a biodegradação de corantes é um processo aeróbico e dependente de energia, mediado por enzimas lacases e/ou peroxidases (SEN et al., 2016). A biodegradação ocorre geralmente em duas etapas: *i*) clivagem do grupo cromóforo (*e.g.* azo), relacionada com a remoção de cor ou biodescoloração (KAUSHIK; MALIK, 2015) e *ii*) biotransformação dos metabolitos de biodegradação (*e.g.* aminas e grupos fenólicos) em moléculas menos complexas (ALI, 2010; VIKRANT et al., 2018).

A biodegradação pode seguir caminhos diferentes, dependendo do tipo de fungo, enzima envolvida e estrutura do corante (número, posição e classe dos grupos funcionais) (VIKRANT et al., 2018). Em alguns casos, a biodegradação é tão eficiente que a mineralização dos corantes é alcançada (ALI, 2010). A eficiência da biodegradação na remoção de corantes geralmente varia de 75 a 90% (KATHERESAN et al., 2018).

Todas as enzimas do sistema modificador da lignina dos fungos de podridão branca já foram associadas à biodegradação de corantes. As lacases fúngicas catalisam a degradação dos corantes aceitando um elétron do corante (MULLAI et al., 2017). Alguns mediadores redox como syringaldazine, HBT e ABTS são geralmente necessários para melhorar a degradação por lacases (SOLÍS et al., 2012). Lacases de *Leptosphaerulina* sp. (PLÁCIDO et al., 2016), *Trametes versicolor* (YANG et al., 2017; JARAMILLO et al., 2017), *Penicillium oxalicum* (SAROJ et al., 2014) e *Trametes* sp. (LI et al., 2014), já foram reportadas como as principais responsáveis na biodegradação de diversos corantes.

Figura 1.5. Modelo da estrutura química da lignina e corantes para couro



(a) Modelo estrutural da lignina destacando partes da estrutura que possuem similaridade com corantes sintéticos e são alvos de ataques enzimáticos;

(b) Corante Vermelho Ácido 357; (c) Corante Azul Ácido 161.

Fonte: adaptado de Kaushik e Malik (2015).

As peroxidases catalisam os corantes através de reações intermediárias tipo redox, usando  $H_2O_2$  comoceptor final de elétrons (KATHERESAN et al., 2018; SOLÍS et al., 2012). *P. chrysosporium*, por exemplo, mostrou eficiência na degradação do corante Vermelho Congo, (93%). A remoção esteve associada à atividade da enzima LiP induzida por álcool veratrílico (BOSCO et al., 2017). O fungo *Bjerkandera adusta* também apresentou alta atividade LiP, permitindo entre 91 – 99% de degradação de quatro corantes diferentes (Vermelho 120, Azul 4, Laranja 16 e Preto 5) (SODANEATH et al., 2017). *P. chrysosporium* também mostrou alta atividade da enzima MnP. O fungo *in vivo* permitiu 85% de degradação do corante Vermelho Congo. Um extrato enzimático do mesmo fungo também permitiu a degradação *in vitro* do corante (BOSCO et al., 2017). Outra enzima MnP extraída e purificada do fungo de podridão branca *Cerrena unicolour* permitiu entre 80 – 81% de degradação dos corantes Azul de Remazol e Violeta Cristal (ZHANG et al., 2018). Duas VPs produzidas pelo fungo *Cerrena* sp. mostraram atividade na degradação do corante Azul de Remazol (HIBI et al., 2012).

Cabe ressaltar que a biodescoloração está relacionada com a clivagem ou biotransformação do grupo cromóforo dos corantes, e não necessariamente confirma a degradação total da molécula de corante. Para demonstrar que a biodegradação ocorreu é necessário identificar e analisar os metabolitos de biodegradação. Além disso, os metabolitos produzidos não são necessariamente menos tóxicos que a molécula original. Algumas aminas aromáticas e fenóis, por exemplo, podem ter maior toxicidade e menor biodegradabilidade que os corantes precursores. Por isso é importante analisar a toxicidade dos efluentes antes e depois do tratamento (SEN et al., 2016; BRÜSCHWEILER; MERLOT, 2017;). Na Tabela 1.3 são apresentadas pesquisas recentes (desde 2015) focadas na micodegradação de corantes por WRF.

Tabela 1.3. Biodegradação de corantes por fungos.

Fungo	Corante [Concentração] <sup>a</sup>	Enzima [Atividade máxima] <sup>b</sup>	Biodegradação (%)	Condições operacionais tempo; pH; T <sup>c</sup> ; agt. <sup>d</sup>	Referência
<i>Trametes villosa</i>	Laranja Ácido 142	Lac (500 U L <sup>-1</sup> )	> 90	11 dias; pH= 5,5; T=30; agt= 200	ORTIZ- MONSALVE et al. (2019)
<i>Peroneutypa scoparia</i>	Vermelho 97 [100]	Lac (10 U mL <sup>-1</sup> )	93	6 h; pH= 6,0; T=40;	PANDI et al. (2019)
<i>Peyronellaea prosopidis</i>	Vermelho Escarlata	Lac (63 U min <sup>-1</sup> mg) e LiP (120 U min <sup>-1</sup> mg)	90	5 dias; pH = 6,0; T = 35;	BANKOLE et al. (2018)
<i>Coriolopsis</i> sp.	Azul de algodão [50] Violeta Cristal [100]	Lac, LiP e NADH - DCIP reductase	> 80	14 dias; pH = 5,0; estático	MUNCK et al. (2018)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Laranja Mordente [50]	–	83	30 dias; pH = 3,0; agt.= 120	HADIBARATA et al. (2018)
<i>Ceriporia lacerate</i>	Vermelho Congo [100]	MnP (113.82 U min <sup>-1</sup> mg)	90	48 h; pH = 8,0; T = 30 agt.= 120	WANG et al. (2017)
<i>Trametes villosa</i>	Vermelho Ac. 357 Azul Ac 161 [200]	Lac (1150–1550 U L <sup>-1</sup> )	> 90	168 h; pH = 5,5; T =30; agt.= 150	ORTIZ- MONSALVE et al. (2017)
<i>Trametes versicolor</i>	Azul Ácido 62 e Vermelho Ac. 114	MnP (1,19 U mL <sup>-1</sup> ) e Lac (2,39 U mL <sup>-1</sup> )	> 90	6 dias; pH = 5,0; T = 28; agt.= 150	YANG et al. (2017)
<i>Leptosphaerulina</i> sp.	Vermelho Novacron Preto de Remazol	Lac (650 U L <sup>-1</sup> ) e MnP (100 U L <sup>-1</sup> )	> 90	9 dias; pH = 5,0; T = 25; agt.= 150	PLÁCIDO et al. (2016)
<i>Ganoderma</i> sp.	Azul de Remazol [5000]	Lac (6700 U L <sup>-1</sup> )	> 95	96 h; pH = 5,0; T = 28; agt.= 150	LU et al. (2016)
<i>Trametes polyzona</i>	Azul de Remazol [400]	Laccase	97	96 h; pH = 6,0; T = 28; agt.= 175	CERRÓN et al. (2015)

<sup>a</sup> Concentração inicial de corante (mg L<sup>-1</sup>); <sup>b</sup> Máxima atividade enzimática; <sup>c</sup> T, Temperatura (°C); <sup>d</sup> agt, Agitação (rpm).

#### 1.3.4. Biossorção e bioacumulação

A biossorção é um processo de adsorção que ocorre em um biomaterial. O processo envolve uma fase sólida adsorvente (biossorvente) e uma fase líquida que contém o adsorvato a ser biossorvido (ALI, 2010). Na biossorção de corantes por fungos, o mecanismo consiste na ligação de vários grupos funcionais presentes na parede celular fúngica como amino, carboxila, tiol e fosfato, com as moléculas de corante. Outras reações como interações eletrostáticas, intercâmbio iônico, quelação e microprecipitação também podem ocorrer entre os grupos da parede celular e as moléculas de corante. Esse é um processo metabolicamente independente e rápido, podendo ser completado em poucas horas (KAUSHIK; MALIK, 2015).

Como a biossorção não depende do metabolismo celular, ela é independente de energia e, portanto, podem ser usadas células vivas ou mortas. Isso é uma vantagem, já que podem ser usados biossorvente de baixo custo como resíduos de biomassa fúngica de processos de fermentação industrial ou biorremediação (AKSU, 2005; KAUSHIK; MALIK, 2015). Além disso, usar células mortas economiza os custos de adição de nutrientes e do controle de variáveis operacionais focadas na manutenção do micro-organismo, necessárias em processos de biodegradação e bioacumulação. A biomassa morta pode ser utilizada e armazenada por longos períodos sem afetar a sua capacidade de biossorção, além do mais, a sua operação é fácil, a regeneração é simples e a reutilização é viável (KAUSHIK; MALIK, 2015). A biomassa morta de *T. villosa*, por exemplo, era descartada depois da biodegradação de corantes. No entanto, esses resíduos de biomassa foram aproveitados para preparar um biossorvente que permitiu a remoção do corante Azul Ácido 161 em solução aquosa e efluentes simulados contendo esse corante (PUCHANA et al., 2017). A biomassa morta do fungo *Panus tigrinus* também mostrou eficiência na biossorção do corante Azul Reativo 19, permitindo 83% de descoloração (MUSTAFA et al., 2017).

A biossorção obedece a uma distribuição termodinamicamente definida entre as fases sólida e líquida em equilíbrio. Essa distribuição é expressa como a quantidade de corante biossorvido por peso seco da biomassa. O equilíbrio do sistema é definido pelas isotermas de adsorção, que descrevem a interação do corante em solução com a biomassa fúngica, a uma temperatura constante. As isotermas mais usadas para descrever a remoção de corante através da biomassa fúngica são as de Langmuir e Freundlich (AKSU, 2005).

Vários parâmetros como pH, temperatura, concentração inicial de corante e tipo de corante, têm influência no rendimento do processo. A capacidade de biossorção da biomassa pode ser aumentada por certos pré-tratamentos físicos ou químicos como secagem, autoclavagem ou suspensão em substâncias orgânicas ou inorgânicas para modificação de grupos funcionais (KAUSHIK; MALIK, 2015).

A principal desvantagem da biossorção de corantes é que o problema não é erradicado, porque o poluente não é degradado, mas, em vez disso, é transferido a outra matriz. Nessa transferência, é necessária a posterior eliminação da biomassa microbiana contendo corantes. (ALI, 2010).

A bioacumulação é definida como a acumulação intracelular de um composto. Isso ocorre em duas etapas: *i*) o primeiro estágio é um processo de adsorção na superfície celular (biossorção). Essa etapa é rápida e não depende de energia, *ii*) o seguinte passo é um processo metabólico lento no qual o sorbato é transportado ao interior das células e é acumulado no citoplasma (CHOJNACKA, 2010).

Processos de micorremediação focados no mecanismo de bioacumulação são mais frequentes em fungos unicelulares, leveduras, tais como *Candida guilliermondii* (NGO et al., 2016) e *Scheffersomyces spartinae* (TAN et al., 2016). A bioacumulação também foi relatada em fungos miceliais, como o *Aspergillus lentulus*, que mostrou permitir 76% de remoção do corante Vermelho de Remazol por biossorção seguida de bioacumulação (MATHUR et al., 2018). Outro fungo com potencial de bioacumulação é o *Beauveria bassiana*, que permitiu entre 88–97% de descoloração, por meio desse mecanismo (GOLA et al., 2017).

A aplicação da bioacumulação na remoção de corantes com fungos de podridão branca não é comum, devido ao fato desse processo depender das condições operacionais, implicando na adição de nutrientes e na manutenção do micro-organismo (CHOJNACKA, 2010). Nesse mecanismo o corante permanece quase intacto no interior da biomassa microbiana para a sua posterior eliminação. Após essa análise, a biodegradação enzimática e biossorção terminam sendo mais eficientes (ALI, 2010). Na Tabela 1.4 são apresentadas pesquisas recentes (desde 2015) focadas na biossorção e bioacumulação de corantes por fungos.

Conforme mencionado anteriormente, os basidiomicetos de podridão branca são mais utilizados em processos de micorremediação mediado pela biodegradação enzimática, mas a biossorção e a bioacumulação de corantes podem ocorrer concomitantemente e ter participação na remoção de corante como no caso dos fungos *Coriolopsis* sp. (CHEN et al., 2015), *Leptosphaerulina* sp. (PLÁCIDO et al., 2016), *Ceriporia lacerata* (WANG et al., 2017) e *P. chrysosporium* (BOSCO et al., 2017). No presente trabalho é abordado principalmente o mecanismo de micodegradação.

### 1.3.5. Fatores que afetam a micorremediação

Os ecossistemas são ambientes dinâmicos com condições abióticas variáveis, como pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, metais, sais, etc. Os fungos, que têm um papel fundamental nos ciclos globais do carbono nitrogênio, estão adaptados aos seus ambientes e são afetados pelas alterações desses parâmetros. Conseqüentemente, suas atividades de biodegradação e biotransformação também são afetadas. Assim, a eficiência dos fungos na micorremediação dos corantes e outros xenobióticos, depende em grande parte desses parâmetros. A otimização de tais variáveis operacionais é de vital importância para o sucesso do tratamento. Nesta seção, alguns dos fatores que afetam a biodegradação de corantes sintéticos são discutidos. Esses fatores podem ser variáveis dependendo do mecanismo do micro-organismo que será utilizado. A revisão está mais orientada à biodegradação enzimática.

Tabela 1.4. Bioissorção/Bioacumulação de corantes por fungos.

Fungo	Corante [Concentração] <sup>a</sup>	Mecanismo	Remoção (%)	Capacidade máxima de adsorção. (mg g <sup>-1</sup> )	Quantidade de adsorvente (g L <sup>-1</sup> )	Tempo	Referência
<i>Mucor circinelloides</i>	Vermelho Congo [150]	Bioissorção	94	169,49	10	180 min.	AZIN e MOGHIMI (2018)
<i>Aspergillus lentulus</i>	Vermelho Reativo [2000]	Bioissorção e Bioacumulação	74,6	151	4 – 5	150 min.	MATHUR et al. (2018)
<i>Penicillium glabrum</i>	Vermelho Congo [50]	Bioissorção	–	101,01	0,33	180 min.	BOURAS et al. (2017)
<i>Aspergillus niger</i>	Vermelho Congo [50]	Bioissorção	> 98,5	263,2	80	12 h	LU et al (2017)
<i>Trametes villosa</i>	Azul Ác. 161[100]	Bioissorção	89,47	221,6	1,2	24 h	PUCHANA et al. (2017)
<i>Panus tigrinus</i>	Azul Reativo 19 [50]	Bioissorção	83,18	–	15	90 min.	MUSTAFA et al. (2017)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Verde Brilhante [50]	Bioissorção e Bioacumulação	99,93	65,35	–	16 h	DIL et al. (2017)
<i>Diutina rugosa</i>	Azul Índigo[10]	Bioissorção	99,7	–	2	5 days	BANKOLE et al. (2017)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Verde de Malaquita [35]	Bioissorção e Bioacumulação	100	–	–	24 h	ASFARAM et al. (2016)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Vermelho Congo [50]	Bioissorção	>99	344,83	20	24 h	WANG et al. (2015)
<i>Trametes pubescens</i>	Vermelho Congo [100]	Bioissorção	97,96	495,24	0,5	60 min.	SI et al. (2015)

<sup>a</sup> Concentração inicial de corante (mg L<sup>-1</sup>)

### 1.3.5.1. pH

Geralmente, as enzimas da maioria dos basidiomicetos mostram maiores atividades de biodescoloração e biodegradação em condições de pH ácidas a neutras, variando entre 4,0 e 5,0, sendo essa a faixa de pH na qual os fungos crescem normalmente (ALI, 2010; KAUSHIK; MALIK, 2009). Isso leva à conclusão de que os melhores rendimentos de biodegradação enzimática serão conseguidos nessa faixa de pH. Os efluentes industriais, contudo, nem sempre se encontram com esses valores de pH. Os efluentes de tingimento industriais, incluindo efluentes de acabamento molhado de couro, apresentam valores usuais de pH mais alcalinos, porém esse pH é bastante variável. As cepas fúngicas que mostrem atividade enzimática em uma faixa de pH mais ampla, portanto, serão as mais adequadas para uma possível aplicação industrial.

As enzimas ligninolíticas do fungo *T. trogii*, por exemplo, mostraram atividade máxima numa faixa de pH bastante ampla, variando de 6,0 a 11,0 (YESILADA et al., 2002). De maneira similar, o fungo *P. chrysosporium*, que apresentou máxima atividade de biodegradação em pH 7,0, também foi eficiente numa faixa mais ampla de pH variando entre 3,0 e 7,0 (SENTHILKUMAR et al., 2011). Os fungos podem apresentar tolerâncias diferentes a condições alcalinas ou ácidas. Uma cepa de *Ceriporia lacerata*, por exemplo, foi bastante suscetível a mudanças de pH: a descoloração foi significativa somente no pH de atividade enzimática ótima, equivalente a 7,0 (WANG et al., 2017).

No caso de tratamentos focados na biossorção, é necessário levar em consideração as cargas das moléculas de corante e a carga do micélio. As paredes celulares fúngicas são compostas por polissacarídeos, quitina, proteínas e lipídios que contêm vários grupos funcionais como aminas, carboxilas, tiois e fosfatos, que ligam as moléculas de corante (AKSU, 2005). O pH da solução afeta a ionização do corante e a carga superficial da biomassa, afetando assim a sua interação (WANG et al., 2017). Para o fungo *T. villosa* observou-se que as cargas positivas nos grupos funcionais da biomassa aumentaram a biossorção de ânions do corante Azul Ácido 161, carregado negativamente, devido à atração eletrostática (PUCHANA et al., 2017).

### 1.3.5.2. Concentração inicial de corante

A capacidade de degradação enzimática dos fungos de podridão branca é reduzida pelo aumento da concentração inicial de corante. A maioria dos autores concluem que o aumento da concentração inicial de corantes tem influência negativa na atividade enzimática e na produção de biomassa, fator atribuído ao efeito tóxico nas células do fungo, crescentes com maiores concentrações de corante (ALI, 2010). Além disso, o aumento da concentração do corante resulta em alterações no pH e uma maior quantidade de substâncias inibitórias, como sais metais pesados, associados às estruturas de corantes.

Alguns fungos, no entanto, são menos suscetíveis a esses efeitos. Altas concentrações de corante podem induzir a atividade de oxidases e peroxidases pela presença de grupos fenólicos na estrutura. Lacases são oxidases que usam uma variedade de compostos fenólicos como doadores de hidrogênio. Compostos químicos com natureza fenólica são indutores de lacase, como resultado da similaridade com a estrutura molecular da lignina (COPETE–PERTUZ et al., 2015).

Uma cepa de *Ganoderma* sp., por exemplo, demonstrou tolerância às altas concentrações de corante, obtendo 93,7% de descoloração de Laranja Reativo 16 em 4000 mg L<sup>-1</sup> (MA et al., 2014). A mesma cepa também mostrou resistência à concentração elevada de Azul de Remazol, apresentando valores entre 83,6–92,6% de descoloração em 4000–5000 mg L<sup>-1</sup> (LU et al., 2016). A lacase de *P. sanguineus* foi induzida por altas concentrações do corante Ácido Arminico, o que aumentou a atividade enzimática e a capacidade de biodegradação (HERNÁNDEZ et al., 2017).

### 1.3.5.3. Temperatura

A temperatura é um fator ambiental muito importante para as atividades naturais de biodegradação dos fungos, afetando a taxa de crescimento e reprodução dos mesmos. Além disso, as enzimas têm uma temperatura ótima, que propicia uma maior atividade enzimática. Os fungos ambientais possuem diferentes temperaturas ótimas de crescimento, com a maioria crescendo numa faixa com valores entre 25 e 35 °C (ALI, 2010).

Consequentemente, as temperaturas ótimas para o tratamento enzimático de corantes por fungos de podridão branca dependem de cada micro-organismo a ser usado, mas os fungos que demonstram potencial de biodegradação numa ampla faixa de temperatura são mais interessantes para possíveis aplicações industriais. Para o fungo *Ceriporia lacerata*, por exemplo, a temperatura foi um parâmetro importante na biodescoloração do corante Vermelho Congo. O fungo apresentou taxas de descoloração crescentes entre 4–30 °C, até atingir o melhor resultado de 88% de descoloração, a uma temperatura de 30 °C (WANG et al., 2017).

No mecanismo de biossorção, o efeito da temperatura é diferente. A maioria dos autores conclui que a capacidade de biossorção da biomassa fúngica aumenta com o aumento da temperatura. A temperatura produz um efeito de expansão estrutural na parede de quitina dos fungos, permitindo a entrada e saída de íons de corantes que penetrem na estrutura. A temperatura também aumenta a energia cinética das moléculas de corante, facilitando sua movimentação (KAUSHIK; MALIK, 2009). No fungo *T. villosa*, o processo de biossorção do corante Azul Ácido 161 foi eficiente a uma temperatura de 30 °C (PUCHANA et al., 2017). De modo similar, a biomassa do fungo de podridão branca *T. versicolor*, mostrou melhores rendimentos de biossorção a uma temperatura de 35 °C. O rendimento de remoção de cor aumentou quando a temperatura foi aumentada até 35 °C (BAYRAMOGLU; ARICA, 2007).

#### 1.3.5.4. Agitação e aeração

Nos ecossistemas, os fungos de podridão branca têm natureza aeróbia; portanto eles precisam de oxigênio para crescimento e manutenção. Além disso, as enzimas ligninolíticas são oxidases ou peroxidases que precisam de oxigênio na sua ação catalítica. Cada fungo tem necessidades de oxigênio diferentes (ALI, 2010). Na micorremediação de corantes, a exigência de oxigênio também tem influência no rendimento do tratamento. A agitação favorece a transferência e a distribuição de nutrientes e oxigênio (RODRÍGUEZ-COUTO, 2015).

A morfologia do fungo também é afetada pela agitação. Em cultivo estático, os fungos crescem formando uma suspensão homogênea de biomassa flutuando na superfície do meio de cultura (micélio aéreo). No entanto, quando crescidos com agitação em cultivo em fase líquida submersa, os fungos formam pequenas esferas de micélio (*pellets*), que se distribuem homogeneamente pelo meio de cultura, devido à rotação orbital. A disposição em forma de *pellets* da biomassa pode favorecer as condições de aeração e agitação, aumentando a transferência de oxigênio e nutrientes da fase líquida às células em crescimento (RODRÍGUEZ-COUTO, 2015). Os autores diferem sobre o efeito direto da agitação na atividade enzimática, alguns afirmam que a agitação tem um efeito negativo na atividade das enzimas ligninolíticas (ALI, 2010).

Pesquisas recentes mostram que a agitação permite atingir valores de atividade enzimática suficientes para biodegradar e/ou biodescolorir corantes sintéticos. A biodegradação de Vermelho Congo pelo fungo *Ceriporia lacerate*, por exemplo, apresentou os melhores resultados em condições de agitação a 120 rpm (WANG et al., 2017). Para *Corioloopsis* sp., os melhores valores de biodescoloração, de mais de 90% nos corantes Violeta Cristal, Violeta de Metila e Azul de Algodão, foram atingidos com 120 rpm (CHEN et al., 2015). O corante têxtil Laranja Reativo 16 foi biodegradado por lacases de *Ganoderma* sp. em condições de agitação de 150 rpm (MA et al., 2014). Posteriormente, outra cepa de *Ganoderma* sp. mostrou eficiência na micorremediação do corante Azul de Remazol, atingindo entre 80-97% de descoloração. A condição de 150 rpm de agitação foi ótima para o tratamento (LU et al., 2016). *Leptosphaerulina* sp. obteve mais de 90% de descoloração do corante Preto de Remazol com uma agitação de 150 rpm (PLÁCIDO et al., 2016).

#### 1.3.5.5. Nutrientes

Os métodos de micorremediação que envolvem a aplicação dos fungos crescendo metabolicamente ativos no efluentes são dependentes da adição de nutrientes. Esses nutrientes são constituídos, principalmente, por fontes de carbono e nitrogênio.

O carbono funciona como fonte de energia para o crescimento e a sobrevivência do fungo e como doador de elétrons na quebra enzimática de ligações nas moléculas de corante, como a ligação azoica nos cromóforos. A fonte de carbono, portanto, é essencial para mediar a biodegradação enzimática (RODRÍGUEZ-COUTO, 2015). Embora os compostos aromáticos semelhantes à lignina, como os corantes e outros xenobióticos, sejam ricos em carbono, até agora não foi possível demonstrar que esses compostos possam servir como fonte única de energia (ERIKSSON, 2010). Existem poucas bactérias capazes de usar o carbono nos corantes como sua fonte única de carbono. Essas bactérias clivam as ligações azoicas de forma redutiva e utilizam as aminas como fonte de carbono e energia (ALI, 2010).

No caso dos fungos, a produção das enzimas ligninolíticas está associada ao metabolismo secundário, o que indica a necessidade da adição de uma fonte de carbono alternativa (ERIKSSON, 2010; SWAMY; RAMSAY, 1999). A fonte de carbono mais comum usada nas pesquisas reportadas nesta seção foi a glicose, carboidrato simples que representa a principal fonte de energia para o metabolismo primário (LU et al., 2016; WANG et al., 2017). Na maioria dos casos a adição de glicose como fonte única de carbono primário aumenta a biodescoloração dos corantes, no entanto, em alguns casos é necessária a presença de várias fontes de carbono e, em outros, a presença de algumas fontes de carbono pode inibir a atividade enzimática e a descoloração (SOLÍS et al., 2012). Além do tipo de fonte de carbono, sua concentração também é um parâmetro importante. Baixas concentrações de carbono podem ser insuficientes para a ativação do sistema enzimático ligninolítico e altas concentrações de carbono podem inibir as enzimas e diminuir a biodegradação. Esses parâmetros dependem do fungo usado no tratamento (SOLÍS et al., 2012). O fungo *Armillaria* sp., por exemplo, foi testado na micodegradação do corante Vermelho Ac. 27 usando diferentes fontes de carbono. Os rendimentos de remoção foram glicose (86%) > sacarose (66%) > melaço (51%) > frutose (41%). No entanto, os autores reportaram que altas concentrações de glicose provocaram a repressão catabólica das enzimas ligninolíticas (ADNAN et al., 2016).

A glicose é uma fonte de carbono facilmente utilizável pela maioria dos fungos em condições de laboratório. No entanto, fontes de carbono alternativas mais econômicas devem ser utilizadas industrialmente no tratamento de efluentes: na descoloração do corante Laranja Reativo 16 usando o fungo de podridão branca *Cyathus bulleri*, farelo de trigo e resíduos de casca de laranja. O fungo mostrou alta atividade enzimática lacase e apresentou elevados valores de descoloração (VATS; MISHRA, 2017). Similarmente, o fungo *Pycnoporus sanguineus* permitiu 80% de descoloração do corante Azul de Remazol, usando como fonte de carbono o melaço de cana de açúcar (MARIM et al., 2016).

Fontes de nitrogênio, orgânico e inorgânico, são essenciais para o crescimento dos fungos. O nitrogênio também é bastante importante na atividade de biodegradação das enzimas ligninolíticas. A eficiência da descoloração, portanto, também depende da adição de fontes de nitrogênio. O metabolismo do nitrogênio orgânico é considerado essencial para a regeneração do NADH. Em várias espécies de fungos, no entanto, altas concentrações de nitrogênio podem inibir a atividade das enzimas ligninolíticas (ALI, 2010; KAUSHIK; MALIK, 2009).

A maioria dos autores concordam no fato de que meios de cultura com limitação de nitrogênio favorecem a produção e atividade das enzimas ligninolíticas (RODRÍGUEZ-COUTO, 2015). A adição de diferentes fontes de nitrogênio, orgânicas e inorgânicas, entretanto, não apresentam diferenças significativas nas atividades enzimáticas nem no potencial de biodescoloração de vários fungos (ADNAN et al., 2016; REVANKAR; LELE, 2007). No fungo *Armillaria*, foi avaliado o efeito de diferentes fontes de nitrogênio na atividade de enzimas ligninolíticas e a descoloração do corante Vermelho Ácido 27. Os autores concluíram que não houve diferença significativa na descoloração, atingindo valores entre 70–73% para as diferentes fontes de Nitrogênio usadas (cloreto de amônio, ureia, peptoma e extrato de levedura (VATS; MISHRA, 2017). No fungo *Pycnoporus sanguineu*, o uso de diferentes fontes de nitrogênio, como ureia e extrato de levedura, também não afetou a atividade enzimática nem o rendimento da biodescoloração do corante Azul de Remazol (MARIM et al., 2016).

Concluiu-se que meios com limitação de nitrogênio favorecem a atividade enzimática e a descoloração, e que diferentes fontes de nitrogênio não influenciam significativamente nessas atividades nos fungos de podridão branca. Fontes de nitrogênio mais baratas devem ser selecionadas para aplicações industriais ou a grande escala.

### 1.5. AVANÇOS RECENTES NO TRATAMENTO DE CORANTES POR WRF

Desde que o potencial do fungo *P. chrysosporium* para degradar e descolorir corantes poliméricos foi descrita pela primeira vez (GLENN; GOLD, 1983), centos de pesquisas têm sido desenvolvidas para aprimorar a eficiência da micorremediação de corantes e efluentes de tingimento. Várias revisões dos avanços tecnológicos na área estão sendo publicadas regularmente, compreendendo um grande número de pesquisas (FU; VIRARAGHAVAN, 2001; KAUSHIK; MALIK, 2009; ALI, 2010; SOLÍS et al., 2012).

Uma extensa revisão já foi apresentada sobre micorremediação na dissertação de mestrado “Estudos de descoloração de corantes para couro por isolados fúngicos nativos” (ORTIZ-MONSALVE, 2015). No presente estudo são discutidas, principalmente, pesquisas recentes publicadas desde 2015. Nesta seção é apresentado o estado da arte de avanços recentes na área. Na Tabela 1.5 são revisadas as principais pesquisas sobre micorremediação de corantes e efluentes de tingimento envolvendo o uso de fungos de podridão branca.

Apesar do potencial dos WRF para o tratamento de corantes e outros xenobióticos e do grande número de pesquisas na área, os sistemas de tratamento de efluentes que utilizam micorremediação ainda não são comumente aplicados em escala industrial. Isso se deve a algumas limitações e desvantagens do sistema, tais como a necessidade de adição de nutrientes, a esterilização e o ajuste e controle de variáveis operacionais. Outros fatores relacionados às características dos efluentes, como pH bastante ácido ou alcalino, altas concentrações e misturas de corantes, condições não estéreis e presença de outros compostos recalcitrantes (como surfactantes, metais pesados, ácidos, etc.), elevadas temperaturas e grandes volumes de efluente, terminam sendo fatores limitantes para a real aplicação em escala industrial.

As pesquisas recentes têm se centrado na solução destas limitações, na operação em escalas maiores, na imobilização enzimática e celular, extração e purificação de enzimas, manipulação genética, configurações de biorreatores, rotas e análises de metabolitos de degradação, uso de consórcios microbianos e biodetoxificação de efluentes contendo corantes (ecotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade).

Como mencionado anteriormente, o sistema enzimático de degradação da lignina é desenvolvido no metabolismo secundário. Embora os efluentes e o corantes conttenham carbono, a maioria dos WRF precisam de uma fonte de carbono assimilável adicional para garantir o crescimento e sobrevivência. A maioria dos estudos apresentados na literatura é desenvolvida em escala de laboratório e usa glicose como fonte de energia. No entanto, isso não é possível em escala industrial, já que representaria altos custos de operação. Industrialmente, esta limitação é contornada usando resíduos de outras indústrias como fontes de nutrientes.

Resíduos lignocelulósicos, melaço de cana, farelo de trigo, casca de laranja e arroz, já foram reportados como fontes de nutrientes eficientes para o micotratamento de corantes e efluentes de tingimento (ADNAN et al., 2016; MARIM et al., 2016; VATS; MISHRA, 2017).

Pensando em aplicações industriais, estudos em escala de reator são muitas vezes necessários para avaliar a eficiência da tecnologia desenvolvida. Diferentes configurações de biorreator têm sido propostas por vários pesquisadores. O desenho do reator depende do mecanismo fúngico que será aplicado no tratamento. Os reatores mais usados são os de tanque agitado contínuo, reatores de leito fixo ou leito fluidizado.

Uma cepa de *Irpex lacteus*, por exemplo, foi eficiente no tratamento dos corantes Laranja Reativo 16 e Azul de Hidroxi-naftol, em reator de leito fluidizado (SIMA et al., 2017). Similarmente, o fungo de podridão branca *Marasmiellus palmivorus* foi bastante eficiente na biodescoloração dos corantes Verde Ácido 28 e Azul Reativo 220, atingindo 90% e 75% de descoloração, respectivamente (CANTELE et al., 2017). A configuração de reator de leito fixo foi adequada para o tratamento com o fungo *P. ostreatus*, que atingiu 40,6% de remoção do corante Azul Brilhante de Remazol (SVOBODOVÁ et al., 2016).

O uso de biorreatores está relacionado com a imobilização celular. Até agora, no presente estudo, o crescimento em forma de micélio foi apresentado como uma das principais vantagens dos WRF em processos de biorremediação. No entanto, o crescimento micelial disperso no biorreator é associado a dificuldades de operação, como obstrução de canos, crescimento nas paredes e agitadores, formação de espuma e aumento da necessidade de mistura e fornecimento de oxigênio. A imobilização da biomassa fúngica reduz essas limitações, pelo que essa área tem sido foco de pesquisa recente. Os suportes usados na imobilização podem ser de encapsulamento, como alginato, ágar e quitosana, e de adesão, como esponjas de nylon e como espuma de poliuretano (RODRIGUEZ-COUTO, 2009).

O fungo *Pleurotus ostreatus*, por exemplo, foi imobilizado em espuma de poliuretano no tratamento do corante Azul de Remazol e efluentes simulados, apresentando entre 50–95% de remoção de cor (SVOBODOVÁ et al., 2016). Similarmente, o fungo *Irpex lacteus* foi eficiente na biodescoloração dos corantes Azul Brilhante de Remazol, Laranja Reativo 16 e Azul de Naftol, em um processo de tratamento usando alginato de cálcio como agente de imobilização (SIMA et al., 2017). Materiais alternativos também podem ser usados como suportes para imobilização. O fungo *T. versicolor*, por exemplo, foi imobilizado em resíduos de sorgo (planta gramínea), para o tratamento de efluentes industriais. A cepa atingiu 80% de remoção de biodescoloração em condições não estéreis (ZAHMATKESH et al., 2017).

Pesquisas recentes também focam na combinação de micorremediação e processos físico-químicos. Um processo de adsorção do corante Vermelho Ácido 40 usando resíduos agroindustriais combinado a um processo de micorremediação do resíduo sólido contendo o corante por meio do fungo *T. versicolor* é o exemplo da aplicação desse método. Esse tratamento combinado permitiu a remoção do corante do efluente (adsorção) e a degradação do corante do resíduo sólido (micorremediação) (JARAMILLO et al., 2017). Similarmente, o tratamento combinado usando micorremediação com o fungo *P. chrysosporium* e oxidação fotocatalítica permitiu a remoção dos corantes têxteis Vermelho Ácido 88 e Vermelho Reativo 180 (DEVECI et al., 2016).

Outro avanço importante no tratamento de efluentes de tingimento é a extração e purificação das enzimas ligninolíticas envolvidas no processo. Uma nova lacase purificada a partir de *Trametes* sp., por exemplo, mostrou alta estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura. O extrato enzimático permitiu mais de 60% de remoção de cor dos corantes Preto de Eriocromo T, Azul de Brilhante de Remazol e Verde de Malaquita (WANG et al., 2018). Similarmente, uma enzima MnP de *Trametes* sp. foi extraída e purificada. A enzima mostrou-se resistente à presença dos íons metálicos  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e permitiu entre 85–95% de biodescoloração dos corantes Índigo de Carmim, Azul Brilhante de Remazol, Violeta de Remazol 5R e Verde de Metila (ZHANG et al. 2016). Outra enzima MnP, mas extraída e purificada de *Cerrena unicolor* BBP6 foi efetiva na descoloração dos corantes Vermelho Congo (53,9%), Laranja de Metila (77,6%), Azul de Remazol (81,0%), Azul de Bromofenol (62,2%) Violeta Cristal (80,9%) (ZHANG et al., 2018).

## 1.6. COURO

O processo de produção de couro é um dos procedimentos industriais mais antigos do mundo. A cadeia de manufatura envolve uma sequência de operações unitárias que empregam compostos orgânicos e inorgânicos, tais como sais de cromo, taninos, sulfetos e corantes. Essa indústria tem relevância econômica no Brasil, já que o país tem um dos maiores rebanhos comerciais do mundo e tornou-se um importante produtor e exportador de couro a nível mundial (ABQTIC, 2019).

De forma geral, o processo de produção de couro está baseado na transformação de uma pele animal, um recurso natural renovável, em artigos manufaturados de primeira necessidade, como vestuário, calçado, etc. A pele, verde ou salgada, é transformada em couro através de uma série de operações unitárias que visam à limpeza, a estabilização e as qualidades de acabamento do produto. O processamento divide-se em três fases principais: ribeira, curtimento e acabamento.

Tabela 1.5. Estado da arte recente envolvendo o uso de WRF no tratamento de corantes e efluentes de tingimento.

Espécie de WRF	Corante/Efluente	Escala	Mecanismo	Micorremediação	Observação	Referencia
<i>Cerrena unicolor</i>	Vermelho Congo, Laranja Metila, Azul de Remazol	Laboratório	Biodegradação <i>in vitro</i> (MnP)	Até 90% de remoção de cor	Extração e purificação de MnP. Enzimas resistentes a diferentes íons metálicos. Tratamento <i>in vitro</i>	ZHANG et al. (2018)
<i>Cyathus bulleri</i>	Efluente têxtil real	Laboratório	Biodegradação <i>in vitro</i>	40% de remoção de cor	Foram usadas fontes alternativas de nutrientes Farelo de trigo e casca de laranja e analisadas as rotas de degradação	VATS et al. (2017)
<i>Trametes</i> sp.	Preto Eriocromo, Azul de Remazol Verde Malaquita	Laboratório	Biodegradação <i>in vitro</i> (lacase)	60% de remoção cor	Extração e purificação de lacase. Enzimas resistentes em pH e temperatura elevada. Tratamento <i>in vitro</i>	WANG et al. (2018)
<i>T. versicolor</i>	Efluente industrial	Laboratório (500 mL)	Biodegradação <i>in vivo</i> (lacase)	Até 80% de remoção cor	Tratamento sequencial durante 19 dias, permitindo 80%, 70%, 50% e 40% de remoção	ZAHMATKESH et al. (2017)
<i>M. palmivoru</i>	Azul Reativo 220 Verde Ácido 28	Reator de tanque agitado	Biodegradação <i>in vitro</i> (lacase)	75–90% de remoção de cor	Tratamento por biodegradação enzimática usando um reator de tanque agitado. Foram avaliadas diferentes condições de operação.	CANTELE et al. (2017)
<i>Trametes</i> sp.	Índigo Carmim Azul de Remazol Verde de Metila Violeta Remazol	Laboratório	Biodegradação <i>in vitro</i> (MnP)	Entre 85–95% de remoção de cor	Extração e purificação de MnP. Enzimas resistentes a diferentes íons metálicos. Tratamento <i>in vitro</i>	ZHANG et al. (2016)

### 1.6.1. Processamento do couro

A fase de ribeira envolve vários processos mecânicos, químicos e biológicos, que tem como objetivo remover sujeira, pelo, epiderme, proteínas não colagenosas e gordura da pele verde ou conservada, visando abrir as fibras de colágeno de modo a favorecer os processos subsequentes de curtimento e acabamento. Após o processo da ribeira, o couro piquelado está preparado para uma fácil penetração dos agentes de curtimento (MELLA et al., 2015; WANG et al., 2016).

No curtimento, as peles são tratadas com agente curtente que reage com a proteína da pele, deslocando a água intercelular e combinando-se com as fibras de colágeno. Os processos de curtimento são classificados de acordo com o agente de curtimento aplicado, como sais de cromo ou taninos. O curtimento usando sulfato de cromo é o método mais comum, resultando em couros leves, de menor custo e de alta resistência (AGUSTINI et al., 2018).

O acabamento visa conferir as características definitivas do couro, como cor, firmeza, maciez e toque, atendendo às especificações do produto, tais como resistência físico-mecânica, físico-química e microbiológica. O acabamento molhado é realizado em meio aquoso e inclui a desacidulação, recurtimento, tingimento e engraxe, após o couro é submetido aos processos de pré-acabamento (como o amaciamento) e acabamento (como a aplicação de produtos poliméricos formadores de filme sobre o couro) (GOMES et al., 2016).

### 1.6.2. Tingimento de couro

O tingimento é uma operação realizada na etapa de acabamento molhado do couro. O processo visa conferir as características sensoriais do produto, como a cor, saturação e uniformidade, garantindo a estabilidade química e física do couro. O tingimento tem bastante importância nas operações de pós-curtimento, uma vez que essas características relacionadas com a aparência são as primeiras a serem avaliadas, de modo visual, pelo consumidor.

O tingimento é realizado no couro já curtido e consiste na fixação de moléculas de corantes orgânicos solúveis à rede de fibras da pele por meio das atrações eletrostáticas. Assim, nivelam-se e corrigem-se defeitos no lado da flor, parte externa, com o objetivo de elevar a qualidade do couro. Convencionalmente, essa etapa é realizada em fulões contendo banho aquoso, nos quais são adicionados o couro curtido e os corantes em pó. O fulão é um reator cilíndrico usualmente disposto horizontalmente, configurado para rotar em torno do seu eixo horizontal e fornecer a ação mecânica que facilita a penetração dos solutos na solução aquosa, como corantes, à pele ou couro (PICCIN et al., 2016).

Os corantes são moléculas orgânicas de natureza aromática, solúveis em meio ácido, neutro ou básico e possuem uma estrutura molecular não saturada (eletricamente instáveis). A maioria dos corantes usados na indústria têm origem sintética. Os corantes têm a capacidade de conferir sua própria cor ao material sobre o qual se fixam. As moléculas de corante se compõem de dois elementos principais: o cromóforo, encarregado de dar a cor característica de cada corante e os auxócromos, que complementam a ação do cromóforo e ajudam a tornar as moléculas de corante solúveis em água e aprimorar a fixação nas fibras da pele (HUNGER, 2003; MELLA et al., 2017a).

Os corantes para couro precisam ter características especiais e são selecionados de acordo com a tecnologia de curtimento e tingimento a ser aplicada. Os corantes ácidos são os mais utilizados na indústria do couro devido à sua capacidade de fixação à superfície do substrato. Cerca de 1500 corantes de curtume estão listados no Colour Index e mais de 1000 são corantes ácidos (PÜNTENER, 2002).

Os corantes ácidos empregados na indústria de couro são geralmente azoicos ou antraquinônicos, associados a complexos metálicos (PANDI et al., 2019). Esses corantes são os mais usados, devido ao seu amplo espectro de tons, maior brilho, intensidade e por conferirem boa uniformidade e estabilidade à cor do produto. Os corantes azoicos caracterizam-se pelo grupo cromóforo tipo azo ( $-N=N-$ ), que pode estar em diferentes proporções (monoazo, diazo, triazo ou poliazo), ligado, geralmente, a radicais fenil e naftil, que, por sua vez, estão ligados em diferentes combinações de grupos funcionais, como amino ( $NH_2$ ), cloro (Cl), hidroxilo (OH), metilo ( $CH_3$ ) e sais de sódio ( $SO_3Na$ ).

Os grupos funcionais dos corantes ligam-se covalentemente à superfície do couro, conferindo alta estabilidade e resistência, que são as propriedades mais importantes dos corantes (RODRÍGUEZ-COUTO, 2015). Durante a etapa de acabamento molhado, outros compostos, além dos corantes, são adicionados ao processo para garantir a qualidade desejada e as propriedades físicas e químicas do produto. Entre esses compostos estão os agentes recorrentes, óleos, e surfactantes, entre outros (PICCIN et al., 2016).

### 1.6.3. Efluentes de tingimento

Conforme já mencionado, o tingimento é realizado em meio líquido, envolvendo um alto volume de água. Os corantes têm diferentes taxas de exaustão do meio aquoso e diferentes maneiras de fixação. Além disso, o couro é um produto natural com uma estrutura tridimensional complexa, e tanto no interior quanto na superfície das fibras, há variações de espessura e densidade, além de outros fatores como a distribuição irregular das gorduras, sulcos e dobras, e as imperfeições naturais da pele, como cicatrizes e rugas. Essa natureza heterogênea da pele tornam o couro um substrato difícil de tingir (PÜNTENER, 2002).

Algumas vezes, visando garantir uma maior fixação, os produtos de acabamento são aplicados em excesso. Problemas de difusão e afinidade causam o esgotamento incompleto dos corantes. A concentração de corante no efluente varia em grande medida, dependendo da tecnologia de curtimento e tingimento empregada, capacidade da planta e tipo de couro e corante selecionados (PÜNTENER, 2000).

Além dos corantes, muitos dos compostos químicos utilizados no acabamento molhado como surfactantes recorrentes e auxiliares de tingimento, também são descartados junto com o efluente contendo corante. Os efluentes de acabamento molhado caracterizam-se pela presença de cor, alta demanda biológica de oxigênio (DBO), alta demanda química de oxigênio (DQO), altas concentrações de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio (TN) e toxicidade (GUTTERRES et al., 2015; SAXENA et al., 2017).

A descarga de efluentes sem tratamento adequado é motivo de grande preocupação, não só pela poluição visual indesejável associada à cor das águas residuais, mas também pelos impactos negativos no meio ambiente, como a inibição da fotossíntese aquática, a redução de capacidade de reoxigenação da água, depleção de oxigênio dissolvido e toxicidade aguda e crônica que afetam a flora, a fauna e humanos (RODRÍGUEZ-COUTO, 2015). Portanto, o tratamento de efluentes de acabamento molhado contendo corantes continua sendo um desafio que motiva a aplicação de novas estratégias de tratamento.

#### 1.6.4. Processos físico-químicos de tratamento

Tecnologias de tratamento físico-químicas e biológicas são usadas para o tratamento de águas residuais de curtume. Essas tecnologias incluem:

- i) Pré-tratamento-equalização/neutralização, onde os efluentes são submetidos a tratamento primário para separar sólidos suspensos por técnicas físicas ou químicas como coagulação, floculação e filtração;
- ii) Tratamento biológico, secundário ou de lodos ativados, onde a matéria orgânica é estabilizada usando micro-organismos;
- iii) Tratamento terciário, que envolve processos físico-químicos como adsorção, troca iônica, oxidação química ou eletroquímica, osmose reversa, ozonização e separação por membrana. (MELLA et al., 2017a; SAXENA et al., 2017).

As tecnologias convencionais não são sempre completamente adequadas para o tratamento de corantes por causa de fatores como custo, aplicabilidade limitada, baixa eficiência, grandes quantidades de lodo remanescente, que envolvem manipulação e disposição dos resíduos produzidos e/ou regeneração de materiais adsorventes saturados. Além disso, esses métodos muitas vezes não degradam totalmente os corantes nos efluentes, o que representa grande preocupação para os ecossistemas e saúde humana (MELLA et al., 2017a; SAROJ et al., 2014).

O tratamento dos efluentes contendo corantes continua motivando pesquisas para a aplicação de novas tecnologias como ozonização (MELLA et al., 2017a), oxidação Fenton (CRUZ et al., 2017; KARTHIKEYAN et al., 2015) e emprego de materiais adsorventes alternativos como resíduos sólidos de couro curtido (GOMES et al., 2016; PICCIN et al., 2016) ou resíduos de pelo (MELLA et al. 2017b), carvão ativado produzido a partir de lodo residual de plantas de tratamento de efluentes de curtume (PUCHANA et al., 2016) e biomassa de micro-organismos como algas (DA FONTOURA et al., 2017) ou fungos (PUCHANA et al., 2017).

A micorremediação desses efluentes também aparece como uma alternativa rápida, barata, menos dispendiosa e ambientalmente compatível.

## REFERÊNCIAS

- ABQTIC. The Brazilian Leather Guide. Chemists, Association of Leather Technicians and Chemist. 26, p. 298–319, 2019.
- ADNAN, L., et al. Biodegradation pathway of Acid Red 27 by white-rot fungus *Armillaria* sp. and phytotoxicity evaluation. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 44, p. 239–246, 2016.
- AGUSTINI, C., et al. M. Biogas production for anaerobic co-digestion of tannery solid wastes under presence and absence of the tanning agent. *Resources, Conservation and Recycling*. 130, p. 51–59, 2018.
- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes: A review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 213, 1–4, p. 251–273, 2010.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40, 3, p. 997–1026, 2005.
- ANASONYE, F., et al. Bioremediation of TNT contaminated soil with fungi under laboratory and pilot scale conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 105, p. 7–12, 2015.

- ANASTASI et al. Integrated fungal biomass and activated sludge treatment for textile wastewaters bioremediation *Bioresour. Technol.* 123, p. 106–111, 2012.
- ANASTASI et al. Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*. *Bioresour. Technol.* 101, p. 3067–3075, 2010.
- ARORA, D.S.; SHARMA, K.S. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied biochemistry and biotechnology.* 160, 6, p. 1760–1788, 2010.
- BACCAR et al. Decolourisation of a tannery dye: from fungal screening to bioreactor application. *Biochem. Eng. J.* 56, p.184–189, 2011.
- BANKOLE, P., et al. Biodegradation and detoxification of Scarlet RR dye by a newly isolated filamentous fungus, *Peyronellaea prosopidis*. *Sustainable Environment Research*, 28, 5, p. 214–222, 2018.
- BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Biosorption of benzidine based textile dyes “Direct Blue 1 and Direct Red 128” using native and heat-treated biomass of *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 143, 1, p. 135–143, 2007.
- BETTS, W.B., et al. Biosynthesis and Structure of Lignocellulose. Em: BETTS, W. B. (Ed.). *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. Springer Series in Applied Biology. London: Springer London. p. 139–155, 1991.
- BODDY, L.; JONES, T.H. Mycelial Responses in Heterogeneous Environments: Parallels with Macroorganisms. Em: GADD, G. M.; WATKINSON, S.; DYER, P. (Eds.). *Fungi in the Environment* [s. 6]. First Edition. Cambridge: Cambridge University Press. p. 112–140, 2007.
- BOSCO, F.; MOLLEA, C.; RUGGERI, B. Decolourisation of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium*: the role of biosorption and biodegradation. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 38, 20, p. 2581–2588, 2017.

- BRÜSCHWEILER, B.J.; MERLOT, C. Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 88, p. 214–226, 2017.
- BUMPUS, J.A., et al. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, 228, 4706, p. 1434–1436, 1985.
- CANTELE, C. et al. Production, characterization and dye decolorization ability of a high level laccase from *Marasmiellus palmivorus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, p. 15–22, 2017.
- CERRON, L.M., et al. Decolourisation of textile reactive dyes and effluents by biofilms of *Trametes polyzona* LMB-TM5 and *Ceriporia* sp. LMB-TM1 isolated from the Peruvian rainforest. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226, 8, 2015.
- CHEN, S.H. et al. Biodecolourisation and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Coriolopsis* sp. isolated from compost. *Journal of environmental management*, 150, p. 274–280, 2015.
- CHAN–CUPUL, W., et al. Atrazine degradation by fungal co-culture enzyme extracts under different soil conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 51, 5, p. 298–308, 2016.
- CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation—the prospects for practical applications. *Environment International*, 36, 3, p. 299–307, 2010.
- COPETE-PERTUZ, L.S., et al. Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina* sp. *BMC Biotechnology*. 15, p. 1–13, 2015.
- CRAWFORD, R.L. Biodegradation: principles, scope, and technologies. Em: MOO–YOUNG, M. (Ed). *Comprehensive Biotechnology* [s. 6.02]. Academic Press, p. 3–13, 2011.

- CRUZ, A., et al. Application of electro-Fenton/BDD process for treating tannery wastewaters with industrial dyes. *Sep. Purif. Technol.* 172, p. 296–302, 2017.
- CULLEN, D. Wood Decay. Em: MARTIN, F. (Ed.). *The Ecological Genomics of Fungi* [s. 3]. First edition. Oxford: John Wiley & Sons, Inc. p. 43–62, 2014.
- DA FONTOURA, J., et al. Defatted microalgal biomass as biosorbent for the removal of acid Blue 161 dye from tannery effluent. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, p. 5076–5084, 2017.
- DAO, A. et al. Screening white-rot fungi for bioremediation potential of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Industrial Crops and Products.* 128, p. 153–161.
- DAS, S.; DASH, H.R. Microbial bioremediation: a potential tool for restoration of contaminated areas. Em: DAS, S. (Ed.). *Microbial biodegradation and bioremediation* [s. 1]. Elsevier. p. 1–21, 2014.
- DEVECI, E., et al. Degradation of Recalcitrant Textile Dyes by Coupling Fungal and Photocatalytic Membrane Reactors. *Clean-Soil, Air, Water*, 44, 10, p. 1345–1351, 2016.
- DIGHTON, J. Introduction. Em: DIGHTON, J. (Ed.). *Fungi in Ecosystem Processes* [s. 1]. Second Edition. Boca Ratón: CRC Press: Taylor & Francis Group. p. 1–16, 2016.
- ERIKSSON, K.E. Lignin Biodegradation. Em: HEITNER, C.; DIMMEL, D.; SCHMIDT, J. (Eds.). *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry* [s. 14]. First Edition. Boca Ratón: CRC Press: Taylor & Francis Group, p. 495–520, 2010.
- EVANS, C.; HEDGER, J. Degradation of plant cell wall polymers. Em: GADD, G.M.E. (Ed.). *Fungi in Bioremediation* [s. 1]. Cambridge: Cambridge University Press. p. 1–26, 2001.
- FRICKER, M., et al. Mycelial Networks: Structure and Dynamics. Em: BODDY, L.; FRANKLAND, J. C.; VAN WEST, P. (Eds.). *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes* [s. 11]. First Edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p. 3–18, 2008.

- FU, Y; VIRARAGHAVAN, T . Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology*, 79,p 251–262, 2001.
- GLENN, J. K.; Gold, h. Decolorisation of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 6, p. 1741–1747, 1983.
- GOLA, D., et al. Removal of industrial dyes and heavy metals by *Beauveria bassiana*: FTIR, SEM, TEM and AFM investigations with Pb(II). *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1–11, 2017.
- GOMES, C.S., et al. Optimising adsorption parameters in tannery dye-containing effluent treatment with leather shaving waste. *Process Saf. Environ. Prot.* P. 99, p. 98–106, 2016.
- GUTTERRES et al. Characterisation of raw wastewater from tanneries. *J. Soc. Leather, Technol. Chem.* 99, p. 280–287, 2015.
- HADIBARATA, T., et al. Biodegradation of Mordant Orange-1 using newly isolated strain *Trichoderma harzianum* RY44 and its metabolite appraisal. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41, 5, p. 621–632, 2018.
- HATAKKA, A. Biodegradation of Lignin. *Biopolymers Online*. p. 129–145, 2005.
- HERNÁNDEZ,C., et al. Laccase induction by synthetic dyes in *Pycnoporus sanguineus* and their possible use for sugar cane bagasse delignification. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101, p. 1189–1201, 2017.
- HIBI, M., et al. Extracellular oxidases of *Cerrena* Sp. complementarily functioning in artificial dye decolorization including laccase, manganese peroxidase, and novel versatile peroxidases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1, 3, p. 220–225, 2012.
- HUNGER, K. Important chemical chromophores of dye classes. Em: HUNGER, K. (Ed.). *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications* [s. 2]. First Edition. Freiburg: Wiley. p. 13–112, 2003.

- IBGE. Produção da Pecuária Municipal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. p. 1–9, 2017.
- JARAMILLO, A.C., et al. Degradation of adsorbed azo dye by solid-state fermentation: Improvement of culture conditions, a kinetic study, and rotating drum bioreactor performance. *Water, Air, and Soil Pollution*. 228:205, 2017.
- JUSOH, N., et al. Biodecolourisation of methyl red dye by bacterial-fungal consortium. *Chemical Engineering Transactions*, 56, p. 1537–1542, 2017.
- KARTHIKEYAN et al. *In situ* generation of hydroxyl radical by cobalt oxide supported porous carbon enhance removal of refractory organics in tannery dyeing wastewater. *Colloid Interface Sci.* 448, p. 163–174, 2015.
- KATHERESAN, V., et al. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6 (4): p. 4676–4697, 2018.
- KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourisation: recent advances and future potential. *Environment international*, 35, 1, p. 127–41, 2009.
- KAUSHIK, P.; MALIK, A. Mycoremediation of Synthetic Dyes: An Insight into the Mechanism, Process Optimisation and Reactor Design. Em: SINGH, S. N. (Ed.). *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters*. Environmental Science and Engineering [s.1]. First Edition. Cham: Springer. p. 1–25, 2015.
- KIRK, T.K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. Em: YOUNG, R. A.; AKHTAR, M. (Eds.). *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry* [s. 9]. First Edition. Atlanta: TAPPI Press. p. 273–308, 1998.
- KULSHRESHTHA, S., et al. Mushroom as a Product and their Role in Mycoremediation. *AMB Express*, 4, 1, p. 1–7, 2014.

- KUMARI, S.; NARAIAN, R. Decolourisation of synthetic brilliant green carpet industry dye through fungal co-culture technology. *Journal of Environmental Management*, 180, p. 172–179, 2016.
- KUWAHARA, M., et al. Separation and characterisation of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 169, 2, p. 247–250, 1984.
- LEVIN, L., et al. Degradation of 4-nitrophenol by the white-rot polypore *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 107, p. 174–179, 2016.
- LI, H.X., et al. In vivo and in vitro decolourisation of synthetic dyes by laccase from solid state fermentation with *Trametes* sp. SYBC-L4. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 37, p. 2597–2605, 2014.
- LI, X., et al. Diversity of phenanthrene and benz[a]anthracene metabolic pathways in white rot fungus *Pycnoporus sanguineus* 14. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 134, p. 25–30, 2018.
- LU, R., et al. White-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 had a strong ability to decolourise and tolerate the anthraquinone, indigo and triphenylmethane dye with high concentrations. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39, 3, p. 381–390, 2016.
- MA, L., et al. Efficient Decolourisation and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China. *Biochemical Engineering Journal*, 82, p. 1–9, 2014.
- MARIM, R., et al. Use of sugarcane molasses by *Pycnoporus sanguineus* for the production of laccase for dye Decolourisation. *Genetics and Molecular Research*, 15, 4, p. 1–9, 2016.
- MARGULIS, L.; CHAPMAN, M.J. Kingdom Fungi. Em: MARGULIS, L.; CHAPMAN, M. J. (Eds.). *Kingdoms and Domains*. Fourth edition. London: Elsevier Academic Press. p. 379–409, 2009.

- MATHUR, M., et al. Performance evaluation of two *Aspergillus* spp. for the decolourisation of reactive dyes by bioaccumulation and biosorption. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, p. 345–352, 2018.
- MELLA et al. Removal of chromium from tanning wastewater and its reuse. *Process Saf. Environ. Prot.* 95, p. 195–201, 2015.
- MELLA, B., et al. Treatment of leather dyeing wastewater with associated process of coagulation-flocculation/adsorption/ozonation. *Ozone: Science and Engineering*. 40, 2, p. 133–140, 2017a.
- MELLA et al. Utilisation of tannery solid waste as an alternative biosorbent for acid dyes in wastewater treatment. *Journal of Molecular Liquids*. 242, p. 137–145, 2017b.
- MONEY, P. Fungal Cell Biology and Development. Em: WATKINSON, S.C., MONEY, N.P., BODDY, L. (Eds.). *The Fungi* [s. 2]. Third Edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p. 37–66, 2016.
- MORI, T., et al. Biodegradation of diuron in artificially contaminated water and seawater by wood colonized with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Wood Science*. 64, 690–696, 2018.
- MORI, T., et al. Bioremediation of the neonicotinoid insecticide clothianidin by the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. *Journal of Hazardous Materials*. 321, 586–590, 2017.
- MULLAI, P., et al. Aerobic treatment of effluents from textile industry. Em: LEE, D.J., et al. (Eds). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Biological Treatment of Industrial Effluents*. [s. 1]. p. 3–34, 2017.
- MUNCK, C., et al. Biofilm formation of filamentous fungi *Corioloropsis* sp. on simple muslin cloth to enhance removal of triphenylmethane dyes. *Journal of Environmental Management*, 214, p. 261–266, 2018.

- MUSTAFA, M. et al. *Panus tigrinus* as a potential biomass source for Reactive Blue Decolourisation: Isotherm and kinetic study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 26, p. 7–11, 2017.
- NGO, A. C. R.; DEVANADERA, M. K. P.; DEDELES, G. R. Decolourisation of Selected Synthetic Textile Dyes by Yeasts from Leaves and Fruit Peels. *Journal of Health and Pollution*, 6, 10, p. 42–55, 2016.
- NGUYEN, T.K., et al. Tiamulin removal by wood-rot fungi isolated from swine farms and role of ligninolytic enzymes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 116, 147–154, 2017.
- ORTIZ-MONSALVE, S. Estudos de remoção 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.
- ORTIZ-MONSALVE, S., et al. Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa*. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, p. 437–451, 2017.
- ORTIZ-MONSALVE, S., et al. Biodecolourization and biodegradation of dye-containing wastewaters from leather dyeing by the native fungal strain *Trametes villosa*. *Biochemical Engineering Journal*, 141, p. 19–28, 2019.
- PANDI, A., et al. A sustainable approach for degradation of leather dyes by a new fungal laccase. *Journal of Cleaner Production*. 211, p. 590–597, 2019.
- PLÁCIDO, J., et al. Degradation and detoxification of synthetic dyes and textile industry effluents by newly isolated *Leptosphaerulina* sp. from Colombia. *Bioresources and Bioprocessing*, 3, 1, p. 1–14, 2016.
- PICCIN, J., et al. Colour removal from real leather dyeing effluent using tannery waste as an adsorbent. *J. Environ. Chem. Eng.* 4, p 10611–1067, 2016.

- PUCHANA 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*. 504, p. 105–115, 2016.
- PUCHANA, M., et al. Fungal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye in aqueous solution. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 4, p. 4200–4209, 2017.
- PÜNTENER, A. Leather dyes. Em: FREEMAN, H.S.; PETERS, A.T. (Eds.). *Colourants for Non-Textile Applications* [s. 11]. First Edition. Amsterdam: Elsevier Science. p. 478–484, 2000.
- PÜNTENER, A. G. Leather dyes. Em: HUNGER, K. (Ed.). *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications* [s. 5]. First Edition. Freiburg: Wiley. p. 427–541, 2002.
- REVANKAR, M; LELE, S.S. Synthetic dye Decolourisation by white rot fungus *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresour. Technol.*, 98, 4, p. 775–80, 2007.
- RODRÍGUEZ-COUTO, S., et al. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolourisation of dyes from a leather factory. *Eng. Life Sci.* 4, p. 233–238, 2004.
- RODRÍGUEZ-COUTO, S. Degradation of azo dyes by white-rot fungi. In: SINGH, S.N. (Ed.). *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters* [s. 14]. First Edition. Cham: Springer. p. 315–331, 2015.
- SAROJ et al. Biodegradation of azo dyes acid red 183, direct blue 15 and direct red 75 by the isolate *Penicillium oxalicum* SAR-3. *Chemosphere*. 107, p. 240–248, 2014.
- SAXENA et al. Environmental pollution, toxicity profile and treatment approaches for tannery wastewater and its chemical pollutants. Em: DE VOOGT, P. (Ed.). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. First Edition. Cham: Springer. 240, p. 31–69, 2017.

- SEN, S.K., et al. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. *Fungal Biology Reviews*. 30, 3, p. 112–133, 2016.
- SENTHILKUMAR, S., et al., 2011. Decolourisation potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing Amido black 10B. *Journal of Saudi Chemical Society*. 18, p. 845–853, 2011.
- SIMA, J., et al. Immobilization of *Irpex lacteus* to liquid-core alginate beads and their application to degradation of pollutant. *Folia Microbiologica*, 62, 4, p. 335–342, 2017.
- SINGH, A; WARD, O. *Biotechnology and Bioremediation, An Overview*. Em: SINGH, A.; WARD, O. P. (Eds.). *Biodegradation and Bioremediation* [s. 1]. First Edition. Berlin: Springer-Verlag. p. 1–17, 2004.
- SINGH, G. et al., Reoxidation of biogenic reduced uranium: A challenge toward bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 44, 4, p. 391–415, 2014.
- SINGH, L.; SINGH, V.P. *Textile dyes degradation: A microbial approach for biodegradation of pollutants*. Em: SINGH, A. (Ed.). *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters*. Environmental Science and Engineering [s.9]. First Edition. Cham: Springer, p. 187–204, 2015.
- SODANEATH, H. et al. Decolourisation of textile dyes in an air-lift bioreactor inoculated with *Bjerkandera adusta* OBR105. *Journal of Environmental Science and Health-Part A*, 52, 11, p. 1099–1111, 2017.
- SOLÍS, M., et al. Microbial decolouration of azo dyes: a review. *Process Biochemistry*, 47, 12, p. 1723–1748, 2012.
- STELLA, T., et al. Bioremediation of long-term PCB-contaminated soil by white-rot fungi. *Journal of Hazardous Materials*. 324, p. 701–710, 2017.
- SVOBODOVA, K., et al. Mutual interactions of *Pleurotus ostreatus* with bacteria of activated sludge in solid-bed bioreactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 6, 2016.

- SWAMY, J.; RAMSAY, J. Effects of glucose and  $\text{NH}_4^+$  concentrations on sequential dye decolouration by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 3–5, p. 278–284, 1999.
- TAHA, M., et al. Bioremediation of biosolids with *Phanerochaete chrysosporium* culture filtrates enhances the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Applied Soil Ecology*. 15, 2017.
- TAN, L., et al. Aerobic decolourisation, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1. *Bioresour. Technol.*, 203, p. 287–294, 2016.
- TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*, 221, p. 661–663, 1983.
- VATS, A.; MISHRA, S. Decolourisation of complex dyes and textile effluent by extracellular enzymes of *Cyathus bulleri* cultivated on agro-residues/domestic wastes and proposed pathway of degradation of Kiton blue A and reactive orange 16. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 12, p. 11650–11662, 2017.
- VASILIADOU, I.A., et al. Biological removal of pharmaceutical compounds using white-rot fungi with concomitant FAME production of the residual biomass. *Journal of Environmental Management*. 180, p. 228–237, 2016.
- VIKRANT, K., et al. Recent advancements in bioremediation of dye: current status and challenges. *Bioresource Technology*. 253: p. 355–367, 2018.
- WATKINSON, S. C. Physiology and Adaptation. Em: WATKINSON, S.C.; BODDY, L.; MONEY, N. P. (Eds.). *The Fungi* [s. 5]. Third Edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press. p. 141–187, 2016.
- WANG et al. An integrated cleaner beamhouse process for minimisation of nitrogen pollution in leather manufacture. *Journal of Cleaner Production*. 112, p. 2–8, 2016.

- WANG, N., et al. Decolourisation and degradation of Congo red by a newly isolated white rot fungus, *Ceriporia lacerata*, from decayed mulberry branches. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 117, p. 236–244, 2017.
- WANG, S. et. Al. An extracellular yellow laccase from white rot fungus *Trametes* sp. F1635 and its mediator systems for dye Decolourisation. *Biochimie*. 148, p. 46–54, 2018.
- WANG, J. et al. Biotransformation and detoxification of the neonicotinoid insecticides nitenpyram and dinotefuran by *Phanerochaete sordida* YK-624. *Environmental Pollution*. 252, p. 856–862, 2019
- WESENBERG, D. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22, 1–2, p. 161–187, 2003.
- WIRASNITA, R.; HADIBARATA, T. Potential of the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* F043 for degradation and transformation of fluoranthene. *Pedosphere*. 26, 1, p. 49–54, 2016.
- XIAO, P.; KONDO, R. Biodegradation and bioconversion of endrin by white rot fungi, *Phlebia acanthocystis* and *Phlebia brevispora*. *Mycoscience*, 2019.
- YANG, S., et al. Decolourisation of acid, disperse and reactive dyes by *Trametes versicolor* CBR43. *Journal of Environmental Science and Health-Part A*, 52, 9, p. 862–872, 2017.
- YESILADA, O., et al. Decolourisation of the textile dye Astrazon Red FBL by *Funalia trogii* pellets. *Bioresour. Technol.*, 81, 2, p. 155–157, 2002.
- ZAHMATKESH, M., et al. A novel approach for application of white rot fungi in wastewater treatment under non-sterile conditions: immobilization of fungi on sorghum. *Environmental Technology*, 39, 16, p. 2030–2040, 2017.

ZHANG, H., et al. Purification and characterisation of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Cerrena unicolour* BBP6 and its application in dye Decolourisation and denim bleaching. *Process Biochemistry*, 66, p. 222–229, 2018.

ZHANG, H. et al. Characterisation of a manganese peroxidase from white-rot fungus *Trametes* sp.48424 with strong ability of degrading different types of dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*. 320, p. 265–277, 2016.

## CHAPTER II

# Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa*

Paper published in the Journal Process, Safety and Environmental Protection.

Submitted 25 August 2016. Accepted 25 April 2017.

Volume 109 (2017), pages 437 – 451.

<https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.04.028>

### AUTHORS

Santiago Ortiz-Monsalve, Juliana Dornelles, Eduardo Poll, Maurício Ramirez-Castrillón, Patrícia Valente and Mariliz Gutterres.

### HIGHLIGHTS

A Brazilian native fungal strain of *Trametes villosa* SCS-10 was able to biodecolourise and biodegrade different leather dyes.

The biodecolourisation and biodegradation of dyes have been confirmed by UV-vis and FT-IR spectral analyses.

*In vitro* and *in situ* conditions of treatment have been studied and compared.

The amount of colour removal by biodegradation and biosorption has been quantified by the use of the enzyme inhibitor sodium azide (NaN<sub>3</sub>).

## ABSTRACT

In the present work, the potential of Brazilian native white-rot fungi strains, collected and screened to produce extracellular ligninolytic enzymes, was evaluated for the biodecolourisation and biodegradation of different azo tannery dyes. The strain SCS-10 showed high activity of ligninolytic enzymes and allowed the colour removal of dyes in solid media. This isolate was characterised morphologically and identified as *Trametes villosa*, based on a molecular analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region sequences. *T. villosa* SCS-10 showed high biodecolourisation efficiency for the dyes assessed, achieving  $95.71 \pm 1.29$ ,  $92.76 \pm 0.99$  and  $96.84 \pm 1.39\%$  for Acid Red 357, Acid Black 210 and Acid Blue 161, respectively, at  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 5.5 and 150 rpm, within 168 h of treatment. Remarkable peaks of laccase activity ( $1150\text{--}1550 \text{ U L}^{-1}$ ) were observed during specific periods in the biodecolourisation process. The complete inhibition of Lac activity by sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ,  $0.1 \text{ mM}$ ) led to biodecolourisation values of  $13.29 \pm 0.93$ ,  $12.30 \pm 0.46$  and  $20.05 \pm 2.08\%$  for AR<sub>357</sub>, AB<sub>210</sub> and AB<sub>161</sub>, respectively. These results confirmed the main role of laccase in colour removal, although biosorption also had a minor involvement in biodecolourisation. *In vitro* assays also showed efficiency in decolourisation of the leather dyes. A crude extract produced by *T. villosa* allowed  $85.45 \pm 3.43\%$  (AR<sub>357</sub>),  $76.96 \pm 1.39\%$  (AB<sub>210</sub>) and  $90.17 \pm 0.97\%$  (AB<sub>161</sub>) of biodecolourisation when enhanced by 1-hydroxybenzotriazol (HBT,  $1 \text{ mM}$ ). UV-vis and FT-IR spectral analyses confirmed the occurrence of biodegradation mediated by laccase as the mechanism responsible for colour removal. *T. villosa* SCS-10 was able to tolerate high initial concentrations of the dyes ( $200\text{--}1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) and a wide range of pH ( $4.0\text{--}8.0$ ) during biodecolourisation. The native isolate *T. villosa* SCS-10 is considered a suitable candidate for the treatment of dye-polluted wastewater from the leather industry due to the mechanisms of enzymatic biodegradation and biosorption.

## KEYWORDS

Biodecolourisation, Biodegradation, Biosorption, Leather dyes, White-rot fungi, *Trametes villosa*.

## CHAPTER III

# Biodecolourisation and biodetoxification of dye-containing wastewaters from leather dyeing by the native fungal strain *Trametes villosa*

Paper published in the Biochemical Engineering Journal.

Submitted 13 May 2018. Accepted 2 October 2018.

Volume 141 (2019), pages 19 – 28.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2018.10.002>

### AUTHORS

Santiago Ortiz-Monsalve, Patrícia Valente, Eduardo Poll, Victoria Jaramillo-García, João Antônio Pegas Henriques and Mariliz Gutterres.

### HIGHLIGHTS

A native strain of *T. villosa* SCC-10 was used in the treatment of tannery wastewaters.

Wastewaters were produced from real dyeing of leather performed in a pilot scale drum.

*T. villosa* allowed over 90% of colour removal and over 80% of COD and TOC reduction.

The fungal treatment reduced toxic effects over *R. subcapitata* and *V. fisheri*.

The treated wastewaters did not present cytotoxicity in the cell line V<sub>79</sub>.

## ABSTRACT

The native fungal strain *Trametes villosa* SCS-10 was investigated for its ability to treat wastewaters from real dyeing of leather produced in pilot-scale. Four types of wastewater using different compositions and dyes (Acid Red 357 and Acid Orange 142) were produced and used in the assays. Three culture conditions were studied. The efficiency of the treatment was assessed in terms of mycoremediation: biodecolourisation, reduction of chemical oxygen demand (COD), biological oxygen demand (BOD), total organic carbon (TOC) and biodegradation. The treatment resulted in between 50–70% of biodecolourisation and 40–60% of COD and TOC reduction of the raw wastewater without nutrient addition (N<sub>0</sub>). However, when wastewaters were supplemented with a high (N<sub>1</sub>) and a reduced (N<sub>0.5</sub>) nutrient supply, over 90% of biodecolourisation and over 80% of COD and TOC reduction were achieved. The treatment N<sub>0.5</sub> allowed the highest values of colour, TOC and COD reduction, which were related to the major peaks of laccase activity (1000–1300 U L<sup>-1</sup>). The ecotoxicity assays with *Raphidocelis subcapitata* and *Vibrio fischeri* demonstrated that the fungal treatment resulted in 50–70% of biodegradation. The MTT assay revealed that the treated wastewaters did not present cytotoxic effects to the cell line V<sub>79</sub>. These promising results show that *Trametes villosa* is suitable for the treatment of wastewater from leather dyeing. Further studies are required to improve the applicability of selected fungal strains in the treatment of wastewater from the tannery industry.

## KEYWORDS

Mycoremediation, Biodecolourisation, Biodegradation, White-rot fungi, *Trametes villosa*, Leather-dyeing wastewater.

## CAPÍTULO IV

# Remoção do corante para couro Azul Ácido 161 pela combinação de adsorção em biocarvão e degradação por cultivo de *Trametes villosa* SCS-10 em fase sólida

Artigo submetido no Jornal *Science of the Total Environment*.

Agosto 2019.

### AUTORES

Santiago Ortiz-Monsalve, Mariliz Gutterres, Patrícia Valente, Jersson Plácido, Sandra Bustamante-Lopez, Diane Kelly e Steve Kelly.

### HIGHLIGHTS

A eficiência de adsorção do corante Azul Ácido 161 (AA<sub>161</sub>) em biocarvão derivado de cavaco de madeira (BC) foi aumentada pela ativação termoquímica com KMnO<sub>4</sub>;

A eficiência de adsorção do corante AA<sub>161</sub> em biocarvão derivado de cavaco de madeira ativado com KMnO<sub>4</sub> (KBC) foi otimizada utilizando um planejamento de experimentos Box-Behnken (BBD) e Metodologia da Superfície de Resposta (RSM);

BC e KBC foram matrizes adequados para o cultivo em fase sólida de *T. villosa*;

O cultivo em fase sólida de *T. villosa* levou à biodegradação do corante adsorvido em KBC;

KBC regenerado pelo cultivo em fase sólida (RKBC) foi eficientemente reutilizado para outro ciclo de adsorção de AA<sub>161</sub>.

## RESUMO

A adsorção em biocarvão e micorremediação com fungos de podridão branca são estratégias promissoras no tratamento de corantes a partir de matrizes sólidas e líquidas. Este estudo apresenta um tratamento combinado usando adsorção em biocarvão derivado de cavacos de madeira e micodegradação sob cultivo de *Trametes villosa* SCS-10 em fase sólida, para remoção do corante para couro Azul Ácido 161 (AA<sub>161</sub>). Na primeira etapa, o biocarvão derivado de cavaco de madeira (BC) foi ativado termo-quimicamente com NaOH (NBC) e KMnO<sub>4</sub> (KBC). BC, NBC e KBC foram avaliados pela eficiência na adsorção de AA<sub>161</sub>. KBC mostrou a maior eficiência de adsorção (85,1 ± 1,9%) em 24 h de contato. A ativação termoquímica com KMnO<sub>4</sub> modificou as propriedades físicas e químicas de KBC, aumentando a área superficial (50,4 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), o tamanho de poro (1,9 nm) e a presença de grupos funcionais de superfície. O planejamento de experimentos Box-Behnken (BBD) e a Metodologia da Superfície de Resposta foram usadas para otimizar a eficiência de adsorção. Nas condições ótimas, pH 3,0, dose de adsorvente 2 g L<sup>-1</sup>, e concentração inicial de corante 100 mg L<sup>-1</sup>, a eficiência de adsorção de AA<sub>161</sub> foi maior (91,9 ± 1,0%). Na segunda etapa, o biocarvão (BC) e biocarvão ativado (KBC) suplementados com nutrientes (1% extrato de malte e 0,5% peptona) foram usados como matrizes para o cultivo de *T. villosa* em fase sólida. Depois de 15 dias, *T. villosa* apresentou crescimento de micélio (86,8 ± 0,8%) e atividade lacase (621,9 ± 62,3 U L<sup>-1</sup>). O cultivo em fase sólida foi usado na remoção do corante adsorvido no biocarvão, levando a 91,4 ± 1,3% de biodegradação. Finalmente, o KBC regenerado pelo cultivo em fase sólida (RKBC) foi eficientemente reutilizado para outro ciclo de adsorção de AA<sub>161</sub>, atingindo 79,5 ± 2,0% de adsorção de corante. Este estudo revelou o potencial do tratamento combinado usando adsorção em biocarvão derivado de cavaco de madeira e cultivo de *T. villosa* SCS-10 em fase sólida, para remoção de corantes para couro a partir de soluções aquosas e efluentes.

## PALAVRAS CHAVES

Corantes para couro, biocarvão, adsorção, *Trametes villosa*, lacase, biodegradação, cultivo em fase sólida.

## OUTROS TRABALHOS

### ARTIGOS

ARTIGO 4: *Comparison between enzymatic biodegradation and biosorption mechanisms in the sequential fungal treatment of leather dyes.*

Autores: Santiago Ortiz-Monsalve, Bianca Mella, Eduardo Poll, Allan Magalhães, Patrícia Valente e Mariliz Gutterres.

ARTIGO 5: *Combined removal of leather dyes using adsorption by purple moor grass-derived biochar and mycoremediation with *Trametes villosa*.*

Autores: Santiago Ortiz-Monsalve, Jersson Plácido, Patrícia Valente, Mariliz Gutterres, Diane Kelly e Steve Kelly.

### CAPÍTULO DE LIVRO

*Biodegradation of synthetic dyes in wastewaters.*  
Livro: *Bioremediation: A Sustainable Approach to Preserving Earth's Water.* Editora CRC Press/Taylor e Francis.

Autores: Santiago Ortiz-Monsalve e Mariliz Gutterres.

### CONGRESSOS

XXIII *International Congress of IULTCS*, 2015, Novo Hamburgo, Brasil. *Decolourisation of leather dyes by a native isolate of *Trametes sp.* SCS10.* Apresentação Oral.

Autores: Santiago Ortiz-Monsalve, Juliana Dornelles, Patrícia Valente e Mariliz Gutterres.

XXXIV *International Congress of IULTCS*, 2017, Chennai, Índia. *Treatment of leather dyes from aqueous solution and dye-containing effluents by native white-rot fungi strains*. Apresentação Oral.

Autores: Santiago Ortiz-Monsalve, Bianca Mella, Eduardo Poll, Allan Magalhães, Patrícia Valente e Mariliz Gutterres.

X Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada e IV Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2017, Porto Alegre, Brasil. Tratamento de efluentes de tingimento de curtume por uma cepa nativa de *Trametes villosa*. Pôster.

Autores: Santiago Ortiz-Monsalve, Bianca Mella, Eduardo Poll, Allan Magalhães, Patrícia Valente e Mariliz Gutterres.

XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química IC, 2015, Campinas, Brasil. Biodegradação do corante para couro *Acid blue 161* pelo isolado nativo *Trametes villosa*. Pôster.

Autores: Juliana Dornelles, Santiago Ortiz-Monsalve, Patricia Valente e Mariliz Gutterres.

## PRÊMIOS E DESTAQUES

Santiago Ortiz-Monsalve. Young Leather Scientist Grant, Lear Corporation/IULTCS, 2017. Treatment of tannery dye-containing effluents using native fungal strains.

Santiago Ortiz-Monsalve. Melhor trabalho em biotecnologia. X SBMA-IV ELAMA, 2017. Tratamento de efluentes de tingimento de curtume por uma cepa nativa de *Trametes villosa*.

Juliana Dornelles. Trabalho Destaque. XXVII Salão de Iniciação Científica, 2015. Biodescoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa* SCS-10.

Eduardo Poll. Melhor trabalho V Feira de Iniciação e Desenvolvimento Tecnológico, FINOVA, 2017. Tratamento de efluentes de tingimento por fungos nativos.

## PUBLICAÇÕES EM COAUTORIA

*Applications of Biosorption in Dyes Removal.*  
Livro: *Bioremediation: A Sustainable Approach to Preserving Earth's Water.* Editora CRC Press/Taylor e Francis.

Autores: Jaqueline Benvenuti, Santiago Ortiz-Monsalve, Bianca Mella e Mariliz Gutterres.

Artigo: *Fungal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye in aqueous solution, 2017. Journal Environmental Science and Pollution Research.*

Autores: Mayerly Johana Puchana-Rosero, Santiago Ortiz-Monsalve, Eder C. Lima, Bianca Mella, Dimitrius da Costa, Eduardo Poll e Mariliz Gutterres.

Artigo: *Degradation and detoxification of synthetic dyes and textile industry effluents by newly isolated Leptosphaerulina sp. from Colombia, 2016. Journal Bioresources and Bioprocessing.*

Autores: Jersson Plácido, Xiomara Chanagá, Santiago Ortiz-Monsalve, María Yepes e Amanda Mora.

## CONCLUSÕES

O tratamento de corante para couro e efluentes de tingimento de couro através de micorremediação pela cepa *Trametes villosa* SCS-10, se mostrou viável, permitindo a biodescoloração, biodetoxificação e redução da demanda química de oxigênio, demanda biológica de oxigênio e carbono orgânico total;

*Trametes villosa* foi eficiente na biodescoloração/biodegradação dos corantes para couro Laranja Ácido 142, Preto Ácido 210, Azul Ácido 161 e Vermelho Ácido 357, em condições de cultivo em fase líquida (solução aquosa e efluentes reais) e cultivo em fase sólida;

Durante o tratamento, cepa mostrou atividade notável da enzima ligninolítica lacase (até 1500 U L<sup>-1</sup>) e permitiu a remoção de mais de 90% da cor dos corantes avaliados;

Os ensaios envolvendo o uso de inibidores da lacase demonstraram como a inibição da enzima por Azida sódica NaN<sub>3</sub> (0,1 mM) resultou em apenas 10 a 20% de remoção de cor, sugerindo a biodegradação enzimática como o principal mecanismo envolvido na micorremediação;

A biodegradação enzimática foi confirmada através dos experimentos *in vitro*, nos quais um extrato enzimático bruto produzido por *T. villosa* também mostrou eficiência na biodescoloração dos corantes para couro, quando foi induzido pelo mediador redox 1-hidroxibenzotriazol (HBT, 1 mM). Os experimentos *in vitro* reduziram o tempo de operação;

As análises do espectro UV-Vis permitiram construir os perfis de biodescoloração *in vivo* relacionadas com a atividade lacase. As análises espectrofotométricas FT-IR foram usadas para avaliar a biodegradação enzimática como mecanismo responsável pela remoção de cor. A biossorção teve uma participação menor na biodescoloração;

*T. villosa* mostrou resistência e eficiência no tratamento dos corantes para couro em uma ampla faixa de concentração inicial de corante (100–1000 mg L<sup>-1</sup>) e pH (3,0-8,0). As condições ácidas são comuns em efluentes industriais, sugerindo o potencial da cepa para o tratamento de efluentes reais de tingimento;

A micorremediação foi eficiente no tratamento de efluentes reais de tingimento, permitindo mais de 90% de biodescoloração e mais de 80% de diminuição da demanda química de oxigênio e carbono orgânico total;

O micotratamento também permitiu a biodetoxificação dos efluentes, mostrando de 50 a 70% de diminuição nos ensaios de ecotoxicidade usando os organismos *R. subcapitata* e *V. fisheri*. O tratamento também permitiu a redução nos efeitos citotóxicos dos efluentes sobre a linha celular V79;

A combinação dos tratamentos de micorremediação e adsorção usando materiais derivados de biocarvão, foi um método eficiente para a biodegradação do corante Azul Ácido 161;

O corante Azul Ácido 161 foi removido de solução aquosa por adsorção em biocarvão. O corante adsorvido no material foi degradado por *T. villosa* em condições de fermentação em estado sólido. O material adsorvente foi reusado em um novo ciclo de adsorção, mantendo a capacidade de remoção de corante;

*T. villosa* SCS-10 é considerado um candidato adequado para o tratamento de corantes para couro e efluentes de tingimento contendo corantes. São necessários mais estudos para melhorar a aplicabilidade das cepas selecionadas no tratamento de efluentes de tingimento da indústria de couro.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Algumas sugestões para trabalhos futuros são apresentadas:

- i. Uso de resíduos agroindustriais como fontes alternativas de carbono e nitrogênio;
- ii. Extração, caracterização e purificação das enzimas lacases (Lac) e manganês peroxidase (MnP), produzidas por *T. villosa*;
- iii. Estudos da imobilização enzimática e/ou celular para aumentar a eficiência de biodescoloração/biodegradação;
- iv. Estudos das possíveis rotas metabólicas de degradação dos corantes e caracterização dos metabólitos produzidos;
- v. Escalonamento do processo para escala piloto e industrial;
- vi. Análise dos custos do processo.