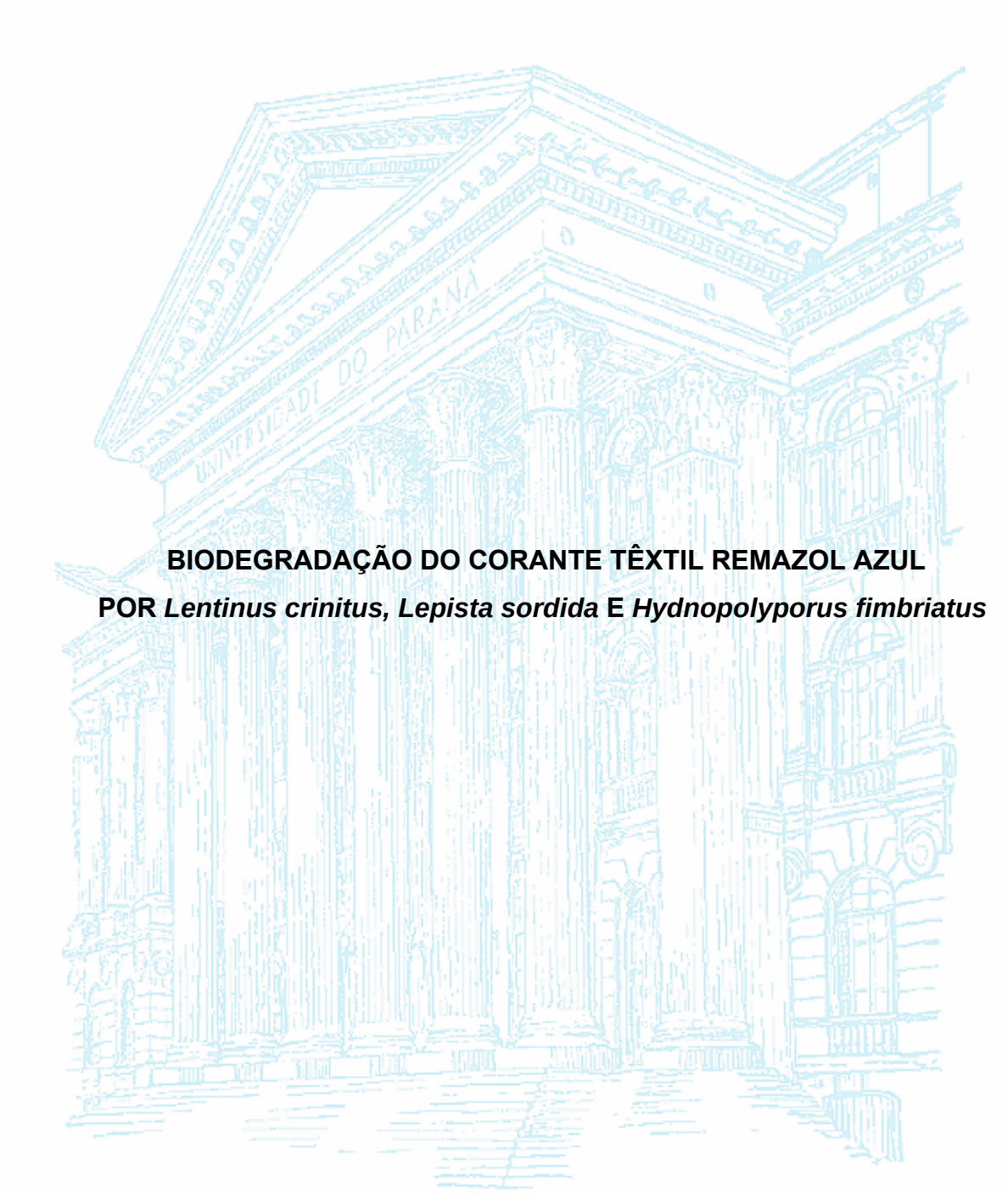
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA HEYSE NIEBISCH

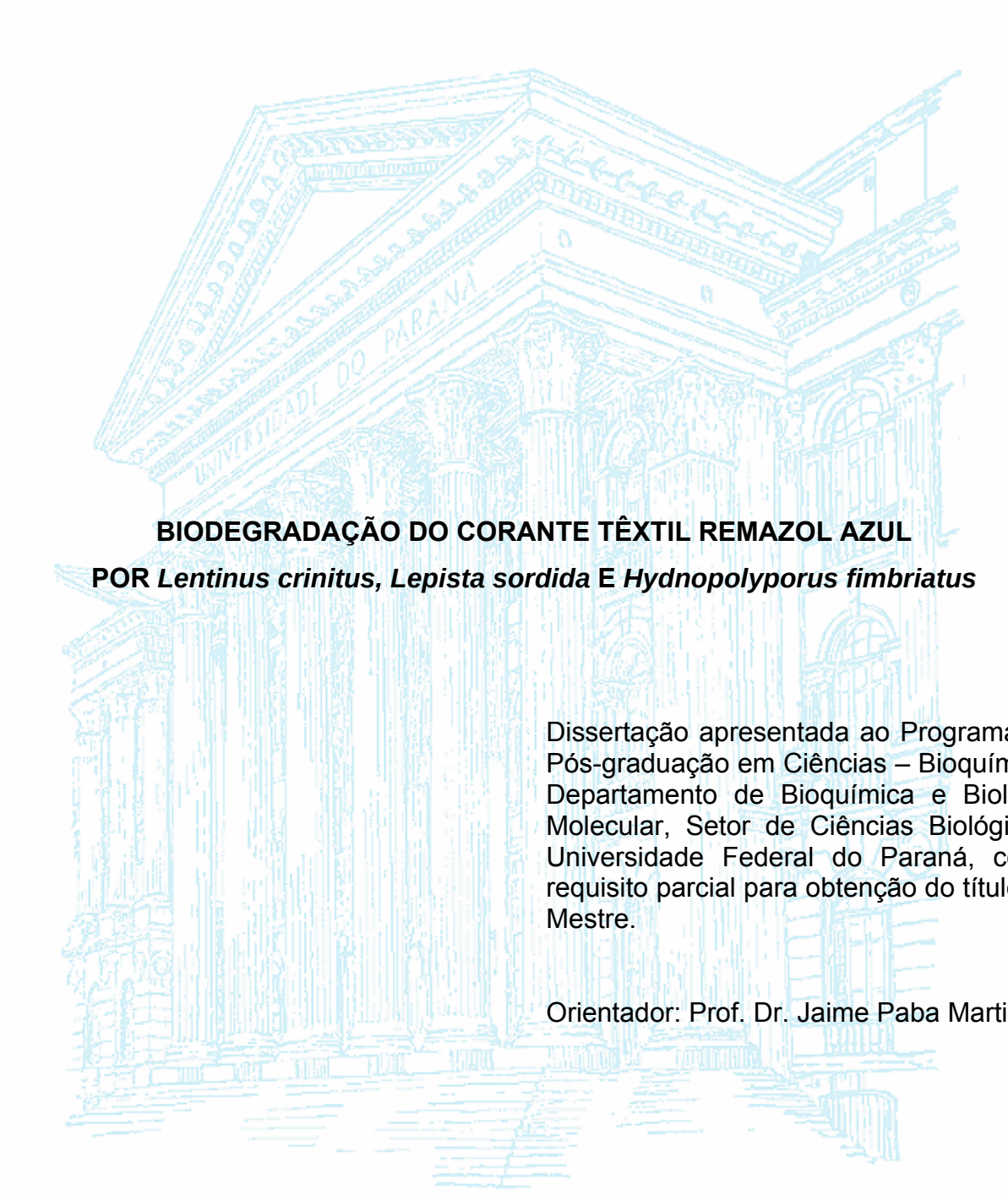


BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL REMAZOL AZUL POR *Lentinus crinitus, Lepista sordida* E *Hydnopolyporus fimbriatus*

CURITIBA

2009

CAROLINA HEYSE NIEBISCH



BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL REMAZOL AZUL POR *Lentinus crinitus*, *Lepista sordida* E *Hydnopolyporus fimbriatus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Paba Martinez

CURITIBA

2009

“Só enquanto eu respirar vou me lembrar de você....”
(Fernando Anitelli - O Teatro Mágico)

À Jacqueline Heyse Niebisch
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Jaime Paba pela orientação, paciência e ensinamentos;

Aos Prof. David Mitchell, Gláucia Martinez, Guilherme Sassaki (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular), Vanessa Kava (Depto. de Genética) e Ruth Schadeck (Depto. de Biologia Celular) pela disponibilização de laboratórios, equipamentos e materiais imprescindíveis à realização deste trabalho;

Ao Valter e a Dona Rose pelas conversas, ensinamentos e ajuda sempre que necessário;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade;

Ao Alexandre Malinowski, Elisandro Bruscato e Marco Aurélio pela ajuda na realização deste trabalho;

Em especial à Prof. Mariza Boscacci Marques pelo incentivo, amizade e confiança. “Segunda mãe” a quem devo muito por chegar até aqui;

Aos amigos Alison, Amanda, Anelis, Arquimedes, Danilo, Ildemara, Lauro, Leandro, Michele, Milena, Rubiana e Tuca pela amizade, conversas e atividades “extra-laboratório”, sem os quais não teria chegado até aqui;

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho;

À minha família;

A Deus;

Ao CNPq e ao IFS (International Foundation for Science) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O acúmulo de dejetos de origem industrial tem aumentado de forma acelerada, como resultado do crescimento populacional e das demandas de consumo intrínsecas a esta, sendo os corantes têxteis alguns dos resíduos mais abundantes responsáveis pela contaminação de águas. Em decorrência da baixa eficiência dos métodos atualmente aplicados para uma correta eliminação deste resíduo, a biodegradação tornou-se uma alternativa eco-eficiente de combate a esta fonte de poluição. Este projeto teve por objetivo avaliar o potencial biodegradador dos fungos *Lentinus crinitus, Lepista sordida e Hydnopolyporus fimbriatus* sobre o corante têxtil Remazol Azul através de análise espectrofotométrica, dosagem de proteínas, atividade enzimática, eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e zimograma. *L. crinitus* e *L. sordida* mostraram grande atividade descorante, tanto em meio sólido quanto líquido (>90%), mesmo em altas concentrações de Remazol Azul (2g/L). Este, exerceu efeito inibitório no crescimento de *L. crinitus* (a partir de 0,1g/L), embora sem redução da atividade descorante. O corante pode ser utilizado como fonte de nitrogênio por *L. sordida* para crescimento. Já em *L. crinitus* não foram observadas diferenças significativas na atividade descorante, e os resultados para crescimento não foram conclusivos. A descoloração do Remazol Azul, realizada pelo sobrenadante/eluído de culturas líquidas e sólidas de *L. crinitus* sugerem que a enzima responsável pela atividade descorante é secretada. *L. sordida* apresentou atividade descorante em todos os meios testados, porém esta atividade, em meio sólido, não é passível de eluição, indicando que esta atividade está atrelada ao micélio. Já *H. fimbriatus* apresentou atividade descorante apenas em meio sólido não passível de eluição. As frações solúveis de *L. crinitus* e de *L. sordida* apresentam-se relativamente estáveis a variações de temperatura e pHs, já quanto a força iônica apresentam maiores graus descoloração em concentrações de até 0,2M de sal. A atividade da proteína responsável pela atividade descorante de *L. crinitus* apresentou uma massa molecular de 41kDa e a única enzima lignolítica detectada nas frações descorantes é uma lacase, portanto é possível que esta seja responsável por tal atividade.

ABSTRACT

The accumulation of industrial waste is rapidly increasing as a result of the consume demands inherent to the growth of human population. Industrial textile dye effluents are among the more abundant wastes when referring to contamination of water reservoirs. The low efficiency of the current methods applied to minimize the content of dyes in industrial wastewaters led to the quest for more effective and ecologically correct approaches. In this direction, biodegradation, the biological consumption of pollutants, has become a real alternative. In this project there was assessed the biodegradation potential of three fungal species: *Lentinus crinitus, Lepista sordida* and *Hydnopolyporus fimbriatus* against Remazol Blue reactive textile dye. *L. crinitus* and *L. sordida* displayed a considerable destaining and degradation activity (>90%), both in solid and liquid media even at high dye concentrations (2g/L). Reactive Blue showed an inhibitory effect of the fungal growth in *L. crinitus* but without reducing decolourization activity. Also, it can be used as a source of nitrogen by *L. sordida* strain. The destaining activity was demonstrated in soluble fractions derived from liquid and solid cultures of *L. crinitus* suggesting that the enzyme(s) involved in the process is secreted. In *L. sordida*, decolorization activity was detected in soluble and mycelial extracts. Though *L. crinitus* and *L. sordida* strains were able to destain the dye in liquid and solid media, *H. fimbriatus* only displayed this trait in solid media, and this activity remains attached to the mycelium. Destaining activity in *L. crinitus* and *L. sordida* is relatively stable to changes in pH and temperature, but salt concentrations higher than 0.2M diminishes dye biodegradation. In gel destaining assays of *L. crinitus* soluble extracts revealed a 41 kDa polypeptide and also a phenol oxidase activity. The inhibitory effect of sodium azide on destaining and phenol oxidase activities suggest that a laccase enzyme may be involved in the biodegradation process.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ALGUNS EXEMPLOS DE CORANTES REATIVOS.....18
FIGURA 2 – FOTO DO FUNGO *Phanerochaete chrysosporium* 27
FIGURA 3 – SIMILARIDADES ESTRUTURAIS ENTRE UM SEGMENTO DA MOLÉCULA DE LIGNINA E ALGUNS SUBSTRATOS POLUENTES. 29
FIGURA 4 – CICLO CATALÍTICO DA ENZIMA MANGANÊS PEROXIDASE.....31
FIGURA 5 – CICLO CATALÍTICO DA LIGNINA PEROXIDASE 33
FIGURA 6 – CICLO CATALÍTICO DA ENZIMA LACASE 35
FIGURA 7 – FOTO DO FUNGO *Hydnopolyporus fimbriatus* 39
FIGURA 8 – FOTO DO FUNGO *Lepista sordida* 40
FIGURA 9 – FOTO DO FUNGO *Lentinus crinitus*.....41
FIGURA 10 – FLUXOGRAMA GERAL DO PROJETO 44
FIGURA 11 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE UMA SOLUÇÃO AQUOSA DO CORANTE REMAZOL AZUL A (0,1g/L), ENTRE 200 E 800 nm. 52
FIGURA 12 – TRIAGEM INICIAL DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL DOS FUNGOS 53
FIGURA 13 – CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL.53
FIGURA 14 – CRESCIMENTO DO MICÉLIO AO LONGO DO TEMPO. 54
FIGURA 15 – EFEITO DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTE DE CORANTE RAMAZOL AZUL NA ATIVIDADE DESCORANTE. 55
FIGURA 16 – EFEITO DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE CORANTE REMAZOL AZUL NO CRESCIMENTO FÚNGICO. 56
FIGURA 17 – UTILIZAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL COMO FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA CRESCIMENTO FÚNGICO. 57
FIGURA 18 – PERFIL DE DESCOLORAÇÃO OBTIDO A PARTIR DA UTILIZAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL COMO FONTE DE CARBONO, NITROGÊNIO E CARBONO/NITROGÊNIO. 58
FIGURA 19 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL OBTIDA EM 280 E 600NM A PARTIR DO SOBRENADANTE E MICÉLIO DE MEIOS DE CULTIVO DE *L. crinitus* 59

FIGURA 20 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL OBTIDA EM 280 E 600NM A PARTIR DO SOBRENADANTE E MICÉLIO DE MEIOS DE CULTIVO DE *L. sordida*. 59
FIGURA 21 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL OBTIDA A PARTIR DO SOBRENADANTE E/OU ELUÍDO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO DE *L. crinitus* 61
FIGURA 22 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL OBTIDA A PARTIR DO SOBRENADANTE E/OU ELUÍDO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO DE *L. sordida.* 62
FIGURA 23 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL REALIZADA POR *L. sordida* EM MEIO SÓLIDO. 62
FIGURA 24 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL OBTIDA A PARTIR DO SOBRENADANTE E/OU ELUÍDO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO DE *H. fimbriatus* 63
FIGURA 25 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL REALIZADA POR *H. fimbriatus* EM MEIO SÓLIDO. 63
FIGURA 26 – TEMPERATURA ÓTIMA DE DESCOLORAÇÃO DO SUBSTRATO .. 65
FIGURA 27 – CONCENTRAÇÃO DE SAL ÓTIMA DE DESCOLORAÇÃO DO SUBSTRATO. 66
FIGURA 28 – PH ÓTIMO DE DESCOLORAÇÃO DO SUBSTRATO 67
FIGURA 29 – CURVA DE OXIDAÇÃO TOTAL DO ABTS 68
FIGURA 30 – CURVA DE ATIVIDADE DA LACASE, NA AUSÊNCIA (A) E NA PRESENÇA (B) DE CATALASE. 69
FIGURA 31 – CURVA DE ATIVIDADE DE LACASE, NA AUSÊNCIA (A) E NA PRESENÇA (B) DE AZIDA DE SÓDIO. 70
FIGURA 32 – ATIVIDADE DESCORANTE DE EXTRATOS SECRETADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE AZIDA DE SÓDIO. 70
FIGURA 32 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE E ATIVIDADE "IN GEL" DE AMOSTRAS DO SOBRENADANTE DE *L. crinitus*. 72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ALGUMAS CLASSES DE CORANTES DE ACORDO COM O COLOUR INDEX 17
TABELA 2 – PRINCIPAIS POLUENTES DO EFLUENTE TÊXTIL 22
TABELA 3 – TÉCNICAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS 23
TABELA 4 – CLASSIFICAÇÃO DOS FUNGOS DA PODRIDÃO DA MADEIRA 26
TABELA 5 – COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE MANGANÊS PEROXIDASE, LIGNINA PEROXIDASE E LACASE DOS FUNGOS DE PODRIDÃO BRANCA 30
TABELA 6 - ATIVIDADE DESCORANTE EM EXTRATOS SOLÚVEIS DAS CULTURAS DE FUNGOS 64

LISTA DE ABREVIATURAS

μmol – micromol
2Cl-1,4DMB – 2-cloro-1,4-dimetoxibenzeno
3-HAA – ácido 3-hidroxiantranílico
ABTS – 2,2'-azinobis (3- etilbezotiazolina-6-sulfonato)
BDA – meio agar batata dextrosada
C.I. – Colour Index
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente,
COR – corante
DDT – dicloro-difenil-tricloroetano
DQO – demanda química de oxigênio
E.C. – número de classificação das enzimas, segundo a classificação da União Internacional de Bioquímica Biologia Molecular
HBT – 1-hidrozibenzotriazol
kDa - kilodaltons
Lac – lacase
LC_{50} – dose letal capaz de causar a morte de 50% da população de cobaias usadas
LiP – lignina peroxidase
LMEs – enzimas modificadoras de lignina
MML – meio mínimo líquido
MMS – meio mínimo sólido
MnP – manganês peroxidase
MS – meio de sais
SDS – dodecil sulfato de sódio
TEMED – N, N, N',N', tetrametiletilenodiamina
UD – unidade descorante: μmol de substrato descorado por mim.
UE – unidade de enzima: quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto
UV-vis – espectro de absorção de luz ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 REVISÃO DA LITERATURA 15

2.1 INDÚSTRIAS DE CORANTES E TÊXTEIS 15

2.2 CORANTES 16
2.2.1 Toxicidade 19

2.3 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES 21

2.4 BIODEGRADAÇÃO 25
2.4.1 Fungos lignolíticos 25

2.5 ENZIMAS MODIFICADORAS DE LIGNINA - LMES 28
2.5.1 Peroxidases 30
2.5.1.1 Manganês Peroxidase - MnP 31
2.5.1.2 Lignina Peroxidase - LiP 32
2.5.1.3 Peroxidases Versáteis - VPs 33
2.5.2 Fenoloxidases 34
2.5.2.1 Lacase - Lac 34
2.5.3 Outras enzimas envolvidas no processo 35

2.6 DESCRIÇÃO E ANTECEDENTES DO CORANTE E MICRORGANISMOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO 37
2.6.1 Corante Remazol Azul (C.I. Reactive Blue 220) 37
2.6.2 Microrganismos 38
2.6.2.1 *Hydnopolyporus fimbriatus* 38
2.6.2.2 *Lepista sordida* 39
2.6.2.3 *Lentinus crinitus* 41

3 OBJETIVOS 43

3.1 OBJETIVOS GERAIS 43

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 43

4 MATERIAL E MÉTODOS 44

4.1 ESTRATÉGIA GERAL 44

4.2 ESPÉCIMES E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS 45

4.3 CORANTE TÊXTIL REMAZOL AZUL 45

4.4 TESTES INICIAIS 45
4.4.1 Espectrofotometria 45
4.4.2 Triagem inicial do potencial de descoloração dos basidiomicetos 46

4.5 CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO AO LONGO DO TEMPO 46

4.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE NO CRESCIMENTO DOS FUNGOS E NO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO 47

4.7 USO DO CORANTE COMO FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO 47

4.8 ANÁLISE DA FRAÇÃO ATIVA RESPONSÁVEL PELA DEGRADAÇÃO – SOBRENADANTE/ELUÍDO OU MICÉLIO 47
4.9 ATIVIDADE DESCORANTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA 48
4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESCORANTE EM CONDIÇÕES VARIÁVEIS 48
4.10.1 Temperatura 48
4.10.2 Concentração de sal 49
4.10.3 pH 49
4.11 ATIVIDADE ENZIMÁTICA 49
4.11.1 Oxidação total do ABTS 49
4.11.2 Lacase 50
4.11.3 Peroxidases totais 50
4.12 PERFIL DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E ZIMOGRAMA 50
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA 51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
6 CONCLUSÕES 74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76
ANEXOS 89

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos têm aumentado de forma alarmante, como resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente. Neste contexto, o setor têxtil apresenta especial destaque. Considerando tanto o volume quanto a composição, o efluente gerado pela indústria têxtil é classificado como o mais poluidor entre todos os setores industriais.

Estima-se que, ao redor de 15% da produção mundial de corantes, são perdidas para os corpos de água durante a síntese, processamento ou aplicação destes. Quando não tratados adequadamente, antes de seu despejo em águas naturais, os efluentes provenientes da indústria de corantes ou processos envolvendo tintura têxtil podem modificar o ecossistema, causando sérios problemas de contaminação ambiental e toxicidade tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana, podendo permanecer cerca de 50 anos em ambientes aquáticos.

Vários métodos físicos e químicos, incluindo adsorção, coagulação, precipitação, filtração e oxidação são usados para o tratamento de efluentes contaminados. Estes métodos, no entanto, podem gerar uma quantidade significativa de lodos que podem facilmente causar poluição devido ao excessivo uso de produtos químicos. Além disso, este tipo de tratamento possui custos elevados e nem sempre é eficiente no tratamento de efluentes que apresentam corantes em sua composição. Nesse contexto, a biodegradação (degradação biológica de poluentes) mostra-se uma alternativa promissora, devido ao seu apelo ecológico, baixo custo e re-introdução dos produtos não tóxicos resultantes da degradação substratos poluentes ao ciclo de nutrientes na natureza.

Plantas, algas, bactérias, leveduras e fungos são alguns dos organismos já descritos que apresentam potencial para realizar biodegradação. Dentre eles, os fungos lignolíticos têm despertado grande interesse devido a um complexo sistema de enzimas modificadoras de lignina (LMEs). Estas são capazes de atuar sobre substratos que apresentam similaridade estrutural com a lignina, dentre eles, os corantes têxteis, os principais membros deste sistema são a lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Além das LMEs, muitos outros componentes participam do sistema de degradação de lignina, dentre eles, enzimas auxiliares

produtoras de H_2O_2, substrato das peroxidases e mediadores redox difusíveis. Porém, a aplicação da biodegradação em escala industrial é incipiente, razão pela qual é necessário identificar e testar novas linhagens com potencial aplicação; aprofundar nos mecanismos envolvidos no processo, assim como a caracterização da dinâmica do mesmo dentro do laboratório e em escala industrial.

Este projeto teve por objetivo principal avaliar a dinâmica do processo de biodegradação do corante têxtil Remazol Azul Brilhante em culturas dos fungos *Hydnopolyporus fimbriatus, Lentinus crinitus e Lepista sordida*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INDÚSTRIAS DE CORANTES E TÊXTEIS

Mais de 700 mil toneladas de 10 mil tipos de corantes e pigmentos são produzidas anualmente no mundo. Tal diversidade de corantes se justifica pelo sucesso comercial de produtos têxteis que passam por um processo de tintura. Para atender um mercado cada vez mais exigente, a indústria tem investido no desenvolvimento de corantes econômicos, de múltiplas tonalidades e com propriedades específicas para obter boa fixação da coloração dos tecidos, oferecendo grande resistência aos agentes que causam o desbotamento (ZANONI e CARNEIRO, 2001).

A produção industrial de corantes sintéticos no Brasil foi introduzida logo após a Primeira Guerra Mundial e supre 60% de sua demanda doméstica. Dados da Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM, 2008) indicam o Brasil como responsável por 2,6% da demanda mundial de corantes, sendo que sua utilização concentra-se principalmente nos corantes reativos, que hoje correspondem a 57% do mercado, seguidos pelos corantes dispersos, com 35%. Cerca de três quartos das indústrias têxteis estão localizadas na região Sul (Santa Catarina), Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e Nordeste (Pernambuco, Bahia e Ceará) (GUARATINI e ZANONI, 1999). Entre 2002 e 2007 a importação de corantes no Brasil sofreu um acréscimo de aproximadamente 80%, já a exportação praticamente dobrou, porém ainda é consideravelmente menor que a importação (ABIQUIM, 2008).

Durante o processo de tingimento de fibras, três etapas são consideradas importantes: a montagem, a fixação e tratamento final. A montagem é a fase na qual o tecido entra em contato com a solução de corante (através de banho de tingimento) ou é impregnado com corantes através de forças mecânicas (processo de impressão/estamparia). A fixação tem como objetivo a reação entre o corante e o tecido e, finalmente, o tratamento final envolve uma etapa de lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante original ou não hidrolisado/não fixado à fibra têxtil nas etapas precedentes, sendo a quantidade de corante perdida dependente da classe a qual pertence o corante (ALCÂNTARA e DALTIN, 1996; GUARATINI e ZANONI, 1999; MCMULLAN *et al.,* 2001).

2.2 CORANTES

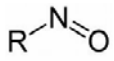
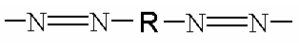
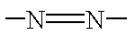
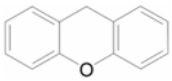
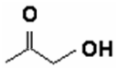
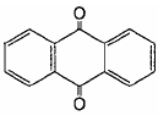
Há indicações de seu uso pelo homem desde os primórdios da civilização. Até meados do século XIX só eram utilizados pigmentos naturais, provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais. A grande revolução na história destes compostos ocorreu em 1856, quando o químico inglês William H. Perkin descobriu o primeiro corante sintético, ao qual chamou de Púrpura de anilina. No fim do século XIX, os fabricantes de corantes sintéticos se estabeleceram na Alemanha, França, Inglaterra e Suíça. (ZANONI e CARNEIRO, 2001; ABIQUIM, 2008).

Corantes têxteis são compostos orgânicos, cuja finalidade é conferir a uma fibra determinada cor, sob condições preestabelecidas, reagindo ou não com o material durante o processo de tingimento. São solúveis, não abrasivos, mostram alta capacidade de absorção luminosa. Porém, a mesma solubilidade que confere aos corantes a capacidade de interagir com a superfície do material, pode causar toxicidade (HERBEST *appud* SARON e FELISBERTI, 2006).

A molécula de corante pode ser dividida em duas partes principais: o grupo cromóforo, que confere cor a substância, e a estrutura responsável pela fixação do corante à fibra chamada auxocromo (KNUTZ *et al.,* 2002). Tendo em vista que muitos corantes são compostos complexos, muitas vezes é impossível traduzi-los por uma fórmula química, pois alguns não possuem estrutura química definida. Por esse motivo, a nomenclatura química usual raramente é usada, prefere-se utilizar os nomes comerciais. Para identificar os mesmos corantes, comercializados com diferentes denominações, utiliza-se o Colour Index, C.I. (Tabela 1), catálogo da “American Association of Textile Chemists and Colourists” e da “British Society of Dyers and Colourist” (WESENBERG *et al.,* 2003; ABIQUIM, 2008).

O C.I. classifica sistematicamente os corantes de acordo com sua estrutura química (definida pelos grupos cromóforos), quando conhecida. Por esta classificação, os corantes e pigmentos podem ser agrupados em 26 tipos, e registra atualmente mais de oito mil corantes orgânicos sintéticos associados à indústria têxtil (WESENBERG *et al.,* 2003; ABIQUIM, 2008).

TABELA 1 – ALGUMAS CLASSES DE CORANTES DE ACORDO COM O COLOUR INDEX

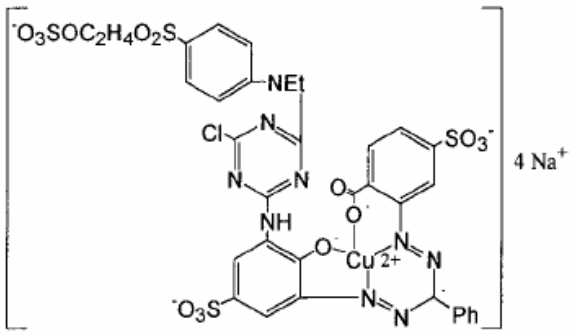
Código	Classe Química	Estrutura Química
10,000	Nitroso	
20,000	Diazo	
37,000	Azóico	
45,000	Xanteno	
57,000	Hidroxicetona	
58,000	Antraquinona	

FONTE: adaptado de WESENBERG *et al* (2003)

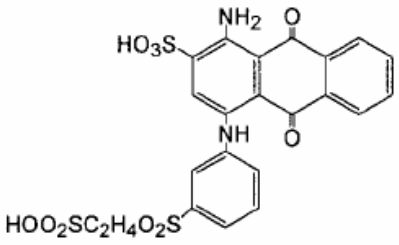
Já os principais grupos de corantes classificados pelo modo de aplicação (utilização por substrato), segundo Guaratini e Zanoni (1999), são:

- Corantes diretos – solúveis em água e capazes de tingir fibras de celulose através de interações de Van der Waals. Esta classe é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo ou pré-transformada em complexos metálicos;
- Corantes azóicos – compostos insolúveis em água, que apresentam ligações azo (ligações -N=N- ligadas a sistemas aromáticos). Durante o processo de tingimento, a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, chamado de agente de acoplamento.
- Corantes ácidos – Ligam-se à fibra através de troca iônica envolvendo um par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilatos das fibras protéicas, na forma não protonada. Caracterizam-se por estruturas químicas baseadas em grupos azo, antraquinona, triarilmetano, entre outros.
- Corantes a cuba – Praticamente insolúveis em água, entretanto, durante o processo de tintura são reduzidos, tornando-se solúveis e posteriormente oxidados, regenerando a forma original do corante sobre a fibra;
- Corantes de enxofre – Compostos macromoleculares com pontes dissulfeto, altamente insolúveis;

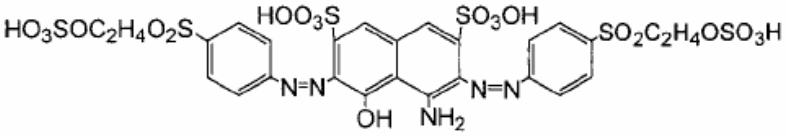
- Corantes dispersos – Insolúveis em água, aplicados em fibras de celulose, através de suspensão. Usualmente o processo de tintura ocorre na presença de agentes dispersantes que normalmente estabilizam a suspensão do corante, facilitando o contato entre corante e a fibra hidrofóbica;
- Corantes pré-metalizados – Caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao grupo azo, permitindo a formação de complexo com íons metálicos;
- Corantes reativos – Apresentam um grupo eletrofílico capaz de formar ligações covalentes com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das fibras de poliamidas. Os principais apresentam grupos azo (N=N) e antraquinona como cromóforos, além de grupos clorotriazina e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos. Alguns exemplos são mostrados na Figura 1. Esta classe de corantes é utilizada no tingimento de fibras naturais de algodão e lã, fibras artificiais de viscose, couro e papel. Apresentam como características alta solubilidade em água e o estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade na cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corantes.



Reactive Blue 221



Reactive Blue 19



Reactive Black 5

FIGURA 1 – ALGUNS EXEMPLOS DE CORANTES REATIVOS
FONTE: adaptado de ABADULA *et al*., 2000

2.2.1 Toxicidade

Devido à sua própria natureza, a presença de quantidades muito pequenas de corantes já torna o efluente colorido (NIGAM *et al.,* 2000). Ao aumentar a turbidez da água e impedir a penetração de luz solar, estes rejeitos diminuem a atividade fotossintética de alguns organismos e provocam distúrbios na solubilidade dos gases, causando danos nas guelras e brânquias dos organismos aquáticos.

O perfil de toxicidade avaliado em microrganismos biosensores é extremamente variado, quando analisados diversos níveis de toxicidade e interações microrganismo-corante, devido à diversidade de corantes utilizados pela indústria têxtil. Mais de 3000 corantes foram analisados quanto à toxicidade sobre peixes e mamíferos e foi constatado que menos de 2% deles apresentaram uma toxicidade considerável, sendo os corantes básicos, em ambos os casos, os que apresentaram maior toxicidade (ZEE, 2002).

Lanzer *et al.* (2007) avaliaram a sensibilidade de resposta do desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria tenagophila* (caramujo) e *Daphnia magna* (microcrustáceo) ao corante “Remazol Brilliant Blue R”. O corante não apresentou efeito na taxa de eclosão dos ovos e mortalidade de embriões, porém em *D. magna*, foi observada uma redução no número de neonatos. Já Bae e Freeman (2007) analisaram a mortalidade de *D. magna*, quando em contato com quatro corantes diretos, mas apenas “Direct Blue 218” se apresentou muito tóxico para este microrganismo. Segundo Vineis e Pirastu (1997), estudos em animais (ratos e coelhos) têm demonstrado um aumento de carcinomas hepáticos após exposição à benzidina e corantes que apresentam benzidinas em sua composição.

Os riscos à saúde humana variam de acordo com o tempo e modo de exposição. Alguns compostos não incorporados totalmente ao tecido podem causar dermatites, e problemas respiratórios como asma e rinite alérgica (NILSSON *et al.*, 1993). Quando ingeridos, apresentam maiores riscos relacionados às etapas de biotransformação (rotas do metabolismo destes corantes nos organismos), pois quando catalisados por enzimas específicas, podem gerar substâncias com propriedades carcinogênicas e mutagênicas (HUNGER, 1994). O corante “Direct Red 2” foi considerado por Rajaguru *et al.* (1999) com potente clastogenicidade (quebra cromossômica) para medula óssea de ratos, indicando que a exposição, e em maior grau, a ingestão deste corante ou seus metabólitos, podem representar

riscos. Foi sugerido que trabalhadores de indústrias têxteis e de corantes possam se contaminar através de contato destas substâncias com a pele e subseqüente ingestão.

Os principais corantes que apresentam potencial carcinogênico são os pertencentes à classe de corantes azóicos (SPADARO *et al.*, 1992). O primeiro passo na redução catabólica de corantes azóicos é acompanhado por uma diminuição na absorção de luz visível e, em seguida, a descoloração do corante (redução da ligação azo) que produz aminas aromáticas, algumas das quais são conhecidas como cancerígenas. Estas têm sido encontradas na urina de trabalhadores e de animais de laboratório após administração de corantes azóicos (CERNIGLIA, *et al.*, 1986 *appud* SWEENEY *et al.*, 1994). Por exemplo, a redução do corante “Reactive Blue 6” gera benzidinas tóxicas (HUNGER, 1994). Evidências epidemiológicas indicam relação entre aminas aromáticas e risco de desenvolvimento de câncer. O risco de câncer em humanos pode resultar da exposição a aminas aromáticas decorrentes de fontes ocupacionais. Estudos têm relacionado trabalhadores da indústria têxtil expostos a corantes e o aumento no risco de câncer de bexiga (DOLIN, 1992; NOTANI *et al.*, 1993; MASTRANGELO *et al.*, 2002), pancreático (ALGUACIL *et al.*, 2000) e de sistema digestivo (MASTRANGELO *et al*., 2002). Exposições de trabalhadores a aminas aromáticas aumentam em 25% a incidência de câncer de bexiga (VINEIS e PIRASTU, 1997). Weber e Wolfe (1987) e Chung *et al.* (1978) demonstraram que corantes azo e nitro são reduzidos no ambiente intestinal, resultando em ambos os casos na formação de aminas tóxicas. Os corantes pertencentes à classe das antraquinonas são mais resistentes à degradação devido à fusão de anéis aromáticos encontrada em sua estrutura. Dentre os problemas decorrentes da não remoção de corantes nos tratamentos biológicos atualmente utilizados, encontra-se a capacidade de alguns corantes dispersos se bioacumularem (BAUGHMAN e PERENICH, 1988). O bioacúmulo é definido como o depósito crescente de poluentes em nível tecidual através de etapas metabolismo-dependentes (AKSU, 2005).

Efluentes da indústria têxtil, mesmo após tratamentos que resultem em descoloração, não podem ser considerados não tóxicos, ou seja, redução de coloração não implica necessariamente em redução de toxicidade. Gottlieb *et al.* (2003) demonstraram uma redução de cor do corante Reactive Black 5 na região de luz visível; todavia, revelaram um aumento no espectro de absorção na região UV,

com concomitante aumento da toxicidade para a bactéria luminescente *Vibrio fischeri,* organismo muito utilizado para a realização de testes de toxicidade.

2.3 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES

Em decorrência dos vários problemas ambientais e danos à saúde humana causados por corantes, o governo tem adotado várias medidas que regulamentam o lançamento de efluentes em corpos de água. Dentre as leis que governam o despejo de efluentes, destaca-se a Política Nacional de recursos hídricos, Lei Federal nº. 10.881, de junho de 2004, quespõe sobre os contratos de gestão entre a Agência Nacional de Águas e entidades delegatórias das funções de Agências de Águas relativas à gestão de recursos hídricos de domínio da União. Além disso, existe a Resolução nº. 357 instituída em 17 de março de 2005 pelo CONAMA, que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, entre outras questões. A adoção de um maior rigor nos padrões de descarte de efluentes de águas residuais tem motivado a realização de pesquisas, cujo objetivo é reduzir o impacto ambiental dos poluentes. O órgão internacional “Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing Industry” (ETDA), criado em 1974 com o intuito de minimizar os possíveis danos ao homem e ao meio ambiente, vem tentando fiscalizar a fabricação e o uso de corantes sintéticos, porém este controle ainda é falho em países em desenvolvimento (GUARATINI e ZANONI, 1999; ZANONI e CARNEIRO, 2001).

A variada natureza química dos corantes e o uso rotineiro de vários aditivos químicos de composição variada (umectantes, antiespumantes, dispersantes, ajustadores de pH) durante o banho de tintura, montagem e fixação, dificultam o processo de tratamento e remoção dos corantes com apenas um procedimento (ALCÂNTARA e DALTIN, 2006). Um resumo dos principais componentes encontrados em efluentes de indústrias têxteis é descrito na Tabela 2.

TABELA 2 – PRINCIPAIS POLUENTES DO EFLUENTE TÊXTIL

Poluente	Principais substâncias	Origem
Matéria orgânica	Amidos, enzimas, gorduras, graxas, surfactantes e ácido acético	Limpeza, lavagens, tingimento
Cor	Corantes, impurezas da lã	Lavagem, tingimento
Nutrientes	Sais de amônia, uréia, tampões, surfactantes	Tingimento
pH e sais	Hidróxido de sódio, ácidos minerais e orgânicos, cloreto de sódio, silicatos, sulfatos e carbonatos	Limpeza, alvejamento, tingimento, neutralização
Enxofre	Sulfatos, sulfitos e hidrosulfitos, ácido sulfúrico	Tingimento
Compostos tóxicos	Metais pesados, agentes oxidantes e redutores, biocidas, sais de amônio quaternário	Limpeza, alvejamento, tingimento, finalização

Fonte: adaptado de RAMALHO, 2005

Atualmente, vários métodos podem ser utilizados na remoção de corantes em efluentes industriais (Tabela 3), estes podem ser distribuídos em três categorias: químicos, físicos e biológicos. Os métodos químicos compreendem: reação de Fenton, ozonação, processos fotoquímicos e destruição eletroquímica. Os mais utilizados são processos oxidativos, em decorrência de sua simplicidade de aplicação. A oxidação química remove a cor de efluentes como resultado da quebra das ligações aromáticas das moléculas de corantes.

Já os métodos físicos consistem em técnicas de remoção resultantes de dois mecanismos: adsorção, onde o corante é fixado a um suporte ou resina, como carvão ativado ou outros materiais e troca iônica. Estes são influenciados por múltiplos fatores físico-químicos como a interação corante/suporte, área de superfície do sorvente, tamanho da partícula, pH, temperatura e tempo de contato (SLOKAR e LE MARECHAL, 1997; ROBINSON *et al.,* 2001).

TABELA 3 – TÉCNICAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS

Processo	Desempenho	Limitações
Oxidação de Fenton	Total descoloração; baixo capital e custo de funcionamento	Geração de lodo pela floculação dos reagentes e das moléculas do corante
Eletrólise	Total descoloração; baixo custo.	Tempo de vida da espuma e do eletrodo
Flotação	Remove 90% da cor e 40% DQO; baixo custo; compacto.	
Filtração	Alta performance; reuso de água, sais e calor.	Manuseio e descarte do material retido
Coagulação/ floculação	Total descoloração; reuso de água.	Nem sempre efetivo; disposição de lodo
O_3	Total descoloração; reuso de água.	Alto custo; formação de aldeídos
Adsorção (carbono, biomassa, argila)	Novos adsorventes são efetivos e com baixo custo; reuso de água.	Alta eliminação ou regeneração de custo
Fotocatálise	Remoção da cor quase completa; desintoxicação.	Somente como passo final de polimento
Biodegradação: **-** Lodo ativado	Redução DQO e N.	Grande quantidade de DQO, N, cor e surfactantes no resíduo.
- Seqüência anaeróbica/ aeróbica	Redução de DQO, cor e tóxicos.	Grande quantidade de resíduo de cor e DQO
- Leito fixo	Redução de DQO e cor.	
- Fungos/ H_2O_2	Total descoloração.	Possível formação de produtos mais tóxicos

FONTE: adaptado de VANDEVIVERE *et al*., 1998
NOTA: DQO - demanda química de oxigênio, N – nitrogênio

Do ponto de vista ambiental, a maior desvantagem do processo de adsorção reside no fato dos corantes adsorvidos não serem mineralizados (degradação completa do poluente, com concomitante produção de CO_2 e H_2O), havendo, na realidade, uma transferência de poluentes de uma fase líquida para outra sólida, que terá que ser posteriormente tratada (KUMAR *et al.,* 1998). Assim, o processo de adsorção não é eficiente nem economicamente atraente quando aplicado sozinho, mas pode ser muito útil se combinado com redução química ou processos de

biodegradação e fermentação de fase sólida. Aksu e Dönmez (2003) descreveram o processo de adsorção do corante “Reactive Remazol Blue” em solução aquosa por biomassa das leveduras *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces marxianus, Cândida* sp., dentre outras.

Dentre os métodos biológicos, o mais utilizado é o sistema de lodos ativados, o qual consiste na agitação dos efluentes na presença de microrganismos e ar, durante um tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica (BITTON, 1994 *appud* KNUZ, 2002). O tratamento biológico inclui habitualmente processos aeróbios que, em relação à remoção de cor, são ineficazes para uma grande variedade de corantes.

Corantes reativos solúveis em água e ácidos são os mais problemáticos, pois eles tendem a passar pelos sistemas de tratamento convencionais inalterados (WILLMOTT *et al.,* 1998). Sistemas de tratamento aeróbio, dependentes de atividade biológica, são ineficientes na remoção destes corantes (MORAN *et al., 1997*). A preocupação com estes tipos de corante é decorrente de sua síntese, visto que muitos corantes são feitos a partir de agentes cancerígenos conhecidos, tais como benzidina e outros compostos aromáticos (BAUGHMAN e PERENICH, 1988).

Poucos azo-corantes são degradados via aeróbia. É possível degradar estes compostos via anaeróbia, mas neste processo ocorre redução da ligação azo resultando da geração de aminas aromáticas tóxicas, produtos ainda que sem cor, são mais tóxicos que os compostos de partida (WONG e YU al., 1999). Işik e Sponza (2004) ao acoplar sistema anaeróbio–aeróbio comprovaram uma eficiente biodegradação do azocorante “Direct Black 38”. Neste sistema, corantes azóicos são reduzidos e descoloridos anaerobicamente, produzindo aminas aromáticas. Estas, em sistemas acoplados, sofrem subseqüente degradação aeróbia, pois são pouco removidas em condições anaeróbias.

A indústria têxtil, em geral, tem seus processos de tratamento fundamentados na operação de processos físico-químicos de precipitação-coagulação, seguido de tratamento biológico à base de lodos ativados. Este sistema apresenta eficiência relativamente alta, em torno 80%, porém o lodo gerado não pode ser reaproveitado em decorrência da alta concentração de corantes adsorvida (ROBINSON *et al.,* 2001). Em decorrência disso, vem aumentando o interesse pela busca de microrganismos versáteis capazes de degradar de maneira eficiente estes resíduos a um baixo custo operacional.

2.4 BIODEGRADAÇÃO

Dentre as múltiplas estratégias aplicadas para a eliminação de corantes têxteis, a biodegradação começa a ocupar um lugar de destaque por seu apelo ecológico. Esta consiste na modificação estrutural e adsorção de substratos poluentes por diferentes organismos (plantas, algas, bactérias, leveduras e fungos) levando à introdução deles no fluxo normal de nutrientes na natureza. A aplicação de processos biológicos na remoção de compostos químicos recalcitrantes na natureza é designada biorremediação (BANAT *et al.*, 1996; GIANFREDA e RAO, 2004).

Tecnologias de biorremediação estão recebendo grande atenção para restauração de locais muito poluídos, onde a biodegradação natural ocorre lentamente ou imperceptivelmente. Métodos de aceleração do processo de biodegradação podem utilizar microrganismos de ocorrência natural (autóctone), com estimulação desta microbiota pela manipulação das condições ambientais. Esses métodos podem ainda ser otimizados, introduzindo microrganismos alóctones (que não apresentam ocorrência natural no ambiente em questão) com comprovada capacidade de metabolizar o poluente. Processos otimizados podem ser conduzidos no próprio local (*in situ*), ou fora dele (*ex situ*), implicando assim na remoção do material contaminado (POINTING, 2001; BALLAMIUT, 2007).

Segundo Pointing (2001), a biorremediação já é uma tecnologia estabelecida, porém a maioria dos tratamentos empregados utilizam microrganismos procariotos. Neste contexto, fungos lignolíticos têm despertado grande interesse devido à produção de uma diversidade de enzimas que apresentam ação sobre múltiplos substratos de origem industrial. O uso destes organismos possibilita a expansão da biodegradação a poluentes que não consistem em substratos aos procariotos.

2.4.1 Fungos lignolíticos

Ao lado de outros microrganismos, os basidiomicetos ligninolíticos atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a reciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (TUOMELA *et al.* 2000). Os fungos decompositores da madeira podem ser classificados em grupos

ecofisiológicos: causadores de podridão branca (White-rot fungi), de podridão parda (Brown-rot fungi) e de podridão mole (Litter-rot fungi; Tabela 4). Dentre eles, os fungos de podridão branca são considerados os organismos mais eficientes na biodegradação de poluentes (GLENN e GOLD, 1983; PASZCZYNSKI *et al.,* 1992; SPADARO *et al.,* 1992; POINTING, 2001; WESENBERG *et al.,* 2003).

TABELA 4 – CLASSIFICAÇÃO DOS FUNGOS DA PODRIDÃO DA MADEIRA

Grupo	Filo	Degradação da lignina	Ambiente	Alguns gêneros
Fungos de podridão branca	Basidiomicetos (Ascomicetos)	Mineralização da lignina, deslignificação seletiva ou não seletiva	Principalmente madeira dura	*Phanerochaete, Phlebia, Trametes*
Fungos de podridão parda	Basidiomicetos	Modificação da lignina	Principalmente madeira mole	*Poria, Polyporus*
Fungos de podridão mole	Ascomicetos ou fungos amorfos	Degradação limitada de lignina	Ambientes aquáticos, madeira com umidade elevada, serapilheira	*Chaetomium, Paecilomyces, Fusarium*

FONTE: adaptado de Tuomela *et al.,* 2000

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* (Figura 2), um dos mais exaustivamente estudados, revelou a capacidade de degradar corantes azóicos, antraquinona, heterocíclicos, trifenilmetano e poliméricos (GLENN e GOLD, 1983; PASZCZYNSKI *et al.,* 1992; SPADARO *et al.,* 1992; OLLIKKA *et al.,* 1993; CRIPPS *et al.,* 2004), além de vários outros compostos químicos como polímeros sintéticos (poliacrilato, poliacrilamida, nylon), compostos aromáticos clorinados (2,4-diclorofenol, pentaclorofenol, 2,4,6-ácido triclorobenzóico, 2,4,5-triclorofenol, 2,4,5-ácido triclorofenoxiacético), munições e explosivos (nitroglicerina, trinitrotolueno), pesticidas (dentre eles o dicloro-difenil-tricloroetano - DDT), compostos aromáticos policíclicos (antraceno, naftaleno, pireno, benzopireno) e outros (aminotriazol, azida, tetracloreto de carbono e cianidas) (CAMERON *et al.*, 2000).

FIGURA 2 – FOTO DO FUNGO *Phanerochaete chrysosporium*
FONTE: http://www.world-of-fungi.org

Muitos trabalhos têm tido como objetivo isolar e selecionar fungos que apresentam capacidade de descorar diferentes corantes comerciais têxteis (KNAPP *et al.*,1995; BANAT *et al.,*1996; OKINO *et al.,* 2000; KAPDAN *et al.,* 2000; LEVIN *et al.,* 2004; DHOUIB *et al.,* 2005). Vários fungos de podridão branca tem sido descritos com capacidade de descorar diferentes classes de corante como, por exemplo, *Bjerkandera adusta e Trametes versicolor,* que degradam diferentes corantes azo tipo reativo, ftalocianina e antraquinonas (HEINFLING *et al.,* 1997; NOVOTNÝ *et al.*, 2001). Segundo Knapp *et al.* (1995) *Pleurotus ostreatus,* duas cepas de *Coriolus versicolor, P. chrysosporium, Piptoporus betulinus*, além de duas espécies não identificadas são capazes de degradar corantes azo, ftalocianina, corantes metálicos, antraquinonas, triarilmetano e corantes heterocíclicos, porém a porcentagem de descoloração apresenta variação entre 50 – 100% dependendo do fungo e do corante analisado.

Machado *et al.* (2005) demonstraram a degradação do corante “Remazol Brilliant Blue R”, após 14 dias de crescimento em meio sólido, por 106 basidiomicetos. Nokazi *et al.* (2008) investigaram a descoloração de 27 tipos de corantes pertencentes a diversas classes químicas (Monoazo, Diazo, Trifenilmetano, Ftalocianina) realizada por extratos secretados de 21 basidiomicetos. Observaram que somente nove corantes foram descoloridos por mais de 40% com todos os fungos testados.

Eichlerová *et al.* (2006) testaram a atividade descorante de oito espécies pertencentes ao gênero *Pleutorus*, sendo que quatro foram capazes de descolorir os

dois corantes testados (“Orange G”, corante azóico e “Remazol Brilliant Blue R”, antraquinona), três descoraram apenas o corante Remazol, porém nenhuma delas apresentou capacidade de descorar somente “Orange G”. O fato sugere, segundo os autores, que corantes azo são mais resistentes a degradação do que antraquinonas. A quantidade e diversidade de corantes disponíveis no mercado superam a possibilidade de encontrar uma única espécie com ação sobre a maior parte destes poluentes, o que é dificultado pela presença de vários outros compostos em efluentes têxteis.

2.5 ENZIMAS MODIFICADORAS DE LIGNINA - LMES

Atualmente o uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse devido a sua facilidade de obtenção através de processos de biotecnologia e as vantagens em relação aos catalisadores químicos, como reutilização, maior especificidade, menor consumo energético, maior velocidade de reação e redução dos custos de maquinaria e laboratoriais (MUSSATTO *et al.,* 2007). Duas estratégias têm sido propostas para a utilização de enzimas lignolíticas para a degradação de compostos recalcitrantes: a transformação direta de poluentes por culturas ativas de basidiomicetos ligninolíticos pré-selecionados, e o uso de enzimas extraídas/ purificadas do meio de cultura. Contudo, a escolha da melhor estratégia irá depender dos objetivos e das condições empregadas durante o processo de biodegração (TRUPKIN *et al.* 2003).

As LMEs são oxidoredutases envolvidas na degradação e mineralização da lignina, apresentam baixa especificidade, o que as torna capazes de degradar, além da lignina, um amplo espectro de organopoluentes persistentes com similaridades estruturais com a lignina, dentre eles os corantes têxteis (Figura 3). A base da não especificidade destas enzimas encontra-se na formação de radicais livres, muito reativos, passíveis de interações com múltiplos substratos (BARR e AUST, 1994). A degradação da lignina, bem como xenobióticos recalcitrantes, é um processo complexo de oxidação, redução, metilação e hidroxilação que envolve numerosos co-fatores de baixa massa molar, os quais podem servir como mediadores de óxido-redução.

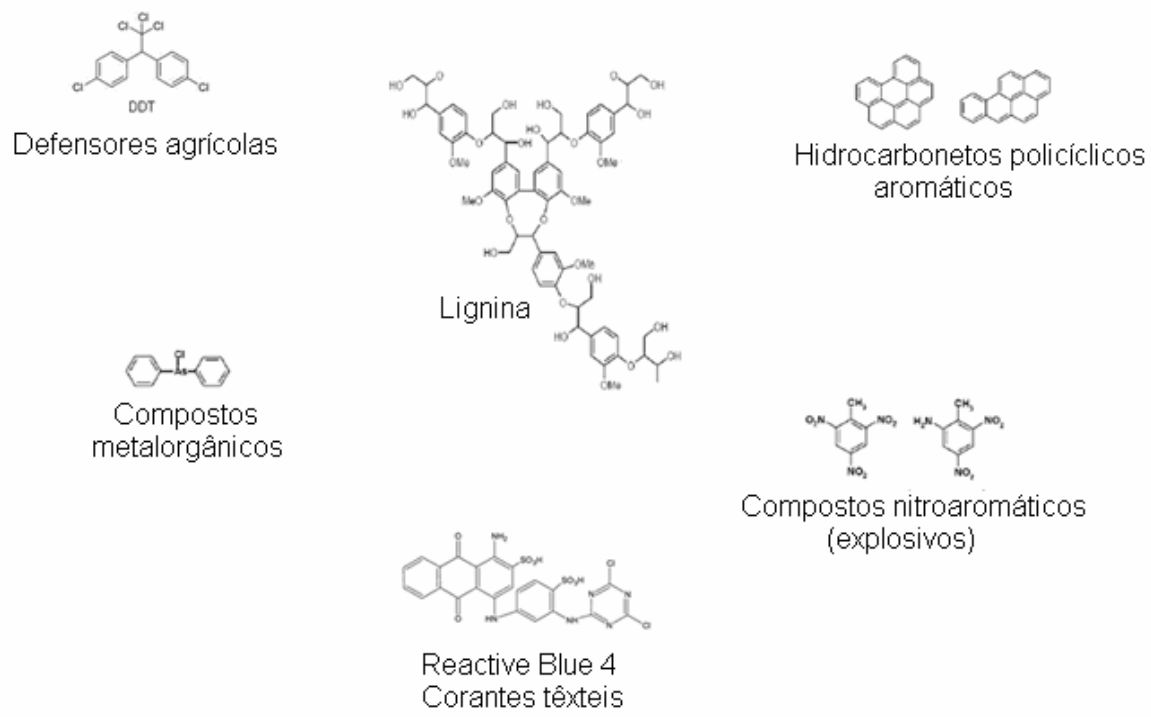


FIGURA 3 – SIMILARIDADES ESTRUTURAIS ENTRE UM SEGMENTO DA MOLÉCULA DE LIGNINA E ALGUNS SUBSTRATOS POLUENTES.
FONTE: O autor.

As LMEs são freqüentemente expressas em diferentes combinações, isoformas e taxas, sob diferentes condições, sendo que a sua síntese e secreção é, freqüentemente, induzida por níveis limitados de carbono e/ou nitrogênio. (WESENBERG *et al.,* 2003; GIANFREDA e RAO, 2004). Os principais membros deste grupo são as lacases (Lac, E.C. 1.10.3.2), Manganês Peroxidases (MnP, E.C. 1.11.1.13) e Lignina Peroxidases (LiP, E.C. 1.11.1.14), uma fenoloxidase e duas peroxidases, respectivamente. Um resumo comparativo das principais características das LMEs está descrito na Tabela 5.

A natureza polimérica da lignina e o volume das LMEs dificultam a interação direta e específica entre estas. Em decorrência, moléculas com baixo massa molar agem como mediadores redox difusíveis, fornecendo alto potencial de óxido-redução para degradar a lignina e penetrar no complexo de ligninocelulose. Estes mediadores podem estar envolvidos na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), e atacar, direta ou indiretamente, a lignina e moléculas xenobióticas (HAMMEL, 1996; VAN AKEN e AGTHOS, 2001; VAN AKEN e AGTHOS, 2002).

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE MANGANÊS PEROXIDASE, LIGNINA PEROXIDASE E LACASE DOS FUNGOS DE PODRIDÃO BRANCA

Enzima	Manganês peroxidase	Lignina peroxidase	Lacase
E.C.	1.11.1.13	1.11.1.14	1.10.3.2
Grupo Prostético	Heme	Heme	1 tipo 1-Cu, 1 tipo 2-Cu, 2 pares tipo 3-Cu
Massa molar (kDa)	32 – 62,5	38-47	59-110 (tetrâmeros)
Isoformas	Monômeros	Monômeros	Mono-, di-, tetrâmeros
PI	2,8 – 7,2	3,2-4,7	2,6-4,5
Faixa ótima de pH	2,6 – 4,5	2,0-5,0	2,0-8,5
Quebra de ligações C-C	Sim	Sim	----------
Estabilidade	+++	+	+++
Mediadores nativos	Mn^{+2} e Mn^{+3}	Álcool veratril; 2Cl-1.4DMB	3-HAA
Especificidade	Mn^{+2}	Anéis aromáticos incluindo não fenólicos	Anéis aromáticos fenólicos
Mediadores secundários e sintéticos	Tióis e ácidos graxos insaturados	----------	ABTS, HBT

FONTE: adaptado de WESENBERG *et al.,* 2003
NOTA: 2Cl-1.4DMB: 2-cloro-1,4-dimetoxibenzeno; 3-HAA: ácido 3-hidroxiantranílico; ABTS: 2,2'-azinobis (3- etilbezotiazolina-6-sulfonato) ; HBT: 1-hidrozibenzotriazol.

Além das LMEs, muitos outros componentes participam do sistema de degradação de lignina apresentado pelos fungos de podridão branca. Dentre eles, outras enzimas auxiliares produtoras de H_2O_2, substrato das peroxidases (REDDY, 1995; BANCI *et al.,* 1999; CAMERON *et al.*, 2000; MESTER e TIEN, 2000; WESENBERG *et al.,* 2003; CAVALLAZZI *et al .,* 2004).

2.5.1 Peroxidases

As peroxidases lignolíticas, MnP e LiP, apresentam ciclo catalítico similar ao das demais peroxidases. Atualmente, já é descrita uma terceira enzima peroxidase

que também atua na quebra da lignina. Esta é conhecida por peroxidase versátil por atuar como híbrido de LiP e MnP. Os sítios de ligação com substratos são os principais responsáveis pelas diferenças funcionais destas enzimas.

2.5.1.1 Manganês Peroxidase - MnP

O ciclo catalítico desta enzima (Figura 4) é iniciado pela ligação de H_2O_2 a enzima nativa férrica e formação do complexo ferro-peróxido. A quebra da ligação oxigênio – peróxido de hidrogênio requer a transferência de dois elétrons do grupamento heme da enzima, resultando na formação do composto I da manganês peroxidase e uma molécula de água. A seguir, um íon Mn^{+2} age como doador de um elétron para o composto I, formando o composto II e o íon Mn^{+3}. A redução do composto II ocorre de maneira similar à descrita acima e outro Mn^{+3} é formado a partir de um Mn^{+2} regenerando, deste modo, a enzima férrica nativa (CAMERON *et al.* 2007).

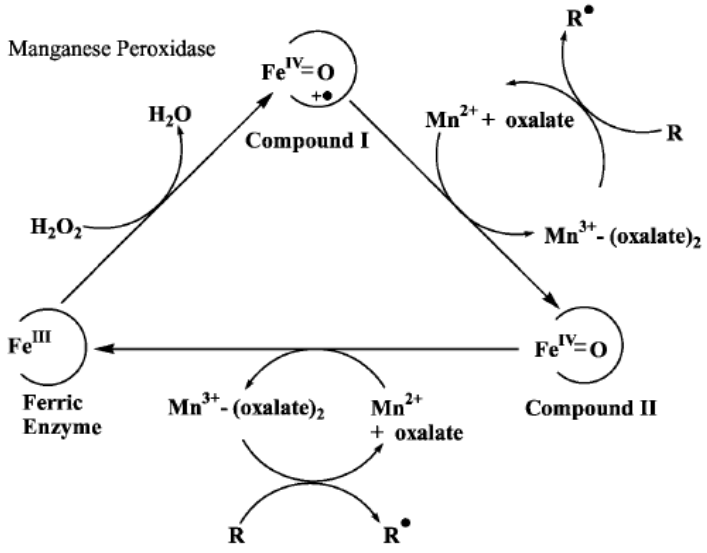


FIGURA 4 – CICLO CATALÍTICO DA ENZIMA MANGANÊS PEROXIDASE
Fonte: CAMERON *et al*., 2007

O composto I é capaz de oxidar vários compostos fenólicos, enquanto a redução do composto II requer exclusivamente Mn^{+2} como substrato. Mn^{+3} é estabilizado por ácidos orgânicos secretados por vários fungos, os quais quelam e oxidam Mn^{+3}, como por exemplo, o ácido oxálico. Este, quando quelado, age como

um mediador difusível de óxido-redução, degradando esqueletos fenólicos, tióis e aminas aromáticas, degradando e depolimerizando, assim, seu substrato natural (lignina), assim como compostos xenobióticos (REDDY, 1995; BANCI *et al.,* 1999; MESTER e TIEN, 2000; WESENBERG *et al.,* 2003). Desta maneira, ácidos orgânicos são tidos como a origem de radicais centrados em carbono, radicais peroxil e superóxidos, que podem ser fonte de peróxidos para a utilização por MnP ao invés de H_2O_2. Conseqüentemente, fungos que carecem de enzimas produtoras de H_2O_2 podem ser eficientes degradadores de lignina (HOFRICHTER, 2002). A degradação *in vitro* da lignina e outras moléculas recalcitrantes por MnP é aumentada na presença de tióis (glutationa reduzida e cisteína) e ácidos graxos insaturados (WESEMBERG *et al.*, 2003).

2.5.1.2 Lignina Peroxidase - LiP

LiP catalisa a oxidação de compostos não fenólicos da lignina e de substratos similares, através de várias oxidações em suas cadeias laterais pela retirada de um elétron, formando radicais reativos (WESENBERG *et al.* 2003). Seu ciclo catalítico (Figura 5) consiste na oxidação da enzima férrica por dois elétrons pelo H_2O_2 formando o composto I. Este oxida substratos aromáticos, retirando dois elétrons, formando o composto II, que novamente oxida substratos aromáticos regenerando a enzima nativa férrica (CAMERON *et al.* 2007).

Os substratos para a enzima parecem ser determinados tanto pelo tamanho da molécula, quanto pelo seu potencial de óxido-redução. Seu papel na degradação da lignina parece ser o de degradar produtos formados pela ação da MnP (REDDY, 1995; EGGERT *et al.,* 1996a; BANCI *et al.,*1999; MESTER e TIEN, 2000; WESENBERG *et al.,* 2003). A presença de um metabólito secundário facilita a oxidação do Composto I. O álcool veratril é um metabólito secundário produzido por fungos de podridão branca, e após sua oxidação para radical cátion veratril age como mediador na degradação da lignina, estimulando a ação da LiP, e protegendo-a contra dano enzimático causado por H_2O_2 (MESTER e TIEN, 2000; WESENBERG *et al.,* 2003).

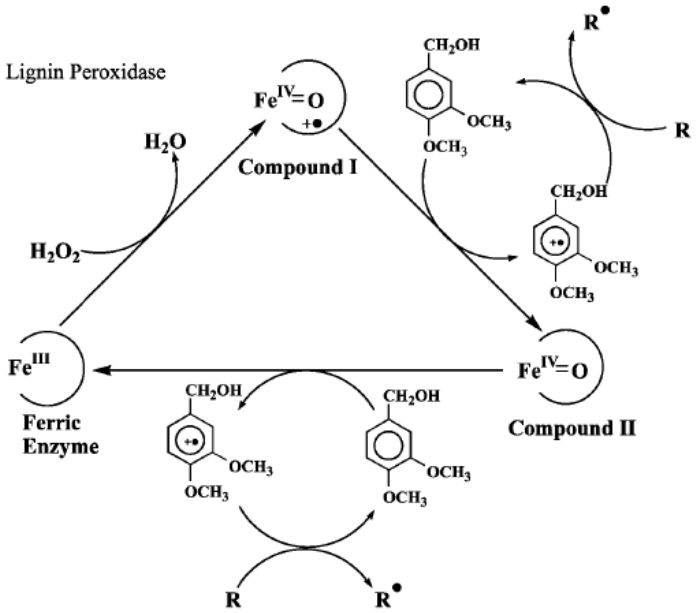


FIGURA 5 – CICLO CATALÍTICO DA LIGNINA PEROXIDASE
FONTE: CAMERON *et al.,* 2007

2.5.1.3 Peroxidases Versáteis - VPs

Um terceiro grupo de enzimas, as peroxidases versáteis, tem sido descritas em espécies de *Pleurotus sp.* e *Bjerkandera sp*. Estas agem como híbridos de MnP e LiP, oxidando Mn^{+2}, bem como compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos, incluindo corantes (HEINFLING *et al.*, 1998; MESTER e FIELD, 1998, MCMULLAN *et al.*, 1998). Camarero *et al.* (1999) observaram que a enzima produzida pela linhagem *Bjerkandera* sp. B33/3 pode ser incluída, juntamente com as enzimas produzidas por *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonarius*, *Bjerkandera adusta*, na classe das enzimas peroxidases versáteis.

2.5.2 Fenoloxidases

2.5.2.1 Lacase - Lac

Estas enzimas podem ser secretadas ou intracelulares e catalisam tanto depolimerização quanto polimerização de seus substratos (YOUNG *et al.*, 1995 RIVA, 2006). Lac catalisa a oxidação de uma variedade de doadores aromáticos de hidrogênio com a concomitante redução de oxigênio à água. Além disso, não oxidam somente ácidos fenólicos e metoxifenólicos, mas também realizam descarboxilação e demetilação destes (REDDY, 1995; BANCI *et al.,* 1999; WONG e YU, 1999; WESENBERG *et al.,* 2003; CAVALLAZZI *et al.,* 2004).

O sitio ativo da enzima inclui quatro íons cobre. O cobre tipo I age como doador de elétrons de fenóis e amidas substituídas (substratos típicos), enquanto o cobre tipo II transfere elétrons para o aceptor final, dioxigênio, o qual é reduzido à água. Já os dois íons cobre tipo III agem como intermediários da transferência de elétrons. Durante seu ciclo catalítico, ocorre a redução de um oxigênio molecular à duas moléculas de água e a concomitante oxidação de quatro moléculas de substratos para produzir quatro radicais livres como demonstrado na Figura 6 (RIVA, 2006).

Compostos não fenólicos podem ser oxidados pela enzima através de um composto intermediário ou “mediador”. Em geral, um mediador pode ser definido como uma molécula com a função de transportar elétrons entre as enzimas e os compostos não fenólicos. Depois de oxidado pela enzima, o mediador sai de seu sítio ativo e pode oxidar qualquer substrato, que, devido ao seu tamanho, não consegue entrar diretamente no sítio enzimático. A forma oxidada do mediador é distinta estruturalmente da enzima oxidada, o que lhe permite diferentes mecanismos de oxidação, e conseqüentemente aumenta a gama de substratos suscetíveis a ação da enzima (BAIOCCO *et al.*, 2002).

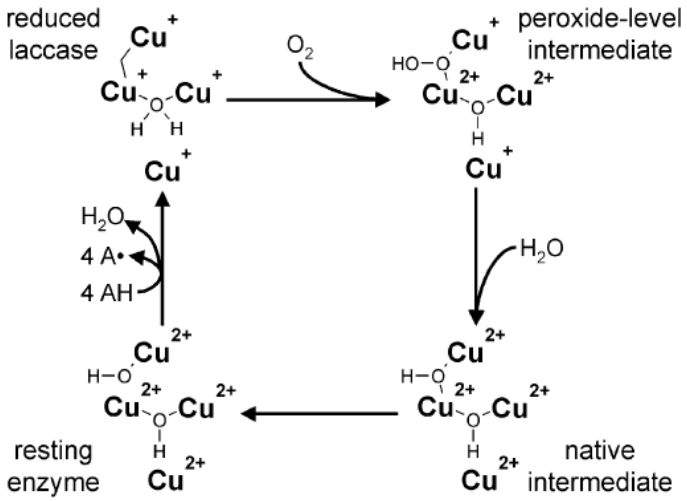


FIGURA 6 – CICLO CATALÍTICO DA ENZIMA LACASE
FONTE: WESENBERG *et al.,* 2003

Estes mediadores podem ser sintéticos ou naturais. O ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) foi o primeiro mediador natural descrito para lacases. Este permite a oxidação de dímeros não fenólicos de lignina, atuando como "ponte de elétrons" (EGGERT *et al.*, 1996b). Segundo Wesemberg *et al.* (2003), diferentes mediadores sintéticos têm sido testados com lacases, dentre eles, o ABTS (2,2'-azinobis (3- etilbezotiazolina-6-sulfonato) e o HBT (1-hidrozibenzotriazol).

2.5.3 Outras enzimas envolvidas no processo

Uma completa degradação da lignina requer muitas enzimas intracelulares tanto para a completa mineralização dos monômeros a CO_2 e H_2O quanto para a geração de metabólitos secundários que suportam o metabolismo extracelular. Um importante componente do sistema ligninolítico é o H_2O_2, substrato oxidativo nas reações peroxidativas. Neste contexto, um grande número de oxidases tem sido propostas para desempenhar o papel de produção deste composto.

A correlação temporal existente entre glioxal oxidase (EC 1.1.3.9), enzimas peroxidases e H_2O_2 sugerem uma grande correlação fisiológica entre estes componentes. As enzimas glioxal oxidase e aril álcool oxidase (EC 1.1.3.7; também chamada de álcool veratril oxidase) são produzidas por *P. chrysosporium* em

condições limitantes de nutrientes (ZHAO e JANSE, 1996). Estas enzimas se apresentam como substratos biológicos intermediários, formados durante a degradação da lignina, oxidando uma variedade de aldeídos e álcoois produzidos e secretados pelos fungos, com concomitante formação de H_2O_2 (BOURBONNAIS e PAICE, 1988).

Em estudos realizados com *P. chrysosporium*, foram identificadas duas glucoses oxidases envolvidas na produção de H_2O_2: glucose-1-oxidase (EC 1.1.3.4) e glucose-2-oxidase (EC 1.1.3.10). Entre os substratos descritos para estas enzimas, pode-se incluir D-glucose e D-glucona-1,5-lactona. Estas enzimas são predominantemente intracelulares em culturas líquidas deste fungo e sua produção é dependente do organismo e da cepa estudados. Tem sido descrito que estas enzimas são localizadas no espaço periplasmático das hifas e sendo associadas com a membrana (ERIKSSON *et al.,* 1986; CULLEN e KERSTEN 2004).

Outra enzima que participa do processo de degradação da lignina, assim como do metabolismo de carboidratos dos fungos de podridão branca e marrom, é a celobiose desidrogenase (EC 1.1.99.18). Esta é secretada quando a celulose é utilizada como fonte de carbono, porém a função desta enzima permanece incerta. Foi sugerido que esta enzima é oxidada por dois elétrons para a redução de uma ampla gama de aceptores de elétrons. Dois destes aceptores são íons férricos e oxigênio molecular, os quais formam pela ação enzimática, íons ferrosos e H_2O_2, respectivamente (WYDE e WOOD, 1997 *appud* CAMERON *et al.*, 2000).

Várias outras enzimas já foram descritas em *P. chrysosporium* que, segundo Cullen e Kersten (2004) incluem metanol oxidase (EC 1.1.3.13), 1,4-benzoquinona redutase, metil-transferase, citocromo P450, L-fenilalanina amonialiase, 1,2,4-trihidroxibenzeno 1,2-dioxigenase, glutationa transferase, superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) e catalase.

2.6 DESCRIÇÃO E ANTECEDENTES DO CORANTE E MICRORGANISMOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

2.6.1 Corante Remazol Azul (C.I. Reactive Blue 220)

Este corante foi fornecido pela empresa DYSTAR e em sua ficha técnica é designado Azul Brilhante Remazol BB 133% gran. Quanto ao modo de aplicação é classificado como corante reativo, apresenta em sua estrutura complexo de cobre e formazana e grupamento azo como cromóforo. Contém em torno de 4% de cobre no complexo, nitrogênio passível de liberação que pode contribuir para a eutrofização e fosfatos em compostos orgânicos fosforados. Porém, sua estrutura química encontra-se protegida por patente.

Com relação a informações toxicológicas, apresenta possibilidade de sensibilização ao contato com a pele. Já quanto às informações ecológicas disponíveis, a toxicidade em peixes medida pelo LC_{50} é de 500 mg/L (96 h, *Brachydanio rerio*). Segundo Bae e Freeman (2007), esta concentração caracteriza um poluente como relativamente não-tóxico (concentração superior a 100 mg/L). Já a toxicidade em bactérias, avaliada por LC_{50} medida em lodo ativado contendo o corante (3 h), sendo descrita para concentrações maiores que 1 g/L.

Na literatura, a informação a cerca da degradação deste corante é escassa. Kurbus *et al.* (2003) avaliaram a eficiência de descoloração de corantes azóicos por três processos de oxidação avançada (H_2O_2/UV, H_2O_2/O_3 e H_2O_2/Fe^{2+}). Os resultados de descoloração obtidos pelos três processos demonstram que o corante “Reactive Blue 220” foi o que apresentou maior dificuldade de degradação, sendo necessários 120 min para descoloração superior a 99% através dos processos H_2O_2/UV, H_2O_2/O_3 e em torno de 40min para completa descoloração pelo processo contendo Fe^{2+}. Porém, estas três formas de degradação não reduzem significativamente o índice total de carbono orgânico (quantidade de ligações entre carbonos que podem ser oxidadas a CO_2), excedendo o valor permitido.

Munari *et al.* (2007) descreveram a total descoloração de 0,1 g/L deste substrato realizada por culturas de *Pleurotus sajor-caju* sob diferentes condições de cultivo, pH e temperatura. O caldo enzimático proveniente de fermentação em fase sólida descora o substrato totalmente, em 30 min de reação, nas temperaturas de

30, 40 e 50°C, em valores de pHs 4,1 e 5. Em pHs maiores (6 e 6,5) encontra-se uma redução da descoloração em todas as temperaturas, embora esta ainda se mantenha alta. Já para culturas crescidas em meio de cultivo líquido, 97% da cor são removidos em apenas 3 dias de cultivo. Obtiveram, também, um diferente perfil de secreção de enzimas lignolíticas entre os diferentes meios de cultivo. Quando analisada a descoloração, em placas de Petri com 11 dias de crescimento, de misturas de dois corantes: Reactive Blue 220 e outro corante que não foi degradado quando testado sozinho (dois reativos, um ácido e um disperso), a degradação deste foi dificultada. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que este corante pode agir como mediador redox para as reações enzimáticas envolvidas no processo de descoloração.

2.6.2 Microrganismos

2.6.2.1 *Hydnopolyporus fimbriatus*

Classificação segundo o “Catalogue of life Annual Checklist – 2008”: Filo Basidiomicota; Classe Basidiomicetos; Ordem Polyporales; Família Meripilaceae e ao gênero *Hydnopolyporus*. Encontrado especialmente no chão, em troncos enterrados de várias espécies de angiospermas. Saprófito sem importância patogênica. A sua distribuição geográfica no Brasil compreende os estados do Amazonas, Bahia, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (FIDALGO, 1963). Também conhecido como *Abortiporus fimbriatus*, *Beccaria caespitosa*, *Beccariella caespitosa*, *Boletus fimbriatusI*, *Clavaria sparassoides*, *Coltricia perennis* var. *fimbriata*, *Polyporus fimbriatus*, *Polystictus fimbriatus*, *Poria fimbriata* (Catalogue of life Annual Checklist – 2008).

Machado *et al.* (2005) avaliaram a descoloração de “Remazol Brilliant Blue R” (RBBR) em placas de Petri contendo meio sólido de extrato de malte e corante a 0,05% por 125 basidiomicetos, dentre eles *Hydnopolyporus fimbriatus*, o qual causou degradação eficiente no substrato utilizado, qualitativamente. Já Okino *et al.* (2000) avaliaram, dentre outros fungos, *H. fimbriatus* quanto à oxidação do corante

“Remazol Brilliant Blue R” e guaiacol, assim como a atividade de lacase e peroxidases e obteve resultados positivos para todos os testes.

FIGURA 7 – FOTO DO FUNGO *Hydnopolyporus fimbriatus*
FONTE: http://www.aebletoften.dk

2.6.2.2 Lepista sordida

Classificado, segundo o “Catalogue of life: Annual Checklist – 2008”, como pertencente ao Filo Basidiomicota; classe Basidiomicetos; Ordem Agaricales; Família Tricholomataceae e ao gênero *Lepista*. Espécie comestível, que apresenta coloração lilás-esbranquiçada, píleo de 3,5 centímetros de diâmetro, plano, um pouco carnudo e estipe cilíndrica. No Chile, é distribuído na área Central e do Sul do país, mas não foram encontrados dados a respeito da distribuição deste fungo no Brasil. É uma espécie saprófita que frutifica nas pastagens, prados, bordas de trilhas de florestas de caducifólias e coníferas. Classificado como decompositor de serapilheira que consiste de restos de vegetação, bem como de animais em diferentes estágios de decomposição, que forma uma camada ou cobertura sobre o solo de uma floresta (VALENZUELA, 2003). Também conhecido como: *Agaricus sordidus*, *Gyrophila nuda* Var. *lilácea*, *Lepista sordida* var. *ianthina*, *Lepista sordida* var. *lilácea*, *Lepista sordida* var. *obscurata*, *Rhodopaxillus sordidus*, *Rhodopaxillus sordidus* forma *obscuratus* e *Tricholoma sordidum* (Catalogue of life Annual Checklist – 2008).

Existem vários relatos de outras espécies pertencentes ao gênero *Lepista*. Steffen *et al.* (2002) avaliaram, dentre outras espécies, *L. nuda* quanto à habilidade de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (antraceno, pireno e benzopireno). Esta espécie converte menos de 20% de benzopirenos, bem como antraceno, porém a concentração de pireno é diminuída em mais de 40%, valores baixos quando comparados aos demais fungos testados. Já Machado *et al.* (2005) observaram descoloração do "Remazol Brilliant Blue R" por extratos obtidos de *L. crinitus* durante crescimento em solos contaminados com pentaclorofenol e hexaclorobenzeno. Demonstraram maior descoloração do substrato na presença de compostos organoclorados do que em solos não contaminados. Um fungo do gênero *Lepista*, não identificado a nível de espécie, apresentou-se positivo quanto à oxidação do corante "Remazol Brilliant Blue R" e guaiacol, assim como para a atividade de lacase e peroxidases (OKINO *et al.,* 2000).

FIGURA 8 – FOTO DO FUNGO *Lepista sordida*
FONTE: www.espacionatural.com

Porém, encontra-se pouco relato na literatura a respeito de biodegradação e produção de enzimas lignolíticas por esta espécie de *Lepista*. Cavallazzi *et al* (2004) analisaram a produção das principais LMEs em meio de cultivo líquido contendo fosfato de amônio, extrato de levedura e molibdato de amônio como fontes de nitrogênio em condições estáticas (sem agitação), detectando a produção de MnP e Lac. A temperatura ótima para atividade de Lac foi 45°C, com relação ao pH ótimo,

obtiveram uma maior atividade em pH 3,5 e um segundo pico de atividade a pH 6, porém em valores superiores a pH 6,5 não foi detectada atividade.

2.6.2.3 Lentinus crinitus

Classificação segundo o “Catalogue of life: Annual Checklist – 2008”: Filo Basidiomicota; Classe Basidiomicetos; Ordem Poliporales; Família Poliporaceae e gênero *Lentinus*. Encontrado em madeira em decomposição e, portanto classificado como fungo de decomposição branca. Apresenta distribuição pantropical. No Brasil, já foi relatado em Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Amapá, Pará, Espírito Santo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo (SILVA E GIBERTONI, 2006). Esta espécie é também conhecida por vários outros nomes, entre eles: *Agaricus crinitus*, *Agaricus essequeboensis*, *Lentinus chaetoloma*, *Lentinus essequeboensis*, *Lentinus microloma*, *Lentinus rigidulus*, *Lentinus subcervinus*, *Lentinus wrightii*, *Panus crinitus*, *Panus wrightii*, *Pocillaria chaetoloma*, *Pocillaria crinita*, *Pocillaria essequeboensis*, *Pocillaria rigidula*, *Pocillaria subcervina*, *Pocillaria wrightii* (Catalogue of life Annual Checklist – 2008).

FIGURA 9 – FOTO DO FUNGO *Lentinus crinitus*
FONTE: http://www.cortland.edu

Boer *et al.* (2004) avaliaram a habilidade de *L. edodes* na descoloração de vários corantes sintéticos usando culturas crescidas em estado sólido. A maioria dos

corantes testados sofreu total descoloração após 18 dias de incubação e altas concentrações de MnP foram encontradas, porém quantidades muito baixas de LiP e Lac foram detectadas, indicando que MnP é a principal enzima envolvida no processo de degradação deste fungo, nestas condições.

Machado *et al.* (2005) testaram, dentre outros fungos, duas cepas de *L. crinitus* as quais foram capazes de causar descoloração no corante “Remazol Brilliant Blue R”. Quando analisada a produção de enzimas lignolíticas em meio contendo bagaço de cana de açúcar, observou-se atividade de enzimas peroxidases para ambas, porém em diferentes taxas para cada cepa. Quando a atividade enzimática foi mensurada em solo contaminado com organoclorados, observou-se a produção de Lac para ambas as cepas em taxa similar e nenhuma atividade de MnP para as duas cepas.

Ballaminut e Matheus (2007) avaliaram a descoloração do corante “Remazol Brilliant Blue R” (1 mg/L) e a atividade enzimática da lacase de *L. crinitus* durante 30 dias de crescimento. O fungo foi crescido em bagaço de cana de açúcar enriquecido com farinha de soja e amido solúvel e obtiveram, no 10° dia de incubação 27% de descoloração do corante e um pico de atividade de lacase (0,351 U/g). Já no 30° dia observaram uma diminuição significativa de ambos os parâmetros avaliados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial de biodegradação do corante têxtil Remazol Azul Brilhante por culturas dos fungos *Lentinus crinitus*, *Lepista sordida* e *Hydnopolyporus fimbriatus*, além de estudar as características do processo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a dinâmica do processo de descoloração ao longo do tempo;
- Avaliar o efeito de concentrações crescentes do corante no crescimento do fungo e na manutenção da atividade biodegradadora;
- Verificar o uso do corante como fonte de carbono e/ou nitrogênio para o crescimento fúngico;
- Identificar a fração ativa responsável pela degradação – sobrenadante ou micélio das culturas;
- Comparar a atividade do extrato enzimático em diferentes meios de cultivo e com relação à variação de pH, temperatura e concentração de sal;
- Estudar a descoloração e o perfil de expressão de proteínas de cada fungo quando submetido a diferentes condições de cultura;
- Determinar, se presentes, quais as enzimas modificadoras de lignina estão envolvidas no processo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA GERAL

A partir de uma triagem inicial dos fungos *H. fimbriatus*, *L. crinitus* e *L. sordida,* foram analisadas a cinética de descoloração ao longo do tempo, o uso do corante como fonte de carbono e nitrogênio e o efeito de concentrações crescentes de corante. A seguir, nos fungos cuja atividade descorante foi verificada como extracelular, foi determinada a atividade sobre substratos de enzimas lignolíticas, a variação da atividade de acordo a temperatura, pH e concentração de sal concentração de sal. Finalmente, foi realizada a análise dos perfis de secreção de proteínas com concomitante atividade descorante *"in gel"*.

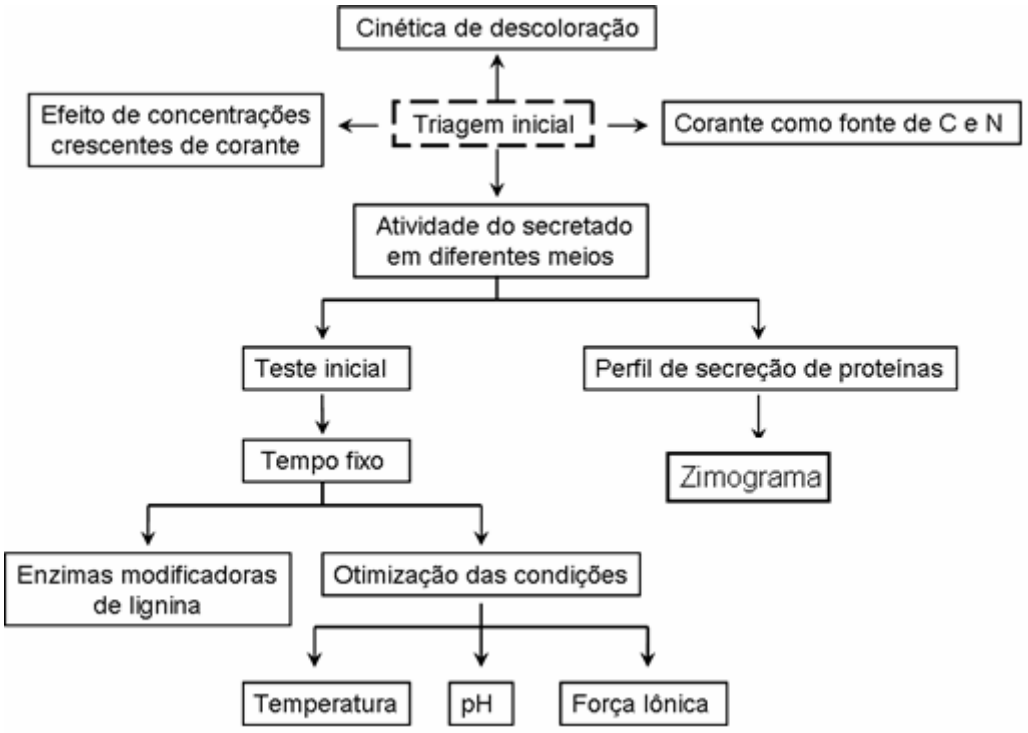


FIGURA 10 – FLUXOGRAMA GERAL DO PROJETO
FONTE: O autor (2008)

4.2 ESPÉCIMES E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Os fungos *L. crinitus*, *H. fimbriatus* usados na pesquisa foram coletados no ambiente em Campina Grande do Sul (PR) e Curitiba (PR), respectivamente. A identificação dos mesmos foi realizada por Andrej de Meijer. A cepa de *L. sordida* já era mantida no Laboratório desde o início do trabalho. Já a cepa de *Pleorotus ostreatus*, foi gentilmente cedida pelo prof. Dr Marcelo Iacomini do grupo de pesquisa de carboidratos da Universidade Federal do Paraná.

As cepas foram mantidas em placas de Petri contendo aproximadamente 20 mL de meio batata-dextrose (BDA), em estufa a 28º C, na ausência de luz, e repicadas a cada 30 dias, aproximadamente. Para a utilização destes nos ensaios, os fungos foram inoculados em meio mínimo sólido (MMS) contendo $NaNO_3$ 6,0 g/L; KH_2PO_4 1,5 g/L; KCl 0,5 g/L; $MgSO_4$ 0,5 g/L; $FeSO_4.7H_2O$ 0,01 g/L; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,02 g/L; glicose 10,0 g/L; agar bacteriológico 10,0 g/L; pH 6,8). Para todos os ensaios a seguir, os fungos foram cultivados em meio mínimo sólido e após 7-10 dias de crescimento eram retirados blocos da cultura de 4 mm de diâmetro, usando “punch” de biopsia e estes usados para inocular vidros estéreis contendo 5 mL de meio mínimo líquido ou sólido que foram incubados a 28^oC no escuro.

4.3 CORANTE TÊXTIL REMAZOL AZUL

Este corante foi fornecido pela empresa DYSTAR e em sua ficha técnica é designado Azul Brilhante Remazol BB 133% gran. e apresenta massa molar teórica de 819 kDa.

4.4 TESTES INICIAIS

4.4.1 Espectrofotometria

Foi realizada uma análise de espectrofotometria de varredura UV-Vis (200-800nm) de uma solução aquosa de 0,1 g/L do corante. Com base neste perfil foram selecionados os comprimentos de onda utilizados nas análises posteriores.

A degradação do corante foi monitorada pela diminuição da absorbância das amostras a 280 e 600 nm, em espectrofotômetro Shimadzu UV-160A UV-VIS, que correspondem aos comprimentos de onda de máxima absorção do corante Remazol Azul. Segundo Knapp *et al.* (1995), quando a degradação ocorre há remoção completa do principal pico de luz visível ou mudanças significativas no espectro de absorbância. Para a análise de culturas líquidas, as amostras foram centrifugadas a 150 rpm durante 5 min (centrífuga Hsiangtai Machinary Ind. Co. Ltda, modelo *MCD*-2000), *e* o sobrenadante retirado para medição. Para a analise de culturas em meio sólido foram realizadas duas extrações com 2 mL de meio de sais durante 30 min, o volume resultante foi centrifugado e o sobrenadante usado para análise.

4.4.2 Triagem inicial do potencial de descoloração dos basidiomicetos

Das placas de Petri com MMS, onde cresceram os fungos, foram retirados blocos de micélio de quatro milímetros de diâmetro usando “punch” de biopsia. Dois blocos foram inoculados em meio mínimo líquido (MML: mesma composição do MMS, exceto pela ausência de ágar bacteriológico) contendo 0,1 g/L de corante. Cada ensaio foi realizado em quadruplicata de amostras e apresenta dois controles não inoculados. Os fungos foram inoculados em meio mínimo líquido e sólido contendo 0,1 g/L de corante. Análise espectrofotométrica foi realizada após 15 ou 30 dias de incubação. As linhagens que causaram descoloração foram utilizadas nos ensaios descritos a seguir.

4.5 CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO AO LONGO DO TEMPO

Frascos contendo 5 mL de MML estéril e 0,1g/L de corante foram inoculados com quatro blocos de micélio e incubados a 28^{o}C no escuro. Nos dias 5^{o}, 7^{o}, 10^{o} e 15º o sobrenadante foi coletado por centrifugação para análise espectrofotométrica e o micélio (sedimento) para determinação da massa celular resultante. O micélio foi seco em estufa a 50º C e posteriormente macerado com pistilo na presença de 250 µL de NaOH 1M e as amostras levadas a banho fervente por 5 min, para melhor

solubilização. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm e o sobrenadante utilizado para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976).

Os dados referentes à descoloração são dados em absorbância relativa, onde o controle sem inóculo apresenta absorbância de 100% e os valores das amostras foram calculados proporcionalmente a este. Quando a absorbância das amostras foi inferior a obtida no controle, esta redução de absorbância foi designada de atividade descorante.

4.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE NO CRESCIMENTO DOS FUNGOS E NO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO

Foram usadas cinco diferentes concentrações do corante (0,1; 0,5; 1; 2 e 5 g/L) em MML. Após 15 dias de incubação, as amostras foram analisadas como descrito anteriormante, tanto para medida de absorbância quanto para a determinação de proteína micelial.

4.7 USO DO CORANTE COMO FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO

Os meios utilizados para a incubação dos fungos foram MML, Meio de sais (MS; mesma composição do MML, porém na ausência de fonte de carbono e nitrogênio), MS com 0,1 g/L de corante, MS com 0,1 g/L de corante e glicose (10 g/L) e MS com 0,1 g/L de corante e nitrato de sódio (5 g/L). Após 15 dias de incubação, o crescimento do micélio foi avaliado pela dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). A medição da absorbância dos sobrenadantes das amostras foi utilizada para inferir a descoloração realizada pelos fungos nos diferentes meios de incubação.

4.8 ANÁLISE DA FRAÇÃO ATIVA RESPONSÁVEL PELA DEGRADAÇÃO – SOBRENADANTE/ELUÍDO OU MICÉLIO

Os fungos foram repicados em frascos contendo 5 mL de MML e MML com 0,1 g/L de corante. Após 30 dias de crescimento, o sobrenadante dos dois meios foi retirado, centrifugado por 5 min a 10.000 rpm. O micélio resultante da incubação ou

1 mL das amostras obtidas foram adicionadas a frascos contendo MML com 0,1g/L de corante, e, após 150 min, foi medida a absorbância destes a 600nm. Como controle, foi realizada a análise no tempo zero.

4.9 ATIVIDADE DESCORANTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Os fungos foram incubados durante 30 dias nos meios: MML, MML acrescido de 0,1 g/L de corante, MMS e MMS acrescido de 0,1 g/L de corante. O material secretado pelo fungo foi extraído do MMS através da adição de 2 mL de meio de sais (MS: MML sem $NaNO_3$ e glicose) durante meia hora de agitação em agitador orbial (CERTOMAT®MO) a 175 rpm, procedimento realizado duas vezes para cada amostra. O sobrenadante do MML e o eluído do MMS foram centrifugados por 5 min a 10.000 rpm. Foi realizado o inóculo de 1 mL do sobrenadante resultado da centrifugação em meio de sais com 0,1 g/L de corante e foi mensurado o espectro de varredura nos tempos: 0, 10, 30, 60, 90 e 120 min.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DESCORANTE EM CONDIÇÕES VARIÁVEIS

Os fungos foram pré-incubados durante 30 dias no meio que apresentou melhor descoloração no experimento anterior. Quando foi utilizado meio sólido, o secretado foi eluído da mesma maneira que no experimento anterior.

4.10.1 Temperatura

A 1 mL de amostra foram adicionados 100 µL de solução de corante 1,1 g/L e a absorbância determinada no tempo zero e após 90 min de incubação. As temperaturas avaliadas foram de 20, 30, 40, 50, 60 e 70°C.

4.10.2 Concentração de sal

A mistura de reação continha 900 µL de amostra 50 µL de solução de corante 1,1 g/L e 150 µL de solução de cloreto de sódio concentrada. As concentrações finais de NaCl avaliadas foram de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 M. A absorbância foi determinada no tempo zero e após 90 min de incubação a 28°C.

4.10.3 pH

O sistema de reação continha 1 mL de amostra, 50 µL de solução corante 1,1 g/L, além de 50 µL de TP fosfato de sódio concentrado. O pH final das amostras variou de 2,5 a 9 em intervalos de 0,5. A absorbância foi determinada no tempo zero e após 90 min de incubação a 28°C.

4.11 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.11.1 Oxidação total do ABTS

A atividade enzimática total foi determinada pelo monitoramento da oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis-(3 etilbenzotiazol-6-sulfonônico)) a 420 nm, em intervalos de 5 min durante 20 min, em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC, segundo metodologia descrita por Machado e Matheus (2006). A mistura de reação continha em 1 mL: 0,25 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; 0,6 mL de extrato enzimático; 0,05 mL de H_2O_2 2 mM e 0,1 mL de ABTS 5 mM. A reação teve início pela adição do ABTS. Uma unidade enzimática (UE) correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de substrato por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado (ε = 36000 $M^{-1}cm^{-1}$).

4.11.2 Lacase

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação de ABTS (MACHADO e MATHEUS, 2006), na ausência e na presença de catalase bovina (48 U/mL - pré-incubação 10 min). Alternativamente, foi avaliada a atividade na presença de azida de sódio 20 mM (DEVECI *et al.*, 2004). Uma unidade enzimática (UE) correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de substrato por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado (ε = 36000 $M^{-1}cm^{-1}$).

4.11.3 Peroxidases totais

A determinação das peroxidases totais foi calculada pela diferença entre a oxidação total do ABTS e a atividade da lacase (EGGERT *et al.*, 1996b)

4.12 PERFIL DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E ZIMOGRAMA

Amostras provenientes de culturas em meio líquido e sólido, na presença e ausência de corante (0,1g/L), após 30 dias de crescimento, foram submetidas à eletroforese desnaturante e atividade enzimática “in gel”.

As condições de eletroforese desnaturante foram aquelas descritas por LAEMMLI (1970). A concentração do gel separador foi de 12% e a do gel concentrador foi de 5%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo as orientações do fabricante (Hoefer), como descrito abaixo.

O tampão de amostra (Tris-HCl 50mM pH 6,8, 100mM de DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v)) foi preparado 2 vezes concentrado. As amostras (140 µL) foram diluídas neste tampão na proporção de 1:1 e submetidas a banho fervente por 5 min. Foram aplicados 200 µL de amostra nos géis para análise do perfil de secreção, 80 µL nos géis para análise do zimograma. Além de 50 µL do padrão de massa molar (Sigma),

diluído 50 vezes, em ambos os géis. O padrão de proteínas continha fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-amilase (14,4 kDa). As corridas foram feitas a 250 V por 3 h em tampão Tris 25 mM, glicina 250mM pH 8,3 e SDS 0,1%.

O gel para análise do perfil de secreção de proteínas foi corado com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987), já o de atividade ""in gel"" foi submetido a 2 lavagens com água destilada durante 20 min cada, seguida de 12 h de incubação com tampão fostato 0,1M pH 6, 1% Triton X-100 à 28°C. Após, foram realizadas três lavagens com MS durante 20 min cada, incubação por aproximadamente 10 min em solução de MS contendo 10g/L de corante; após o gel absorver o corante, foi retirado o excesso de solução e este foi incubado a 28°C por no mínimo 6 h.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata, tanto para amostras quanto para controles. Os dados obtidos foram analisados através do programa ASSISTAT Versão 7.5 beta – 2008 (http://www.assistat.com), pela análise de variância (teste ANOVA), seguido da aplicação do teste Tukey para a comparação das médias. Foram consideradas diferenças significativas entre as variáveis de cada tratamento quando $p<0,01$. Os detalhes dos cálculos realizados podem ser encontrados nos anexos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção do perfil de absorção de luz UV-Vis da solução aquosa do corante Remazol Azul a 0,1g/L foi realizado para a seleção dos comprimentos de onda a serem analisados nos testes de biodegradação. Foi observada a presença de dois picos (Figura 11), um a 280 nm, o qual corresponde à absorbância característica para anéis aromáticos, estruturas comuns em moléculas de corantes. O segundo pico corresponde a 600nm, absorbância correspondente a ligações azo, também presentes na estrutura do corante analisado, o qual foi utilizado para as análises subseqüentes de descoloração.

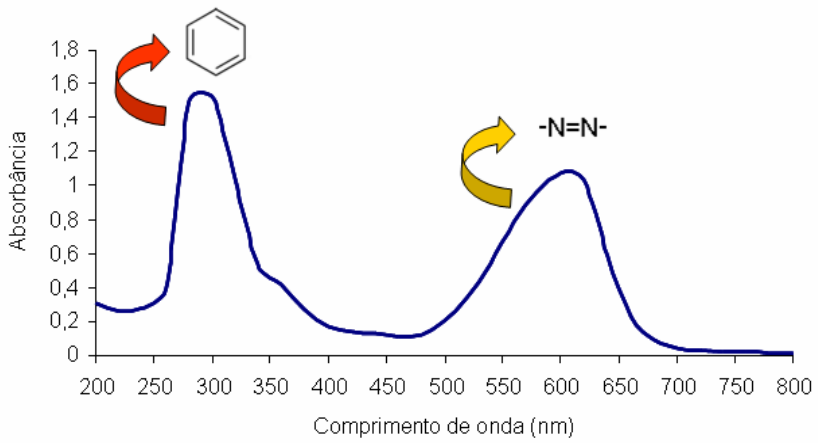


FIGURA 11 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE UMA SOLUÇÃO AQUOSA DO CORANTE REMAZOL AZUL A (0,1g/L), ENTRE 200 E 800 nm. As setas indicam as estruturas observadas em cada comprimento de onda.
FONTE: O autor (2008).

Foi realizada uma triagem inicial de descoloração, a 600 nm, a partir de fungos incubados em MML contendo 0,1g/L de corante para verificar quais as cepas apresentam a capacidade de descorar este corante, nestas condições de crescimento. Tanto *L. crinitus* quanto *L. sordida* apresentaram grande potencial de descoloração deste substrato, aproximadamente 95% e 90% respectivamente, após 15 dias de incubação. Já *H. fimbriatus* não demonstrou esta habilidade, embora o período de incubação do fungo com o substrato tenha sido estendido para 30 dias (Figura 12).

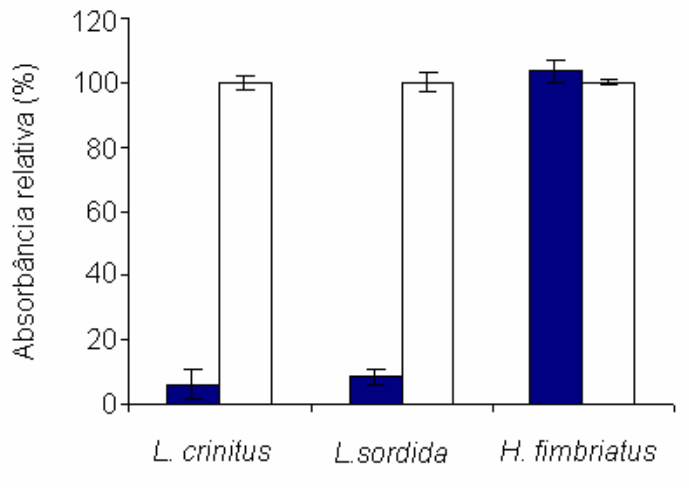


FIGURA 12 – TRIAGEM INICIAL DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL DOS FUNGOS. Absorbância a 600 nm após 15 e 30 dias em meio mínimo contendo 0,1g/L de corante. Controle negativo (□) e amostras (■).
FONTE: O autor (2008).

Com base nos dados obtidos no teste inicial, as cepas de *L. crinitus* e *L. sordida* foram testadas quanto à cinética da descoloração. Os dados encontrados para *L. sordida* descrevem que, até o décimo dia de incubação, este fungo não exerce descoloração significativa no substrato, 8,65% ($p < 0,01$; Anexo 1). Porém, entre o décimo e 15° a descoloração causada pelo fungo chega a quase 100%. Já *L. crinitus* até o quinto dia de incubação não causa descoloração, embora a partir deste ocorra uma perda de cor progressiva e significativa do corante ($p < 0,01$; Anexo 2), tornando-se aproximadamente 100% no 15° dia de análise (Figura 13).

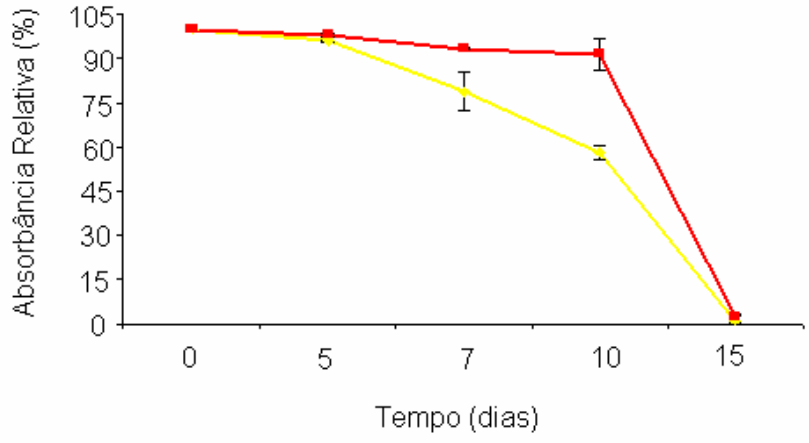


FIGURA 13 – CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL. Valores obtidos em 600 nm após períodos de incubação variáveis a 28°C em MML contendo 0,1g/L de corante. *L. crinitus* (---) e *L. sordida* (---).
FONTE: O autor (2008).

Com relação à cinética de crescimento de *L. crinitus*, observa-se um pequeno crescimento do 5° ao 7° dia (0,6 µg de proteína/ 100µL de amostra), deste ao 10° não foi observado crescimento significativo, este encontra-se ao redor de 0,3 µg de proteína/ 100µL de amostra ($p < 0,01$; Anexo 3). Nos últimos cinco dias de incubação, novamente encontra-se um aumento significativo do micélio, cerca de 1,3 µg de proteína/ 100µL de amostra. Estes dados indicam que o crescimento do micélio não está diretamente atrelado a descoloração, pois a maior taxa de descoloração é encontrada entre o 7° e 15° dia de incubação embora não seja observado um aumento micelial correspondente a esse período. Já *L. sordida* apresenta crescimento significativo a partir do 7° (cerca de 0,7 µg de proteína/ 100µL de amostra), o qual se mantém relativamente constante chegando a 3,7 µg de proteína/ 100µL de amostra no ultimo dia de cultivo. Porém, quanto à descoloração apenas a partir do 10° dia nota-se uma descoloração significativa, aproximadamente 100% ($p < 0,01$; Anexo 4) (Figura 14).

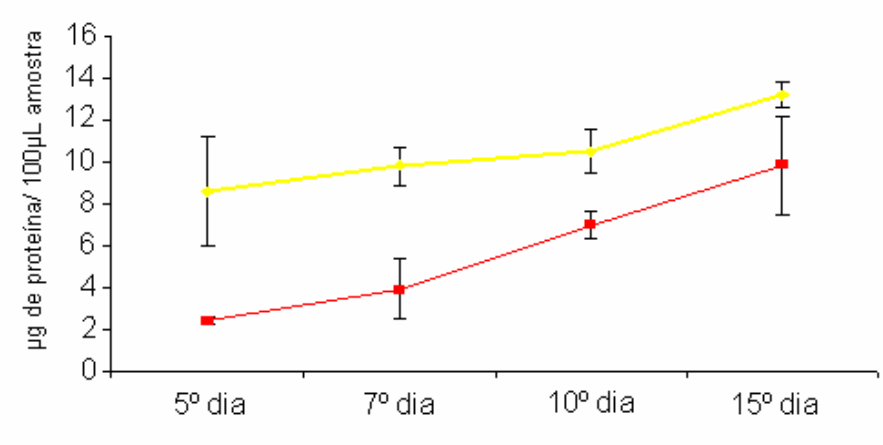


FIGURA 14 – CRESCIMENTO DO MICÉLIO AO LONGO DO TEMPO. Valores obtidos após incubação dos fungos em MML contendo 0,1g/L de corante, a 28°C C *L. crinitus* (---) e *L. sordida* (---) durante 15 dias.
FONTE: O autor (2008).

Após verificar que no 15° dia as duas cepas causam descoloração quase total do substrato analisado, foi verificada a atividade em concentrações crescentes de corante (0,1 a 5 g/L), além de seu efeito sobre o crescimento fúngico. Os resultados indicam que os fungos testados apresentam descoloração ao redor de 95% em até 2 g/L ocorrendo uma redução para a maior concentração testada, 5 g/L. Porém,

apesar desta redução, o efeito de descoloração encontra-se alto, em torno de 75% para *L. crinitus* e 60% para *L. sordida* (Figura 15; Anexos 5 e 6). Na literatura referente à biodegradação de corantes, as concentrações testadas normalmente são inferiores a 0,5 g/L (KNAPP *et al.* 1995, OKINO *et al.,* 2000, DHOUIB *et al.* 2005, MACHADO *et al.* 2005, MACHADO *et al.* 2006). Kapdan *et al.* (2000) ao avaliar a tolerância máxima de *C. versicolor* de descoloração de um Turquoise Blue G descreveu uma descoloração de 100% em concentrações entre 0,1 e 0,25 mg/L (em 3-5 dias) e quase 80% a 0,7-1,2 g/L (em 9 dias).

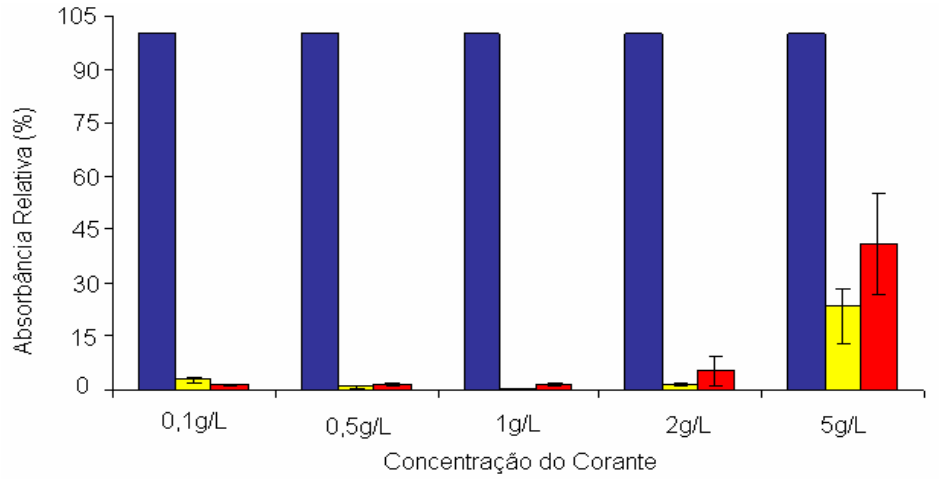


FIGURA 15 – EFEITO DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTE DE CORANTE RAMAZOL AZUL NA ATIVIDADE DESCORANTE. Valores obtidos após 15 dias de incubação em MML contendo concentrações variáveis de corante, à 28°C. Controle (■), *L. crinitus* (■) e *L. sordida* (■).
FONTE: O autor (2008)

Em geral, os fungos basidiomicetos ligninolíticos são capazes de tolerar elevadas concentrações de poluentes orgânicos, o que possibilita a aplicação destes organismos na biorremediação (BARR e AUST, 1994). Porém, a presença de corante inibiu significativamente o crescimento de *L. crinitus*, em cerca de 50%, de maneira independente à concentração analisada ($p < 0,01$; Anexo 7). Já o crescimento de *L. sordida* não é afetado pela presença do corante, porém entre as diferentes concentrações de corante testadas são observadas pequenas flutuações de crescimento (Figura 16, Anexo 8). Com base nestes dados pode-se afirmar que o crescimento do fungo não está diretamente atrelado à atividade descorante.

De maneira similar, Eichlerová *et al.* (2007) concluíram que o crescimento do micélio não esta relacionado a atividade descorante ao avaliar *Bjerkandera adusta*,

dentre outros, quanto a biodegradação de cinco corantes pertencentes a diferentes classes químicas. Obtiveram descoloração de todos os corantes testados, sendo que na maior concentração testada (4g/L) ocorreu redução de descoloração entre 25 e 50% dependendo do corante utilizado.

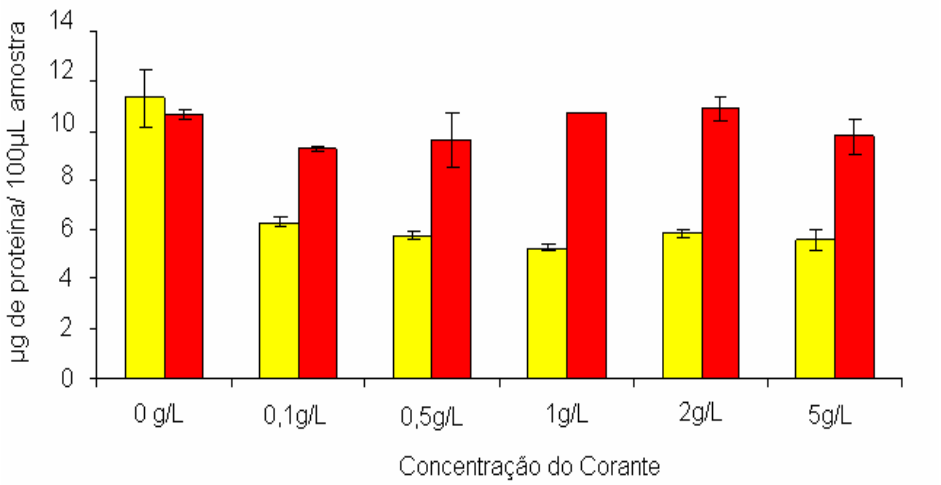


FIGURA 16 – EFEITO DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE CORANTE REMAZOL AZUL NO CRESCIMENTO FÚNGICO. . Valores obtidos após 15 dias de incubação à 28°C em MML contendo concentrações variáveis de corante. *L. crinitus* (■) e *L. sordida* (■).
FONTE: O autor (2008)

Os resultados referentes à utilização do corante como fonte de carbono e nitrogênio para crescimento do fungo (Figura 17) indicam que é possível que *L. sordida* utilize o corante como fonte de nitrogênio, neste caso, único tratamento onde ocorreu indução significativa do crescimento, o qual duplicou ($p < 0,01$; Anexo 9). Nas demais condições testadas foram observadas inibições significativas do crescimento quando comparado ao meio que apresenta fonte de carbono e nitrogênio (MML). Porém, o crescimento não apresentou alterações significativas entre eles e quando comparado ao crescimento obtido no MS o qual decorre da presença de MMS do inóculo, visto que este meio apresenta fonte de carbono e nitrogênio, nutrientes essenciais para o desenvolvimento do microrganismo.

Já os dados encontrados para *L. crinitus* indicam que não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, os poucos nutrientes contidos nos blocos de micélio podem ter mascarado os resultados obtidos para as condições a serem avaliadas. Provavelmente, tempos maiores de incubação permitiriam atingir tal objetivo (Figura 17, anexo 10).

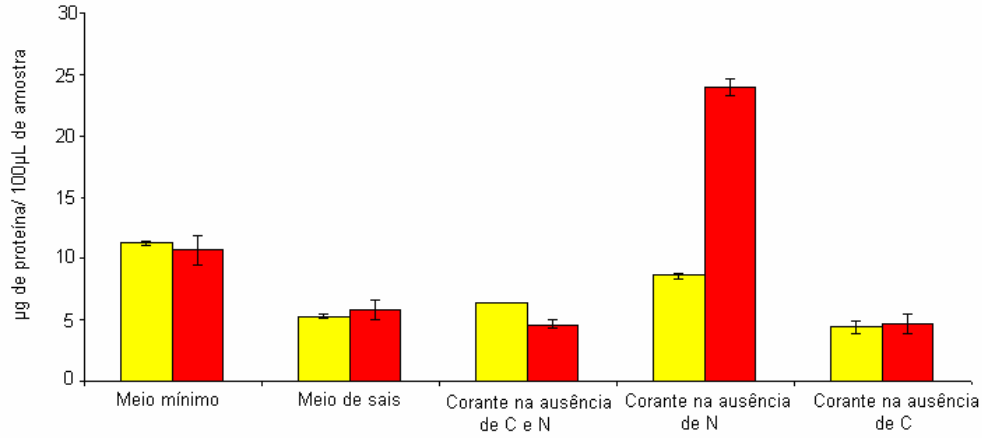


FIGURA 17 – UTILIZAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL COMO FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA CRESCIMENTO FÚNGICO. Valores obtidos após 15 dias de incubação a 28°C em diferentes meios de cultivo. *L. crinitus* (■) e *L. sordida* (■).
FONTE: O autor (2008)

Quando comparada a utilização do corante como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento do micélio com o potencial de descoloração nos meios testados (Figura 18), os resultados corroboram com os dados obtidos na análise de descoloração em concentrações crescentes de corante, e novamente, indicam que a produção da atividade descorante pode não estar atrelada ao crescimento do microrganismo. É possível observar que *L. crinitus* é capaz de realizar descoloração quase total, independente da presença/ausência tanto de carbono quanto de nitrogênio, sendo que as diferenças de descoloração entre os meios não são significativas ($p < 0,01$, Anexo 11).

Já quando analisado *L. sordida* nota-se que na presença de carbono, nitrogênio ou de ambos a descoloração é em torno de 90%. A indução do crescimento obtido no meio que apresenta carência de fonte de nitrogênio não altera o perfil de descoloração. Porém, para que este possa realizar uma eficiente descoloração é necessário que o meio de cultivo apresente pelo menos uma das fontes analisadas. Na ausência de ambos ocorreu uma redução de descoloração para aproximadamente 50%, significativamente distinto dos demais meios testados ($p < 0,01$; Anexo 12).

A relação entre as fontes de carbono e nitrogênio no meio de crescimento de fungos de podridão branca desempenham um papel fundamental na descoloração de efluentes industriais (D'SOUZA-TICLO *et al.*, 2006). Com base nos resultados

obtidos pode-se inferir que o a descoloração realizada por *L. sordida* é mais sensível à ausência deste nutrientes do que a observada em *L. crinitus*.

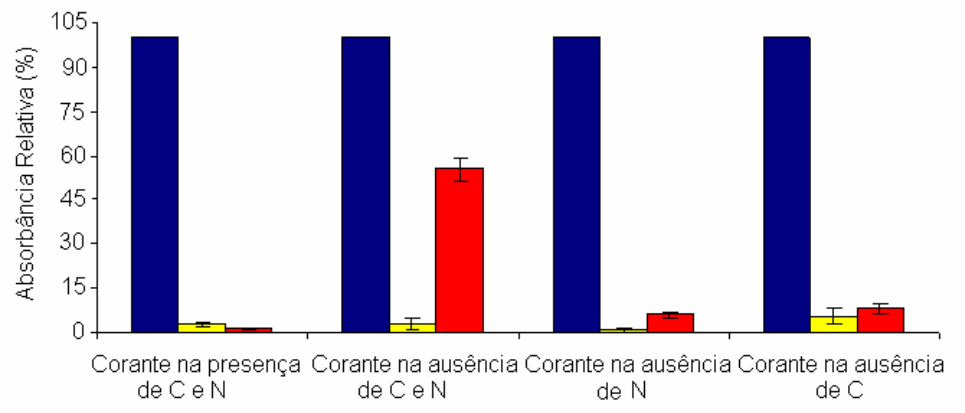


FIGURA 18 – PERFIL DE DESCOLORAÇÃO OBTIDO A PARTIR DA UTILIZAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL COMO FONTE DE CARBONO, NITROGÊNIO E CARBONO/NITROGÊNIO. Dados obtidos para 600nm, após 15 dias de incubação a 28°C, em diferentes meios de cultivo. Controle (■), *L. crinitus* (■) e *L. sordida* (■).
FONTE: O autor (2008)

Para a análise da fração ativa responsável pela descoloração do substrato foi determinada a atividade descorante realizadas por sobrenadantes de culturas líquidas bem como por micélios. Embora já tenha sido descrito que estas enzimas normalmente são secretadas (WESENBERG *et al.,* 2003; CAVALLAZZI *et al.,* 2004), também existem relatos que as enzimas envolvidas neste processo possam estar associadas à membrana do micélio (YESILADA *et al*., 2002; SVOBODAVÁ *et al.*, 2008).

Com relação à fração ativa responsável pela descoloração realizada por *L. crinitus*, o sobrenadante proveniente da incubação em MML na presença/ausência de corante, é o único responsável pela atividade descorante de aproximadamente 85% observada tanto a 280 nm (Figura 19A), quanto a 600 nm (Figura 19B). O micélio realiza descoloração de cerca de 15% porém, esta descoloração não se apresenta significativa quando comparada a realizada pelo sobrenadante das culturas ($p < 0,01$; Anexo 13). O sobrenadante proveniente de pré-incubação em MML, contendo corante, apresenta padrão de descoloração similar ao realizado na ausência de corante na pré-incubação. Quando se analisa a descoloração a 280 nm causada pelo micélio pré-incubado com corante, não é encontrada descoloração, já em 600 nm a descoloração é, novamente, similar ao MML.

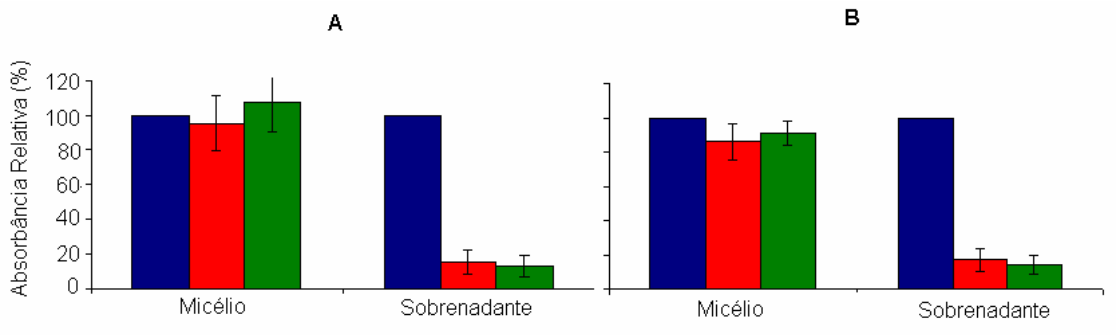


FIGURA 19 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL OBTIDA EM 280 E 600nm A PARTIR DO SOBRENADANTE E MICÉLIO DE MEIOS DE CULTIVO DE *L. crinitus.* . O gráfico representa os valores obtidos a 280nm (A) e 600nm (B). Valores registrados após 90 min de incubação a 28°C de frações obtidas a partir de MML (■) e MML com 0,1g/L de corante (■), Controle (■).
FONTE: O autor (2008)

Em *L. sordida*, novamente o sobrenadante é o principal responsável pela atividade descorante observada tanto a 280 nm (cerca de 90%, Figura 20A) quanto a 600 nm (cerca de 80%, Figura 20B). O micélio desta cepa também apresenta capacidade de realizar descoloração. Este, quando incubado em MML contendo corante realiza descoloração, tanto a 280 nm quanto a 600 nm, de 50% e 38% respectivamente. Já quando o fungo é incubado na ausência de corante pode-se observar apenas em 600 nm um pequeno efeito descorante de aproximadamente 20% ($p < 0,01$; Anexo 14).

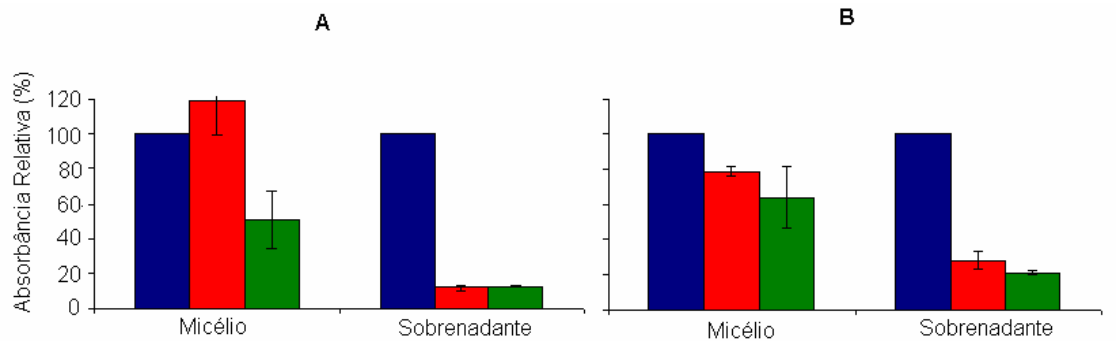


FIGURA 20 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL OBTIDA EM 280 E 600nm A PARTIR DO SOBRENADANTE E MICÉLIO DE MEIOS DE CULTIVO DE *L. sordida*. . O gráfico representa os valores obtidos a 280nm (A) e 600nm (B). Valores registrados após 90 min de incubação a 28°C de frações obtidas a partir de MML (■) e MML com 0,1g/L de corante (■), Controle (■).
FONTE: O autor (2008)

Considerando que foi verificada a presença majoritária da atividade descorante nas frações de secreção dos fungos, foi então analisado se a expressão desta é alterada pelas condições de crescimento (meio sólido, líquido e presença/ausência de corante). Existem relatos na literatura que demonstram atividade diferenciada de descoloração do mesmo microrganismo quando incubado em diferentes meios de cultivo. Chagas e Durrant (2001) avaliaram a degradação de quatro corantes azóicos por *P. chrysosporium* e *Pleorotus sajor-caju* tanto em meio de cultivo líquido quanto sólido. Obtiveram para a primeira cepa uma descoloração parcial de todos os corantes em meio sólido, já em meio líquido descoloriu totalmente três destes corantes e um parcialmente. Já *P. sajor-caju*, em meio sólido descoloriu totalmente três dos corantes testados, não apresentando efeito nenhum sobre o outro, e em meio líquido descoloriu totalmente dois deles, e parcialmente os outros dois. Segundo Novotný *et al.*, (2004) o fungo *Irpex lacteus* cultivado em meio sólido exibe aumento de 380 e 2 vezes na produção de MnP e Lac, respectivamente, quando comparado aos resultados obtidos para cultivo em meio líquido.

Pode-se observar que em todos os meios de incubação *L. crinitus* foi capaz de realizar a descoloração do corante, porém a taxa de descoloração diferiu entre eles corroborando com o fato de que estas enzimas são expressas de maneira distinta de acordo com o meio de pré-incubação (Figura 21). Os meios que apresentaram maior descoloração foram MML, MML com corante e MMS com corante os quais apresentam descoloração ao redor de 85% a 280 nm e em torno de 80% em 600nm, os resultados obtidos para estes meios não apresentam diferenças significativas entre eles. Já o MMS, na ausência de corante, apresentou redução significativa da atividade descorante para ambos os comprimentos de onda testados, embora se apresente eficiente cerca de 70% em 280 nm e 50% para 600 nm ($p < 0,01$; Anexo 15 e 16, respectivamente).

Nos resultados encontrados para *L. sordida* (Figura 22) fica evidenciada uma atividade descorante diferenciada para diferentes meios de cultivo. Os meios com maiores atividades descorantes foram os meios líquidos, independente da presença/ausência de corante, os quais apresentaram descoloração ao redor de 78% em 280 nm e 50% em 600 nm, e entre elas não são encontradas diferenças significativas ($p < 0,01$; Anexo 17 e 18, respectivamente). Já os meios sólidos com e sem corante apresentam uma drástica redução da atividade descorante, a qual

atinge apenas 15% para MMS e somente 1% para MMS com corante, tanto para 280 quanto para 600 nm, valores não significativos em relação ao corante. Porém, apesar deste resultado negativo, foi observado durante a pré-incubação descoloração do MMS na presença de corante (Figura 23). O que indica que este fungo não secreta as enzimas responsáveis pela atividade descorante quando cultivado em meio sólido, podendo estas ser intracelulares, associadas ao micélio ou imobilizadas no meio de cultivo.

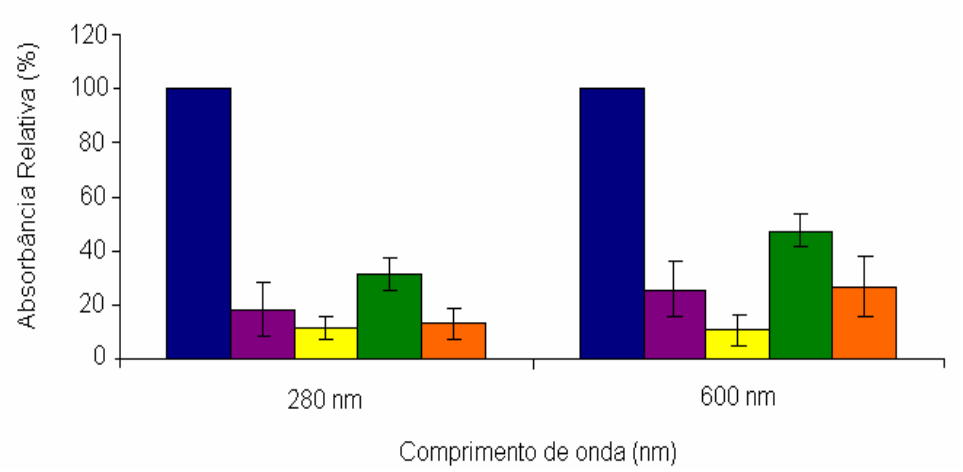


FIGURA 21 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL OBTIDA A PARTIR DO SOBRENADANTE E/OU ELUÍDO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO DE *L. crinitus.* Valores obtidos após 90 min de incubação, a 28°C de amostras coletadas a partir de culturas em MML (■), MML com 0,1g/L de corante (■), MMS (■) e MMS com 0,1g/L de corante (■), controle (■).
FONTE: O autor (2008)

Similarmente, Svobodavá *et al.* (2007) relataram a descoloração de “Remazol Brilliant Blue R” e “Reactive Orange 16” realizada por *Irpex lacteus*, e descreveram uma lacase associada a membrana do micélio como a principal responsável pelo efeito descorante. Yesilada *et al*. (2002) avaliaram a descoloração do corante básico “Astrazon Vermelho FBL” por pellets retirados de culturas do fungo *Funalia trogii*. A remoção da cor ocorreu de maneira rápida, sendo que 72% ocorreu dentro de 2 h e a máxima descoloração no prazo de 24 h. Porém, neste caso os autores indicam que o processo de descoloração envolve adsorção inicial do corante, seguida de metabolização e por conseqüência descoloração do substrato.

Embora nos testes anteriores (realizados em MML) o fungo *H. fimbriatus* não apresentou atividade descorante tendo Remazol Azul como substrato, este foi testado para a análise de seu potencial de descoloração em MMS. Os resultados obtidos relativos à atividade descorante do secretado em diferentes meios foram

todos negativos, não sendo observadas diferenças significativas entre eles e com o controle (Figura 24, $p < 0,01$; Anexo 19 e 20, respectivamente). Porém, apesar deste resultado negativo, foi observado durante a pré-incubação descoloração do MMS na presença de corante (Figura 25). O que indica que este fungo não secreta as enzimas responsáveis pela atividade descorante, ou estas podem estar imobilizadas no meio de cultivo.

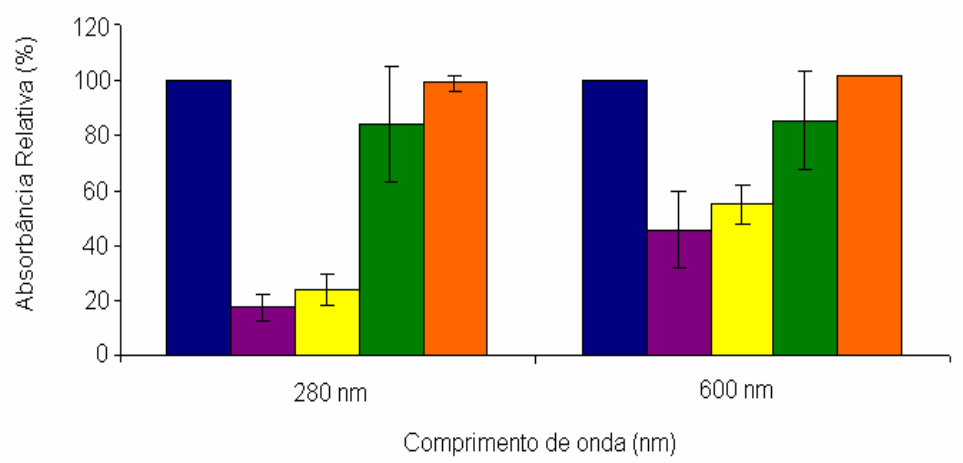


FIGURA 22 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL OBTIDA A PARTIR DO SOBRENADANTE E/OU ELUÍDO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO DE *L. sordida.* Valores obtidos após 90 min de incubação, a 28°C de amostras coletadas a partir de culturas em MML (■), MML com 0,1g/L de corante (■), MMS (■) e MMS com 0,1g/L de corante (■), controle (■).
FONTE: O autor (2008)

FIGURA 23 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL REALIZADA POR *L. sordida* EM MEIO SÓLIDO. O gráfico ilustra a descoloração após 30 dias de incubação em MMS com 0,1g/L de corante, na presença (direita) e na ausência do fungo (esquerda).

Baseado nos resultados obtidos para a atividade descorante em diferentes meios, foi determinado o meio de incubação a ser analisado nos ensaios de pH, temperatura e estabilidade ótimas. Para *L. crinitus* o meio escolhido foi MMS contendo corante, já para *L. sordida*, MML. Como em *H. fimbriatus* a atividade descorante não se encontra no secretado/eluído dos diferentes meios, este não foi testado.

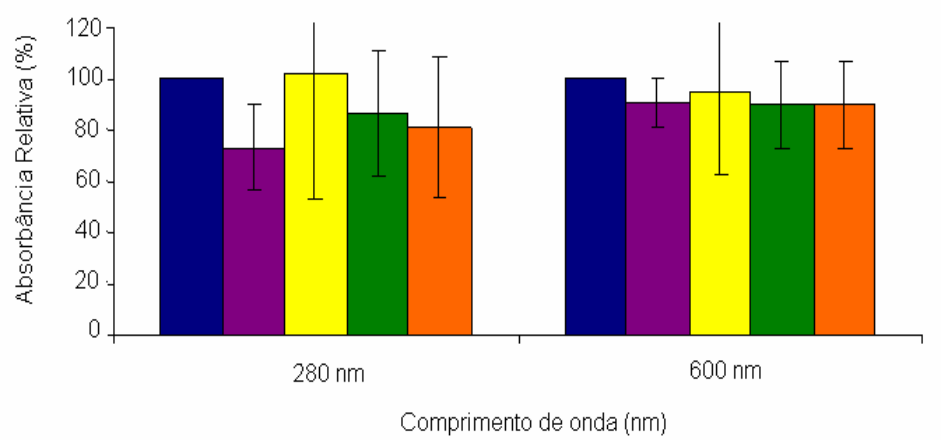


FIGURA 24 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL OBTIDA A PARTIR DO SOBRENADANTE E/OU ELUÍDO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO DE *H. fimbriatus.* Valores obtidos após 90 min de incubação, a 28°C de amostras coletadas a partir de culturas em MML (■), MML com 0,1g/L de corante (■), MMS (■) e MMS com 0,1g/L de corante (■), controle (■).
FONTE: O autor (2008)

FIGURA 25 – DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL REALIZADA POR *H. fimbriatus* EM MEIO SÓLIDO. O gráfico ilustra a descoloração após 30 dias de incubação em MMS com 0,1g/L de corante, na presença (direita) e na ausência do fungo (esquerda).
FONTE: O autor (2008)

Considerando os resultados obtidos para descoloração em diferentes meios de cultivo foi construída uma tabela com os valores de descoloração em unidade descorante (UD), ou seja, µmol de substrato descorado por minuto (Tabela 7). Os valores obtidos demonstram que para *L. crinitus* o meio que apresenta maior mUD, tanto a 280 nm quanto a 600 nm, é o MML contendo 0,1g/L de corante, com aproximadamente 1,29 e 0,57 mUD, respectivamente. Seguido do MMS contendo corante com 1,09 mUD (280 nm) e 0,46 (600 nm). Em *L. sordida* os meios que apresentam maiores unidades descorantes foram o MML contendo corante a 280 nm (1,4 mUD) e em 600 nm foi o MML com cerca de 0,36 mUD. Já em *H. fimbriatus*, embora não sejam observadas diferenças significa na atividade descorante pode-se observar no MML 0,31 mUD a 280 nm, o maior valor obtido para esta cepa.

TABELA 6 - ATIVIDADE DESCORANTE EM EXTRATOS SOLÚVEIS DAS CULTURAS DE FUNGOS

	mUD*/mL de amostra	
Fungo – Meio	280 nm	600 nm
L. crinitus - MML + COR	1,5928	0,5726
L. crinitus – MML	0,9215	0,4631
L. crinitus – MMS	0,6339	0,313
L. crinitus - MMS + COR	1,0943	0,4628
L. sordida – MML	1,1396	0,3578
L. sordida - MML + COR	1,4132	0,3028
L. sordida – MMS	0,201	0,1014
L. sordida - MMS + COR	0,0129	0
H. fimbriatus - MML	0,3165	0,0742
H. fimbriatus - MML + COR	0	0,072
H. fimbriatus - MMS	0,1484	0,0628
H. fimbriatus - MMS + COR	0,2196	0,0549

NOTA: * Unidade descorante - µmol de substrato descorado por min.

A descoloração causada pelo eluído de *L. crinitus* apresenta-se relativamente estável a variações de temperatura tanto a 280 nm quanto a 600 nm, os padrões de descoloração observados são similares para ambos os comprimentos de onda. Até 50°C a descoloração obtida encontra-se ente 73% e 93%, a descoloração máxima observada a 280 nm foi aproximadamente 90% a 30°C e para 600 nm esta foi de cerca de 93% a 40°C. A partir de 50°C a descoloração sofreu redução atingindo em torno de 64% nos dois comprimentos de onda, embora ainda se mantenha alta (Figura 26A).

Já em *L. sordida,* quando o sobrenadante é submetido a diferentes temperaturas, o perfil obtido é variável entre os comprimentos de onda, mantendo-se estável a 280 nm em todas as temperaturas testadas, indicando que a temperatura pouco afeta a quebra do anel aromático. Já o perfil obtido para 600 nm indica a suscetibilidade da atividade de ruptura da ligação azo a temperatura, sendo 20°C, 30°C e 60°C as temperaturas onde ocorre maior atividade de quebra e conseqüentemente maior descoloração. Após a análise dos dados, é possível sugerir que para *L. sordida* a atividade de quebra das duas estruturas apresentam sensibilidade diferente a temperatura ou ainda que este trabalho possa ser realizado por componentes fúngicos independentes (Figura 26B).

Šnajdr e Baldrian (2007) avaliaram o crescimento de *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor* e a produção de enzimas lignolíticas em diferentes temperaturas. A temperatura ótima encontrada para atividade enzimática de Lac é de 50 e 55°C para *P. ostreatus* e *T. versicolor*, respectivamente. A 10°C a produção enzimática é pequena, somente 3,9 e 3,6% da atividade máxima obtida para *P. ostreatus* e *T. versicolor*, respectivamente. No presente trabalho, a menor temperatura testada, 20°C, apresenta grande descoloração o que indica que a atividade descorante é resistente a flutuações de temperatura, o que pode ampliar a possibilidade de aplicação industrial.

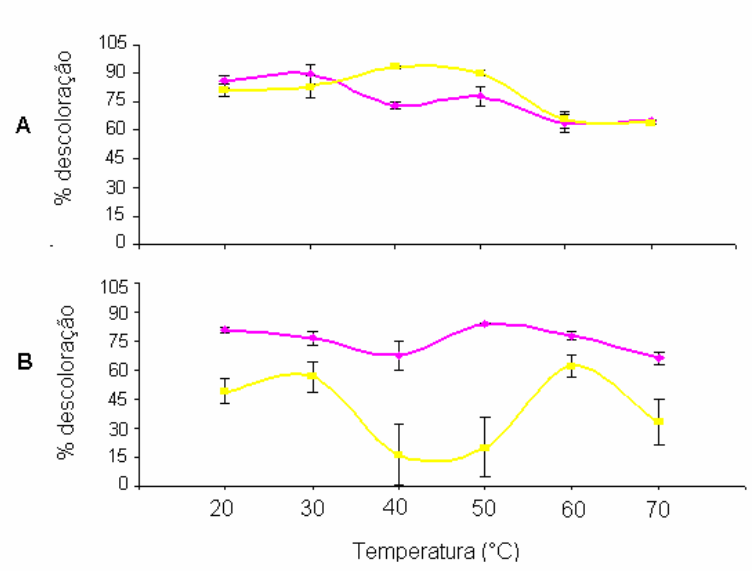


FIGURA 26 – DESCOLORAÇÃO DO SUBSTRATO E VARIAÇÃO DA TEMPERATURA. Frações solúveis de *L. crinitus* (A) e *L. sordida* (B) crescidos em MMS contendo 0,1g/L de corante e MML, respectivamente foram inoculados em solução de corante com concentração final de 0,1g/L e a porcentagem de descoloração determinada através da absorbância a 280nm (---) e 600nm (---).
FONTE: O autor (2008)

Com relação à atividade descorante obtida em soluções de concentração de sal variável, o eluído de *L. crinitus* a 280 nm apresenta melhor descoloração em concentração salina ao redor de 0,1M a qual chega a aproximadamente 93%. Para as demais concentrações testadas observa-se uma redução nos valores de descoloração obtidos, entre 12 e 30%. Já a atividade descorante desta cepa em 600 nm a 0,05M de sal acarreta no mais alto nível de descoloração do substrato, cerca de 50%, e em concentrações salinas maiores esta é reduzida mantendo-se entre quatro e 12%, chegando à zero na maior concentração testada (Figura 27A).

Já o sobrenadante de *L. sordida* apresenta a 280 nm e a 600 nm um padrão similar de descoloração. A qual se apresenta alta e com pequenas flutuações até 0,2M de sal, nesta concentração encontra-se a maior descoloração, em torno de 70%. A partir desta concentração ocorre uma redução gradativa para até 8% de descoloração a 280 nm e 25% para 600 nm (Figura 27B). Os dados indicam que a atividade de ruptura das duas estruturas apresenta a mesma sensibilidade a diferentes forças iônicas.

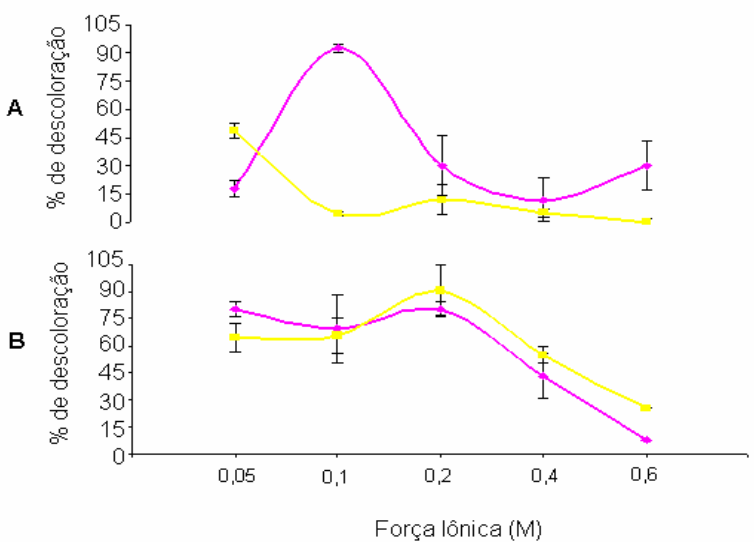


FIGURA 27 – DESCOLORAÇÃO DO SUBSTRATO E VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE SAL. Frações solúveis de *L. crinitus* (A) e *L. sordida* (B) crescidos em MMS contendo 0,1g/L de corante e MML, respectivamente, foram inoculados em solução de corante com concentração final de 0,1g/L e a porcentagem de descoloração determinada através da absorbância 280nm (---) e 600nm (---).
FONTE: O autor (2008)

Com relação à estabilidade do secretado a diferentes pHs, em *L. crinitus* a atividade de quebra do anel aromático (280nm) apresenta grande estabilidade

porém, são encontrados dois pontos de menor atividade ao redor dos pHs 3 e 8,5. A atividade de quebra da ligação azo (600nm) também se apresenta estável, porém drasticamente reduzida em pHs ao redor de 5,5 - 6 e a partir de pH 8 (Figura 28A). *L. sordida* apresenta um perfil de atividade semelhante ao de *L. crinitus*, porém as menores atividades a 600 nm são encontradas na faixa entre 5,5 e 6,5. Já a 280 nm são observadas pequenas diminuições de atividade em pHs próximos a 2,5 e 4,5 (Figura 28B).

As enzimas lignolíticas normalmente demonstram atividade máxima em baixos pHs, porém também é observada uma eficiente descoloração de corantes têxteis em pHs altos. Kapdan *et al.* (2000) descreveram 99% de eficiência de descoloração de *C. versicolor* sobre o corante "Turquoise Blue G" em pH 4,5 a qual caiu para 50% em pHs 6 e 7. "Antrazon Red FBL" foi facilmente descolorido em todos os pHs entre 6 e 11 pelo fungo *Funalia trogii* (YESILADA *et al.*, 2002). Contudo, pHs baixos não são adequados para o tratamento de águas residuárias e, portanto cepas que apresentam estabilidade de descoloração a diferentes pHs são importantes para uso em aplicações industriais (KAUSHIK e MALIK, 2008).

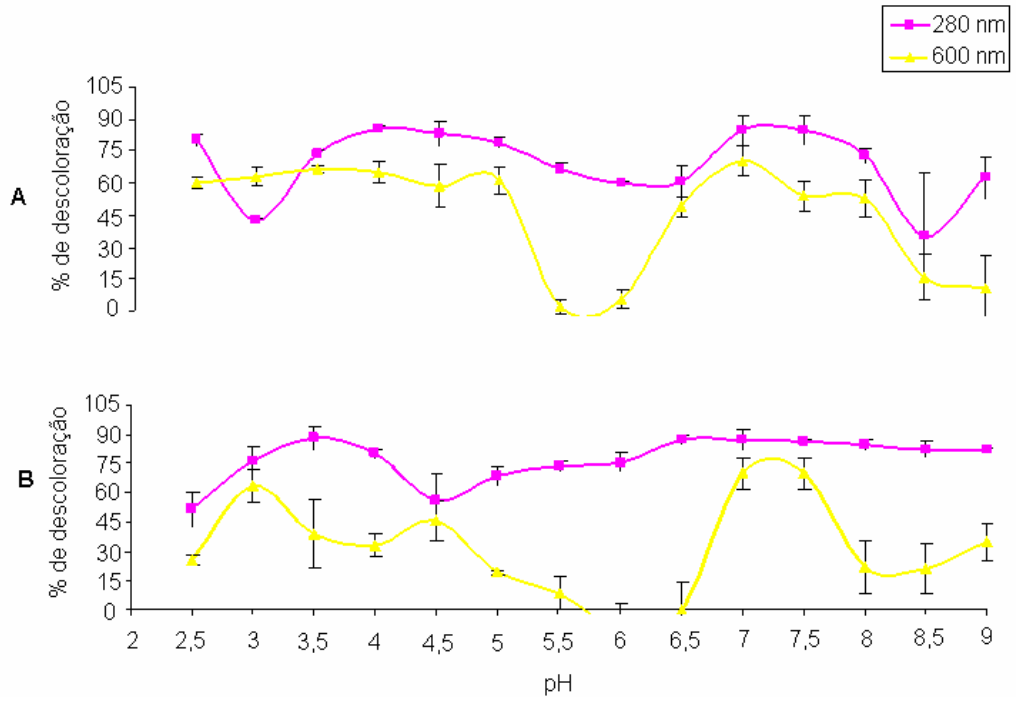


FIGURA 28 – DESCOLORAÇÃO DO SUBSTRATO E VARIAÇÃO DO PH . Frações solúveis de *L. crinitus* (A) e *L. sordida* (B) crescidos em MMS contendo 0,1g/L de corante e MML, respectivamente foram inoculados em solução de corante com concentração final de 0,1g/L e a porcentagem de descoloração determinada através da absorbância a 280nm (---) e 600nm (---).
FONTE: O autor (2008)

A seguir, foi investigada a presença de enzimas lignolíticas nos extratos solúveis das culturas através da oxidação do ABTS, substrato tanto de peroxidases quanto fenoloxidases (Figura 29). O eluído de *L. sordida*, quando analisado aos 10 min, apresenta 0,35 mUE, o secretado de *L. crinitus* apresenta 0,47 mUE e o *Pleorotus ostreatus* 0,11 mUE, o qual foi utilizado como controle positivo, pois já existem relatos da produção de enzimas lignolíticas por este microrganismo (MACHADO e MATHEUS, 2006). Os resultados indicam que estas cepas secretam enzimas lignolíticas.

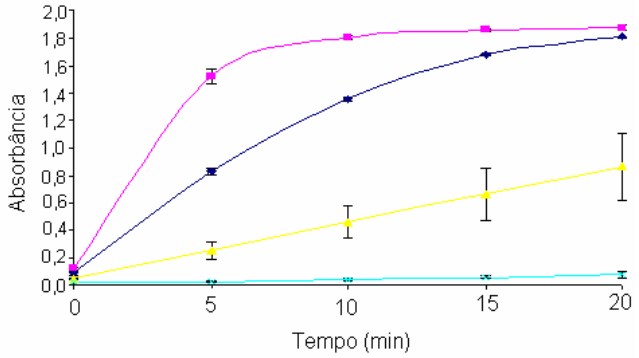


FIGURA 29 – CURVA DE OXIDAÇÃO TOTAL DO ABTS. A absorbância medida em 420 nm a cada 5 min durante 20 min, após incubação de 30 dias a 28°C. Controle negativo (---), *P. ostreatus* (controle positivo, ---), *L. sordida* (---) e *L. crinitus* (---).
FONTE: O autor (2008)

Para a análise da participação da lacase nesta atividade foi, novamente, realizado o teste de oxidação do ABTS, sem a adição de H_2O_2 e ou na presença de catalase para excluir a atividade de possíveis peroxidases. O perfil obtido foi similar ao descrito para a oxidação total de ABTS (Figura 30A), o que indica que a maior parte desta oxidação pode ser decorrente da atividade de lacase.

Para a confirmação de que a maior parte da atividade obtida é decorrente da atividade de lacase o ensaio de oxidação do ABTS foi repetido na presença de azida de sódio, um inibidor conhecido desta. A pré-incubação com catalase não alterou o perfil obtido anteriormente (Figura 30B), indicando que os extratos avaliados não

continham H_2O_2, o qual consiste em substrato para as peroxidases, ou apresentam quantidades irrisórias que não alteram este perfil.

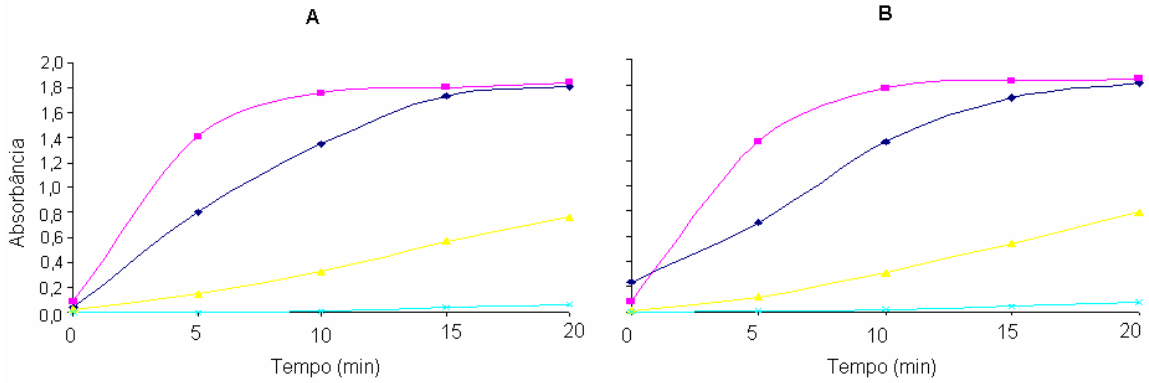


FIGURA 30 – A ABSORBÂNCIA FOI MEDIDA EM 420 NM A CADA 5 MIN DURANTE 20 MIN. Controle (---), *P. ostreatus* (controle positivo, ---), *L. sordida* (---) e *L. crinitus* (---), na ausência (A) e na presença (B) de catalase.
FONTE: O autor (2008)

A atividade de lacase, tanto de *L. crinitus* quanto de *L. sordida*, mensurada na presença de azida de sódio demonstra que a presença desta inibe a oxidação do ABTS, bem como a atividade descorante (Figuras 31 e 32, A e B, respectivamente), sugerindo a possibilidade destas cepas produzirem lacase. Em *L. crinitus*, a descoloração na ausência de azida de sódio é de 83% e, na presença desta, a descoloração é reduzida para cerca de 26%, indicando que embora a lacase possa ser a responsável pela maior parte da descoloração encontrada (57%), outras enzimas também participariam do processo. Em *L. sordida*, a descoloração na ausência do inibidor foi de quase 100%, esta foi reduzida para aproximadamente 9% quando pré-incubado com azida de sódio.

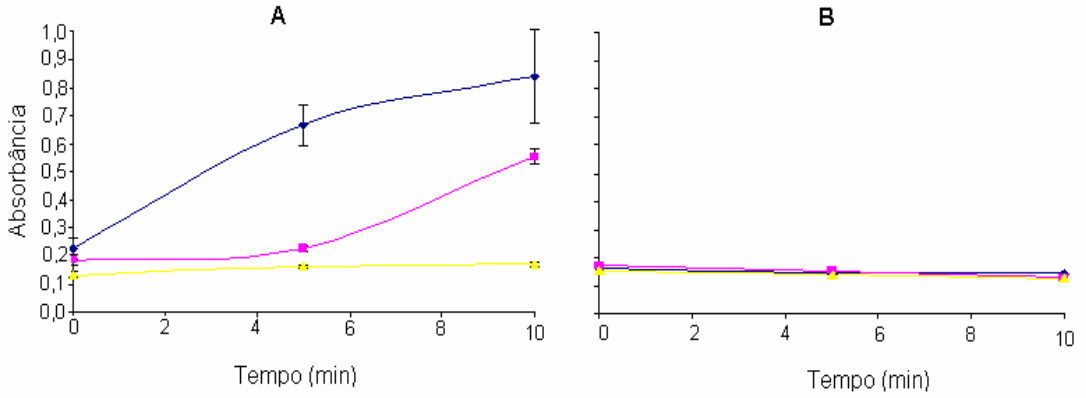


FIGURA 31 – CURVA DE ATIVIDADE DE LACASE, A Absorbância foi medida em 420 nm a cada 5 min durante 20 min. na ausência (A) e na presença (B) de azida de sódio. Controle (---), *L. sordida* (---) e *L. crinitus* (---).
FONTE: O autor (2008)

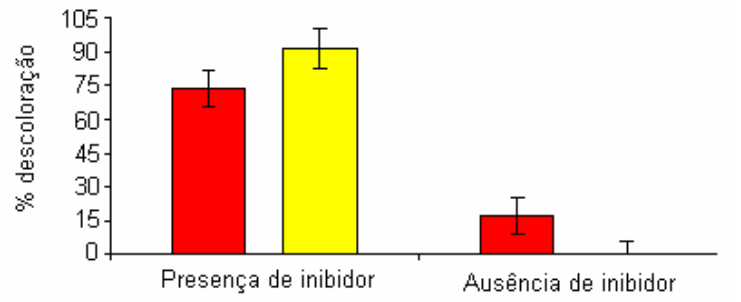


FIGURA 32 – ATIVIDADE DESCORANTE DE EXTRATOS SECRETADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE AZIDA DE SÓDIO. A absorbância foi medida em 600 nm após incubação, de frações solúveis das culturas de fungos, por 90 min em MML com 0,1g/L de corante. As amostras testadas com azida de sódio foram pré-incubadas com 20 mM do inibidor por 10 min., controle (■), *L. crinitus* (■) e *L. sordida* (■).
FONTE: O autor (2008)

A determinação das peroxidases totais foi realizada pela diferença entre a oxidação total do ABTS e a atividade da lacase (EGGERT *et al.*, 1996b). Os resultados obtidos indicam que *L. crnitus* não produz peroxidades; já *L. sordida* apresenta a produção de 0,0035 mUE, valor correspondente à atividade enzimática total das peroxidases, corroborando com os resultados descritos para a atividade descorante na ausência/ presença de azida de sódio.

Nozaki *et al.* (2008) investigaram a descoloração de 27 tipos de corantes pertencentes a diversas classes químicas (Monoazo, Diazo, Trifenilmetano, Ftalocianina) realizada por extratos secretados de 21 basidiomicetos. Os autores observaram com relação à atividade de enzimas lignolíticas, resultados positivos apenas oxidação total do ABTS, porém nenhuma atividade de LiP e MnP, o que

sugere que a descoloração pode ser decorrente da atividade de Lac ou outras peroxidases envolvidas na degradação da lignina.

As fontes de carbono e nitrogênio no meio de crescimento de fungos de podridão branca desempenham um papel fundamental na quantidade e tipo de enzimas degadadoras de lignina produzidas, além de interferir na descoloração de efluentes industriais (D'SOUZA-TICLO *et al.*, 2006), indicando que os meios utilizados nos testes de atividade de lacase são eficientes para a produção desta.

Segundo Hoshida *et al*. (2005) a atividade de lacase produzida por *Pycnoporus coccineus* (expressas em A*spergillus oryzar* e *Saccharomyces cerevisiae*) aumentou com o aumento da concentração de cobre (de 0 a 0,1 mM), indicando que a concentração de cobre é um dos fatores importantes para a produção eficiente de enzimas que contém cobre em sua estrutura. De maneira similar, Dittmer *et al.* (1997) descreveram que o fungo *P. chrysosporium* produz lacase em meio de crescimento contendo glucose, altas concentrações de nitrogênio (24 mM) e de cobre (0,4mM de $CuSO_4$). Os autores indicam que o cobre pode induzir a produção de lacase quando glucose é utilizada como fonte de carbono, porém nem LiP nem MnP foram detectadas. Tendo como base os dados descritos acima, pode-se inferir que a quebra da molécula do corante utilizado neste trabalho pode causar a liberação de cobre o que pode estar induzindo a produção de lacase ativa.

Tentou-se correlacionar a atividade descorante e a expressão de proteínas nas diferentes condições de cultura avaliando o zimograma e o perfil de separação de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante. O perfil de secreção de proteínas de *L. crinitus* esta mostrado na Figura 32A.

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que tanto a expressão de proteínas quanto a atividade são drasticamente alteradas pelas condições de cultura. A atividade no zimograma é encontrada nas linhas 3, 5, 6 e 7 em maior grau, e quando comparado ao perfil de secreção de proteínas, pode-se observar um alinhamento desta descoloração com as bandas marcadas com setas no gel, as quais correspondem a proteínas com 41 kDa. Estas bandas correspondem a pré-incubações em MML, porém nas linhas 1 e 3 nem as bandas, nem no zimograma foram detectadas. Como a descoloração é mais intensa nas linhas 5 a 7, possivelmente a expressão desta enzimas é aumentada pela presença de corante no meio de cultivo. Nota-se, também, uma pequena atividade descorante realizada

por *L. crinitus* quando incubado em MMS contendo corante, na mesma altura da descoloração encontrada em MML. Porém esta não se encontra alinhada à nenhuma banda presente no gel A, que pode ser decorrente da pequena distorção encontrada no perfil de secreção de proteínas, decorrente da corrida das amostras no gel. Comparando esses resultados ao teste de atividade de lacase, é possível sugerir que esta banda corresponde a uma lacase e a massa molar obtida é correspondente a encontrada em MML, 41 kDa, corroborando com a faixa de massa molar encontrada para lacases de diferentes microrganismos, como descrito a seguir. Para *L. sordida* os ensaios de atividade em gel não revelaram nenhuma banda ativa, ainda, não foi possível correlacionar a expressão de proteínas com as condições de cultura devido à mínima quantidade de proteína encontrada nos extratos solúveis.

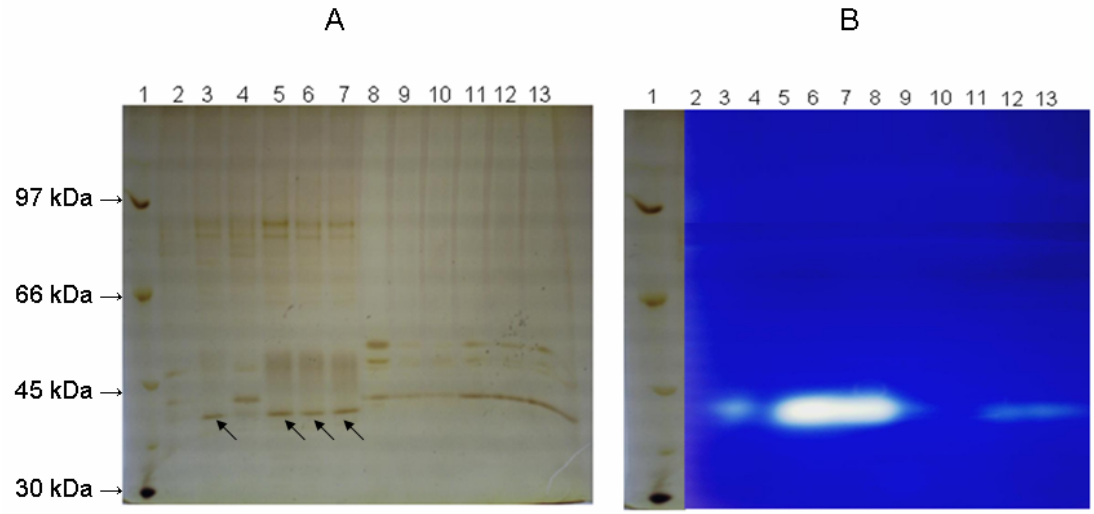


FIGURA 32 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE E ZIMOGRAMA DE AMOSTRAS DO SOBRENADANTE DE *L. crinitus*. Os géis foram obtidos através de eletroforese em gel desnaturante de acrilamida 12% e revelados por coloração com nitrato de prata (A) ou pela impregnação com solução de Remazol Azul 10 g/L. durante 12h (B). (1) Marcador, (2-4) MML, (5-7) MML contendo 0,1g/L de corante, (8-10) MMS, (11-13) MMS contendo 0,1g/L de corante. As setas indicam as bandas responsáveis pela descoloração observada no gel B.
FONTE: O autor (2008)

Segundo Wesemberg *et al.* (2003) a massa molar das lacases pode oscilar entre 59 e 110 kDa, e depende do microrganismo analisado, além de suas condições de cultivo. Vários estudos têm realizado a purificação e caracterização de lacases de diversos fungos e corroboram com os valores descritos anteriormente (PÉREZ *et al.*1996; MUÑOZ *et al.* 1997; CHEFETZ *et al.*, 1998, HEINZKILL *et al.*,

1998; PÉRIÉ *et al.* 1998; EDENS *et al.*, 1999; MIN *et al.*, 2001; PALONEN *et al.*, 2003; SAITO *et al.*, 2003; BALDRIAN, 2004; HAN *et al.*, 2005; LIERS *et al.*, 2007). Porém, existem relatos que apresentam lacases com massa molar menor que a descrita por Wesemberg (2003). Songulashvili *et al.* (2008) descrevem duas isoenzimas de lacase do fungo *Ganoderma lucidum* com massas moleculares de 43 e 56 kDa. Similarmente, Wang e Ng (2006) observaram uma lacase de *Pleurotus eryngii* com massa molar de 34 kDa. D'Souza-Ticlo et al. (2006) encontrou uma lacase de 47 kDa para a cepa fúngica denominada NIOCC #2a, quando o meio de cultivo continha glicina como fonte de nitrogênio.

6 CONCLUSÕES

- As três espécies de fungos avaliadas, *L. crinitus*, *L. sordida* e *H. fimbriatus* apresentaram grande atividade de biodegradação do corante Remazol Azul.
- A atividade descorante ao longo do tempo, tanto em *L. crinitus* quanto em *L. sordida*, não está diretamente atrelada ao crescimento fúngico.
- A presença do corante no meio de cultivo reduz o crescimento de *L. crinitus* e não afeta *L. sordida*. Ambas as cepas causam descoloração quase total do substrato em até 2 g/L de corante.
- O corante pode ser usado como fonte de nitrogênio por *L. sordida* e ainda estimula a sua própria descoloração. Para *L. crinitus* os resultados não foram conclusivos.
- Foi verificada a presença majoritária da atividade descorante nas frações de secreção dos fungos *L. crinitus e L. sordida* em MML. Quando considerada incubação em MMS, *L. crinitus* apresenta atividade descorante passível de eluição, já em *L. sordida* e *H. fimbriatus* esta não pode ser eluída, apesar de ser alta.
- *L. crinitus* e *L. sordida* apresentam perfil de atividade semelhante, em diferentes pHs. A atividade de ruptura do anel aromático é estável a variações de pH. Em relação à atividade de quebra da ligação azo a estabilidade encontrada é reduzida.
- O eluído de *L. crinitus* apresenta-se relativamente estável a variações de temperatura, tanto quanto a atividade de quebra do anel aromático (280 nm) quanto atividade de ruptura da ligação azo (600 nm). Em *L. sordida* a temperatura pouco afeta a atividade de quebra do anel aromático, porém a atividade de quebra da ligação azo é susceptível a variações de temperatura.
- Com relação à atividade descorante obtida em soluções de concentração salina variável, *L. crinitus* e *L. sordida* apresentam maiores graus descoloração em concentrações de até 0,2M de sal.
- É sugerido o envolvimento de uma enzima lacase no processo de descoloração, tanto em *L. crinitus,* quanto em *L. sordida*.
- Tanto a expressão de proteínas quanto a atividade descorante são drasticamente alteradas pelas condições de cultura.

- *L. crinitus* aparentemente secreta uma lacase de 41 kDa de massa molar e que esta envolvida no processo de descoloração.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K-H.; CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 66, n. 8, p. 3357-3362, 2000.

AKSU, Z. e DÖNMEZ, G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. **Chemosphere**, v. 50, p. 1075-1083, 2003.

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

ALCÂNTARA, M. R. e DALTIN, D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 320-330, 1996.

ALGUACIL, J.; KAUPPINEN, T.; PORTA, N. PARTANEN, T.; MALAST, N.; KOGEVINAS, M.; BENAVIDES, F. G.; OBIOLS, J.; BERNAL, F.; RIFA, J.; CARRATO, A. Risk of pancreatic cancer and occupational exposures in Spain. **Annals of Occupational Hygiene,** v. 44, n. 5, p. 391-403, 2000.

BAE, J-S e FREEMAN, H. S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the Daphnia magna. **Dyes and Pigments**, v.73, p.81-85, 2007.

BAIOCCO, P.; BARRECA, A. M.; FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase–mediator systems. ***Organic & Biomolecular Chemistry*****,** v. 1, p. 191-197, 2003.

BALDRIAN, P. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 63, p.560–563, 2004.

BALLAMINUT, N. **Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação de solo.** Dissertação de Mestrado, 176 p., São Paulo, 2007.

BALLAMINUT, N. e MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 248-252, 2007.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.

BANCI, L.; CIOFI-BAFFONI, S.; TIEN, M. Lignin and Mn Peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. **Biochemistry**, v. 38, p. 3205-3210, 1999.

BARR, D. P. e AUST, S. D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology,** v.28, n.2, p. 78-87, 1994.

BAUGHMAN, G. L. e PERENICH, T. A. Fate of dyes in aquatic systems: I Solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds. **Environmental Toxicology & Chemistry,** v. 7, p. 183-199, 1988.

BOER, C. G.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolorization of synthetic dyes by solis state cultures of *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresourse Technology**, v. 94, p. 107-112, 2004.

BOURBONNAIS, R. e PAICE, M.G.. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemical Journal**, v. 255 p. 445-450, 1988.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 255-260, 1976.

CAMARERO, S.; SARKAR, S.; RUIZ-DUENÃS, F. J.; MARTÍNEZ, M. J ; MARTÍNEZ, A. T. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 15, p. 10324–10330, 1999.

CAMERON, M. D.; TOMIFEEVSKI, S.; AUST, D.S. Enzimology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 751-758, 2000.

CAVALLAZZI, J. R. P.; OLIVEIRA, M. G. A.; KASUYA, M. C. M. Laccase production by *Lepista sordida*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 261-263, 2004.

CHAGAS, E. P. e DURRANT, L. R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 29, p. 473-477, 2001.

CHEFETZ, B.; CHEN, Y.; HADAR, T. Purification and Characterization of Laccase from *Chaetomium thermophilium* and Its Role in Humification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3175–3179, 1998.

CHUNG, K.T.; FULK, G.E.; EGAN, M. Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, p. 558-562, 1978.

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

CULLEN, D. e KERSTEN, P. J. Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation. In: BRAMBL, R. E MARZLUF, G.A. The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2004, p. 249-273.

DEVECI, T.; UNYAYAR, A.; MAZMANCI, M. A. Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 25–32, 2004.

DHOUIB, A.; HAMZA, M.; ZOUARI, H.; MECHICHI, T.; HMIDI, H.; LABAT, M.; MARTINEZ, M. J.; SAYADI, S. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p.1415–1423, 2005.

DITTMER, J. K.; PATEL, N. J. ; DHAWALE, S. W. ; DHAWALE, S. S. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chysosporium* grown under nutrient sufficiency. **FEMS Microbiology Letters**, v. 149, p. 65-70, 1997.

DOLIN, P. J. A descriptive study of occupation and bladder cancer in England & Wales. **British Journal of Cancer**, v. 66, p. 568-578, 1992.

D'SOUZA-TICLO, D.; VERNA, A. K.; MATHEW, M.; RAGHUKUMAR, C. Effect of nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC #2a, isolated from mangrove wood. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 35, n. 4, p. 364-372, 2006.

EDENS, W. A.; GOINS, T. Q.; DOOLEY, D.; HENSON, J. M. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 65, n, 7, p. 3071–3074, 1999.

EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J. F. D.; ERIKSSON, K. E. L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**, v. 391, p.144-148, 1996a.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. L. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1151-1158, 1996b.

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different Pleurotus species with special attention on *Pleurotus calyptratus*, strain CCBAS 461. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 941–946, 2006.

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. **Dyes and Pigments**, v. 75, p. 38-44, 2007.

ERIKSSON, K. E.; PETTERSSON, B.; VOLC, J.; MUSILEK, V. Formation and partial characterization of glucose-2-oxidase, a hydrogen peroxide producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium.* **Applied and Environmental Microbiology,** v. 23, p. 257-262, 1986.

FIDALGO, O. Studies on the type species of Hydnopolyporus. **Mycologia**, v. 55, p. 713-725, 1963.

GIANFREDA, L. e RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review**. Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 339-354, 2004.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1741-1747, 1983.

GOTTLIEB, A.; SHAW C.; SMITH A.; WHEATLEY A.; FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology,** v. 101, p. 49-56, 2003.

GUARATINI, C. C. I. e ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p.71-78, 2000.

HAMMEL, K. E. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. **New Journal of Chemistry**, v. 20, p. 195-198, 1996.

HAN, M-J.; CHOI, H. T.; SONG, H-G. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*, **Journal of Microbiology**, v. 43, n. 6, p.555-560, 2005.

HEINFLING, A.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes vesicolor* and *Bjerkandera adusta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 261-266, 1997.

HEINFLING, A.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, A. T; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleorotus eryngii* in a manganese-independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2788-2793, 1998.

HEINZKILL, M.; BECH, L.; HALKIER, T.; SCHNEIDER, P.; ANKE, T. Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family *Coprinaceae*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n.5, p. 1601–1606, 1998.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002

HOSHIDA, H.; FUJITA, T.; MURATA, K.; KUBO, K.; AKADA, R. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,** v. 69, n.6, p. 1090-1097, 2005.

HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. **Chimia,** v. 48, p. 520-522, 1994

IŞIK, M. e SPONZA, D. T. Monitoring of toxicity and intermediates of C.I. Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 14, p. 29-39, 2004.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by C. versicolor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 381-387, 2000.

KAUSHIK, P. e MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environmental international**, v. 35, n. 1, p. 127-141, 2008.

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

KUMAR, M. N. V. R.; SRIDHARI, T. R.; BHAVANI, K. D.; DUTTA, P. K. Trends in color removal from textile mill efluents. **Colorage**, v. 40, p. 25-34, 1998.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

KURBUS, T.; LE MARCHAL, A. M. ; VONČINA, D. B. Comparison of H_2O_2/UV, H_2O_2/O_3 and H_2O_2/ Fe^{2+} processes for the decolorisation of vinylsulphone reactive dyes. **Dyes and Pigments**, v. 58, p. 245-252, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

LANZER, R.; MÜLLER, M.; DUNCKE, M.; RASERA, K. Comparação de testes ecotoxicológicos com *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Daphia magna* (Straus, 1829) utilizando Remazol Brilliant Blue R e água de arroio urbano. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology,** v. 2, n. 1, p. 27-32, 2007.

LEVIN, L.; PAPINUTTI, L.; FORCHIASSIN, F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 169–176, 2004.

LIERS, C.; ULLRICH, R.; PECYNA, M.; SCHLOSSER, B.; HOFRICHTER, M. Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha.* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 785–793, 2007.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. I. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 146-252, 2005.
MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. I. R. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 468-473, 2006.

MASTRANGELO, G.; FEDELI, U.; FADDA, E.; MILAN, G.; LANGE, J. H. Epidemiologic evidence of cancer risk in textile industry workers: a review and update. **Toxicology and Industrial Health**, v. 18, p.171-181, 2002.

MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; MESTER, T.; FIELD, J. A.; Characterization of novel manganese-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by Bjarkandera species strain BOS55 in the absence of manganese. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p.15412-15417, 1998.

MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P. Mini-review: microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p.81–87, 2001.

MESTER, T. e TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 46, p. 51-59, 2000.

MIN, K-L.; KIM, Y-H.; KIM, Y. W.; JUNG, H. S.; HAH, Y. C. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis.* **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392, n. 2, p. 279–286, 2001.

MORAN, C., HALL, M. E., HOWELL, R. C. Effects of sewage treatment on textile effluent. **Journal of Society of Dyers Colourists**, v. 113, p. 272-274, 1997.

MUNARI, F. M.; GAIO, T. A.; CALLONI, R. e DILLON A. J. P. Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1383-1392, 2008.

MUÑOZ, C.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, Catalytic Properties, and Participation in Activation of Molecular Oxygen and Mn21 Oxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2166–2174, 1997.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzima: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NIGAM, P.; ARMOUR, G.; BANAT, I. M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-absorbed agricultural residues. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 219-226, 2000.

NOZAKI, K.; BEH, C. H.; MIZUNO, M. ISOBE, T.; SHIROISHI, M.; KANDA, T.; AMANO, Y. Screening ad investigation of dye decolorization activities of basidiomycetes. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** v. 105, n°1, p. 69-72, 2008.

NILSSON, R.; NORDLINDER, R.; WASS, U.; MEDING, B.; BELIN, L. Asthma, rhinitis, and dermatitis in workers exposed to reactive dyes. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 50, p. 65-70, 1993.

NOTANI, P. N.; SHAH, P.; BALAJRISHNAN, V. Occupation and cancers of the lung and bladder: a case-control study in Bombay. **International Journal of Epidemiology,** v. 22, p. 185-191, 1993.

NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVÁ, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; ŠAŠEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p 1554-1551, 2004.

OKINO, L. K.; MACHADO, K. M. G.; CARLA FABRIS, C. e BONONI, V. L .R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p. 889-893, 2000.

OLLIKKA, P.; ALHONMÄKI, K.; LEPPÄNEN, V.; GLUMOFF, T.; RAIJOLA, T.; SIOMINEM, I. Decolorization of azo, triphenil methane, heterociclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzimes from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 59, n. 12, p. 4010-4016, 1993.

PALONEN, H.; SALOHEIMO, M.; VIIKARI, L.; KRUUS, K. Purification, characterization and sequence analysis of a lacase from the ascomycete. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 854–862, 2003.

PASZCZYNSKI, A.; PASTY-GRIGSBY, M. B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, R. L.; CRAWFORD, D. L. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by

Phanerochaete chrysosporium and *Streptomyces chromofuscus*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 58, n. 11, p. 3598-3604, 1992.

PÉREZ, J.; MARTÍNEZ, J.; RUBIA, T. Purification and Partial Characterization of a Laccase from the White Rot Fungus *Phanerochaete flavido-alba*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n.11, p. 4263-4267, 1996.

PÉRIÉ, F. H.; REDDY, G. V.; BLACKBURN, N. J.; GOLD, M. H. Purification and characterization of laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 353, n. 2, p. 349–355, 1998.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 20-33, 2001.

RAJAGURU, P.; FAIRBAIM, L. J.; ASHBY, J.; WILLINTONG, M. A.;TURNER, S.; WOOLFORD, L. A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J. A. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 444, p. 175-180, 1999.

RAMALHO, P. A. **DEGRADATION OF DYES WITH MICROORGANISMS: STUDIES WITH ASCOMYCETE YEASTS.** 100 p. Tese (Doutorado em Ciências). Braga, Portugal: Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2005.

REDDY, C. A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. **Environmental Biotechnology**, v. 6, p. 320-328, 1995.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n°5, p. 219-226, 2006.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

SAITO, T.; HONG, P.; KATO, K.; OKAZAKI, M.; INAGAKI, H.; MAEDA, S.; YOKOGAWA, Y. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 520–526, 2003.

SARON, C. e FELISBERTI, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124-128, 2006.

SAPARRAT, M. C. N.; MOCCHIUTTI, P.; LIGGIERI, C. S.; AULICINO, M. B.; CAFFINI, N. O.; BALATTI, P. A.; MARTÍNEZ, M. J. Ligninolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 368–375, 2008.

SILVA, G. T. e GIBERTONI, T. B. Aphyllophorales (Basidiomycota) em áreas urbanas da região metropolitana de Recife, PE, Brasil. **Hoehnea**, v. 33, n. 4, p. 344-543, 2006.

SLOKAR, Y. M. e LE MARECHAL, A. M. Methods of decolorization of textile wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 37, n. 4, p. 335-356, 1998.

ŠNAJDR, J. e BALDRIAN, P. Temperature affects production, activity and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. ***Folia* Microbiologica**, v. 52, n. 5, p. 498-502, 2007.

SONGULASHVILI, G.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; HADAR, Y. Purification and particular characterization of lacase from the Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. 447 (Aphyllophoromycetideae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 10, n. 4, p. 361–368, 2008. Environmental Health Perspectives

SVOBODOVÁ, K.; MAJCHERCZYK, A.; NOVOTNÝ, Č; KÜES, U. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. **Bioresource Technology,** v. 99, p. 463–471, 2008.

SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium.* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2397-2401, 1992.

STEFFEN, K. T.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 60, p. 212–217, 2002.

SWEENEY, E. A.; CHIPMAN, J. K.; FORSYTHE, F. J. Evidence for direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. **Environmental Health Perspectives**, v.102, n. 6, p.119-122, 1994.

TRUPKIN, S., LEVIN, L., FORCHIASSIN, F. & VIALE, A. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30 p. 682-690, 2003.

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. e ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v.72, p.169-183, 2000.

VAIDYA, A. A. e DATYE, K. V. Environmental pollution during processing of synthetic fibers. **Colourage**, v. 14, p.3-10, 1982.

VALENZUELA F, E. Hongos comestibles silvestres colectados en la X region de Chile. **Boletín Micológico**, v. 18, p. 1-14, 2003.

VAN AKEN, B.; AGTHOS, S. N. Biodegradation of nitro-substituted explosives by lignolytic white-rot fungi: a mechanistic approach. **Advances in Applied Microbiology**, v. 48, p.1-77, 2001.

VAN AKEN, B. e AGTHOS, S. N. Implications of manganese (III), oxalate, and oxygen in the degradation of nitroaromatic compounds by manganese peroxidase (MnP). **Advances in Applied Microbiology**, v. 58, p.345-351, 2002.

VANDEVIVERE, P. C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 72, p. 289-302, 1998.

VINEIS, P. e PIRASTU. R. Aromatic amines and cancer. **Cancer Causes and Control**, v.8, p.346-355, 1997.

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

WEBER, E. e WOLFE, N. L. Kinetics studies of reduction of aromatic azo compounds in anaerobic sediment/water systems**. Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 6, p. 911-920, 1987.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances** v. 22, p. 161-187, 2003.

WILLMOTT, N.; GUTHRIE, J.; NELSON, G. The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. **Journal of the society of dyers and colourists**, v. 114, p. 38-41, 1998.

WONG, Y.; YU,J. Laccase-catalyzed decoloration of synthetic dyes. **Water Research**, v. 33, n. 16, p. 3512-3520, 1999.

YESILADA, G.; CING, S.; ASMA, D. Decolourization of textile dye Astrazon Red FBL by *Funallia trogii* pellets. **Bioresourse Technology**, v. 81, p. 155-157, 2002.

YOUNG, H-D.; HAH, Y. C.; KANG, S-O.1 Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, p. 183-185, 1995.

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, v. 29, n. 174, p. 61-64, 2001.

ZHAO, J. E JANSE, B. J. H. Comparison of H_2O_2-producing enzymes in selected white rot fungi. **FEMS Microbiology Letters,** v. 139, p. 215–221, 1996.

ZEE, F. P. **Anaerobic azo dye reduction.** Tese de Doutorado, 142 p., Wageningen, Holanda: Wageningen University Research Center, 2002.

Catalogue of life: 2008 Annual Checklist. Disponível em: http://www.catalogueoflife. org/ show_species_details.php?record_id=3276395. Acesso em: 31/07/2008.

Mushroom Magic: Bio-Remediation using fungi. Disponível em: http://www.world-of-fungi.org/Mostly_Mycology/Lucy_Goodeve-Docker_bioremediation_website/white rotfungi.htm. Acesso em: 11/11/2008.

Neotropical Basidiomycetes. Disponível em: http://www.cortland.edu/nsf/lentcrin. HTML. Acesso em: 11/11/2008.

Jens H. Petersens fungal photographs. Disponível em: http://www.aebletoften.dk/ jhp/fungi/Fungal%20landscapes/album/slides/HydnopolyporusFimbriatus.html.

Acesso em: 11/11/2008.
Espacio Natural. Disponível em: http://www.espacionatural.com/4images/search.php
?sessionid=a9704715add5f8d1f136f99d746c2be8. Acesso em: 11/11/2008.

ANEXOS

ANEXO 1

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Cinética de descoloração de *L. sordida* com relação à medida de absorbância.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	28069.70793	7017.42698	256.9703 **
Resíduo	15	409.62474	27.30832	
Total	19	28479.33268		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Tempo de Incubação.

	Médias de tratamento *
Controle	100.00000 a
5 dias	98.14634 a
7 dias	93.43100 a
10 dias	91.35514 a
15 dias	2.39951 b
Diferença mínima significativa	11.41823

Coeficiente de variação em % = 6.78082; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 2

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Cinética de descoloração de *L. crinitus* com relação à medida de absorbância.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	26130.88496	6532.72124	426.9119 **
Resíduo	15	229.53404	15.30227	
Total	19	26360.41900		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 =< p < 0.05$); ns não significativo ($p >= 0.05$).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Tempo de Incubação.

	Médias de tratamento *
Controle	100.00000 a
5 dias	95.83669 a
7 dias	79.08121 b
10 dias	58.11301 c
15 dias	0.76161 d
Diferença mínima significativa	8.54731

Coeficiente de variação em % = 5.85965; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 3

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Cinética de descoloração de *L. crinitus* referente ao crescimento do micélio fúngico.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	15.45667	5.15222	50.5947 **
Resíduo	20	2.03667	0.10183	
Total	23	17.49333		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Crescimento do micélio versus Tempo de Incubação.

	Médias de tratamento *
5 dias	4.33333 c
7 dias	4.95000 b
10 dias	5.25000 b
15 dias	6.53333 a
Diferença mínima significativa	0.51590

Coeficiente de variação em % = 6.05911; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 4

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Cinética de descoloração de *L. sordida* referente ao crescimento do micélio fúngico.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	49.21404	16.40468	23.2923 **
Resíduo	20	14.08594	0.70430	
Total	23	63.29997		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Crescimento do micélio versus Tempo de Incubação.

	Médias de tratamento *
5 dias	1.21250 c
7 dias	1.95833 c
10 dias	3.53333 b
15 dias	4.91667 a
Diferença mínima significativa	1.35674

Coeficiente de variação em % =28.88688; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 5

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Efeito de concentrações crescentes de corante sobre atividade descorante para *L. crinitus*.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	31132.13233	6226.42647	286.4387 **
Resíduo	18	391.27288	21.73738	
Total	23	31523.40522		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 =< p < 0.05$); ns não significativo ($p >= 0.05$).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Concentração do corante.

	Médias de tratamento *
Controle não descorado	100.00000 a
0,1g/L	2.89225 c
0,5g/L	0.86100 c
1g/L	0.59450 c
2g/L	1.36800 c
5g/L	24.01350 b
Diferença mínima significativa	10.46694

Coeficiente de variação em % = 21.56339; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 6

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Efeito de concentrações crescentes de corante sobre atividade descorante para *L. sordida*.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	31723.88437	6344.77687	142.9951 **
Resíduo	18	798.6705	44.37058	
Total	23	32522.55490		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Concentração do corante.

	Médias de tratamento*
Controle não descorado	100.00000 a
0,1g/L	1.28250 c
0,5g/L	1.46250 c
1g/L	1.71500 c
2g/L	5.45000 c
5g/L	41.28750 b
Diferença mínima significativa	14.95422

Coeficiente de variação em % = 26.43347; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 7

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Efeito de concentrações crescentes de corante sobre o crescimento do micélio de *L. crinitus*.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	105.13938	21.02788	24.1664 **
Resíduo	18	15.66228	0.87013	
Total	23	120.80167		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 =< p < 0.05$); ns não significativo ($p >= 0.05$).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Crescimento do micélio versus Concentração do corante.

	Médias de tratamento*
Sem corante	11.29785 a
0,1g/L	6.29739 b
0,5g/L	5.75163 b
1g/L	5.26307 b
2g/L	5.83170 b
5g/L	5.57299 b
Diferença mínima significativa	2.09415

Coeficiente de variação em % = 13.98698; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 8

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Efeito de concentrações crescentes de corante sobre o crescimento do micélio de *L. sordida*.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	9.36780	1.87356	4.6466 **
Resíduo	18	7.25782	0.40321	
Total	23	16.62562		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 =< p < 0.05$); ns não significativo ($p >= 0.05$).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Crescimento do micélio versus Concentração do corante.

	Médias de tratamento*
Sem corante	10.66340 ab
0,1g/L	9.27665 b
0,5g/L	9.63181 ab
1g/L	10.74728 a
2g/L	10.88671 a
5g/L	9.76471 ab
Diferença mínima significativa	1.42555

Coeficiente de variação em % = 6.24882; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 9

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Utilização do corante como fonte de carbono e/ou nitrogênio para crescimento fúngico de *L. sordida*.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	1023.03514	255.75879	72.9553 **
Resíduo	15	52.58538	3.50569	
Total	19	1075.62052		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Crescimento do micélio versus Corante como fonte de carbono e/ou nitrogênio.

	Médias de tratamento*
MML	10.66340 a
MS	5.84310 c
MS + 0,1g/L corante	4.67158 c
MS + 0,1g/L corante + C	23.50000 b
MS + 0,1g/L corante + N	4.75978 c
Diferença mínima significativa	4.09108

Coeficiente de variação em % = 18.93639; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 10

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Utilização do corante como fonte de carbono e/ou nitrogênio para crescimento fúngico de *L. crinitus*.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	122.36261	30.59065	3.8957 *
Resíduo	15	117.78742	7.85249	
Total	19	240.15002		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Crescimento do micélio versus Corante como fonte de carbono e/ou nitrogênio.

	Médias de tratamento*
MML	11.29785 a
MS	5.35293 ab
MS + 0,1g/L corante	6.43135 ab
MS + 0,1g/L corante + C	8.66178 ab
MS + 0,1g/L corante + N	4.43140 b
Diferença mínima significativa	6.12287

Coeficiente de variação em % = 38.73127; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 11

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Utilização do corante como fonte de carbono e/ou nitrogênio com relação à descoloração realizada por culturas de *L. crinitus*.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	30174.14562	7543.53640	2332.2272 **
Resíduo	15	48.51716	3.23448	
Total	19	30222.66278		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Corante como fonte de carbono e/ou nitrogênio.

	Médias de tratamento*
Controle não descorado	100.00000 a
MML	2.89203 bc
MS + 0,1g/L	2.76350 bc
MS + 0,1g/L + C	0.59983 c
MS + 0,1g/L + N	5.65553 b
Diferença mínima significativa	3.92965

Coeficiente de variação em % = 8.03526; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 12

Delineamento experimental inteiramente casualisado - Utilização do corante como fonte de carbono e/ou nitrogênio com relação à descoloração realizada por culturas de *L.sordida*.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	27555.30276	6888.82569	138.9268 **
Resíduo	15	743.78995	49.58600	
Total	19	28299.09271		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Corante como fonte de carbono e/ou nitrogênio.

	Médias de tratamento*
Controle não descorado	100.00000 a
MML	1.28522 c
MS + 0,1g/L	55.23715 b
MS + 0,1g/L + C	8.57213 c
MS + 0,1g/L + N	14.42688 c
Diferença mínima significativa	15.38618

Coeficiente de variação em % =19.61252; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 13

Delineamento experimental inteiramente casualisado – Atividade descorante de *L. crinitus* realizada pelo micélio e sobrenadante a 280 e 600 nm.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	8	57732.74358	7216.59295	24.3297 **
Resíduo	27	8008.63399	296.61607	
Total	35	65741.37757		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Meio de incubação.

	Médias de tratamento *
Controle	100.00000 a
Micélio MML – 280 nm	95.41359 a
Micélio MML + COR – 280 nm	101.78130 a
Micélio MML – 600 nm	86.12543 a
Micélio MML + COR – 600 nm	85.35225 a
Sobrenadante MML – 280 nm	12.49462 b
Sobrenadante MML + COR – 280 nm	13.03377 b
Sobrenadante MML – 600 nm	15.36439 b
Sobrenadante MML + COR – 600 nm	14.37269 b
Diferença mínima significativa	40.98965

Coeficiente de variação em % = 29.58420; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 14

Delineamento experimental inteiramente casualisado – Atividade descorante de *L. crinitus* realizada pelo micélio e sobrenadante a 280 e 600 nm.

Tratamentos
Resíduo

Total

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	8	67690.19356	8461.27420	34.0542 **
Resíduo	27	6708.55726	248.46508	
Total	35	74398.75082		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Meio de incubação.

	Médias de tratamento*
Controle	100.00000 a
Micélio MML – 280 nm	124.61340 a
Micélio MML + COR – 280 nm	61.61942 b
Micélio MML – 600 nm	124.61340 a
Micélio MML + COR – 600 nm	58.97766 b
Sobrenadante MML – 280 nm	11.62026 c
Sobrenadante MML + COR – 280 nm	32.76900 bc
Sobrenadante MML – 600 nm	11.00768 c
Sobrenadante MML + COR – 600 nm	21.37931 c
Diferença mínima significativa	37.51540

Coeficiente de variação em % = 25.95407; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 15

Delineamento experimental inteiramente casualisado – Atividade descorante de *L. crinitus* em 90 min, após pré-incubação em diferentes meios a 280 nm.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	22171.78152	5542.94538	115.3068 **
Resíduo	15	721.06919	48.07128	
Total	19	22892.85070		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Meio de incubação.

	Médias de tratamento*
Controle não descorado	100.00000 a
MML	18.28638 bc
MML + 0,1g/L corante	11.58358 c
MMS	31.48148 b
MMS + 0,1g/L corante	13.13807 c
Diferença mínima significativa	15.14936

Coeficiente de variação em % = 19.86751; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 16

Delineamento experimental inteiramente casualisado – Atividade descorante de *L. crinitus* em 90 min, após pré-incubação em diferentes meios a 600 nm.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	21511.10406	5377.77601	86.0405 **
Resíduo	15	937.54250	62.50283	
Total	19	22448.64656		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 =< p < 0.05$); ns não significativo ($p >= 0.05$).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Meio de incubação.

	Médias de tratamento*
Controle não descorado	100.00000 a
MML	13.78892 c
MML + 0,1g/L corante	10.63043 c
MMS	47.45327 b
MMS + 0,1g/L corante	26.84859 c
Diferença mínima significativa	17.27433

Coeficiente de variação em % = 19.89187; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 17

Delineamento experimental inteiramente casualisado – Atividade descorante de *L. sordida* em 90 min, após pré-incubação em diferentes meios a 280 nm.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	26320.55569	6580.13892	50.6804 **
Resíduo	15	1947.54054	129.83604	
Total	19	28268.09623		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 =< p < 0.05$); ns não significativo ($p >= 0.05$).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Meio de incubação.

	Médias de tratamento*
Controle não descorado	100.00000 a
MML	20.71728 b
MML + 0,1g/L corante	23.81359 b
MMS	88.50627 a
MMS + 0,1g/L corante	98.98801 a
Diferença mínima significativa	24.89712

Coeficiente de variação em % = 17.15918; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 18

Delineamento experimental inteiramente casualisado – Atividade descorante de *L. sordida* em 90 min, após pré-incubação em diferentes meios a 600 nm.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	10155.99509	2538.99877	13.4641 **
Resíduo	15	2828.62486	188.57499	
Total	19	12984.61995		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Meio de incubação.

	Médias de tratamento*
Controle não descorado	100.00000 a
MML	47.84628 b
MML + 0,1g/L corante	55.07845 b
MMS	85.30595 a
MMS + 0,1g/L corante	101.81130 a
Diferença mínima significativa	30.00499

Coeficiente de variação em % =17.60357; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 19

Delineamento experimental inteiramente casualisado – Atividade descorante de *H. fimbriatus* em 90 min, após pré-incubação em diferentes meios a 280 nm.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	1588.37760	397.09440	0.4766 ns
Resíduo	15	12497.96629	833.19775	
Total	19	14086.34389		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Meio de incubação.

	Médias de tratamento*
Controle não descorado	100.00000 a
MML	78.66811 a
MML + 0,1g/L corante	101.79620 a
MMS	86.26830 a
MMS + 0,1g/L corante	85.88035 a
Diferença mínima significativa	63.07038

Coeficiente de variação em % =31.88725 ; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 20

Delineamento experimental inteiramente casualisado – Atividade descorante de *H. fimbriatus* em 90 min, após pré-incubação em diferentes meios a 600 nm.

Análise de variância ANOVA para descoloração utilizando soma de quadrados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	450.31797	112.57949	0.4415 ns
Resíduo	15	3825.30127	255.02008	
Total	19	4275.61924		

FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma de quadrado; QM= Quadrado médio; F = Estatística do teste F; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0.01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (0.01 =< p < 0.05); ns não significativo (p >= 0.05).

Teste de Tukey – Interação entre fatores: Descoloração versus Meio de incubação.

	Médias de tratamento*
Controle não descorado	100.00000 a
MML	93.55689 a
MML + 0,1g/L corante	85.91623 a
MMS	89.84376 a
MMS + 0,1g/L corante	89.84742 a
Diferença mínima significativa	34.89302

Coeficiente de variação em % = 17.38958; * As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.