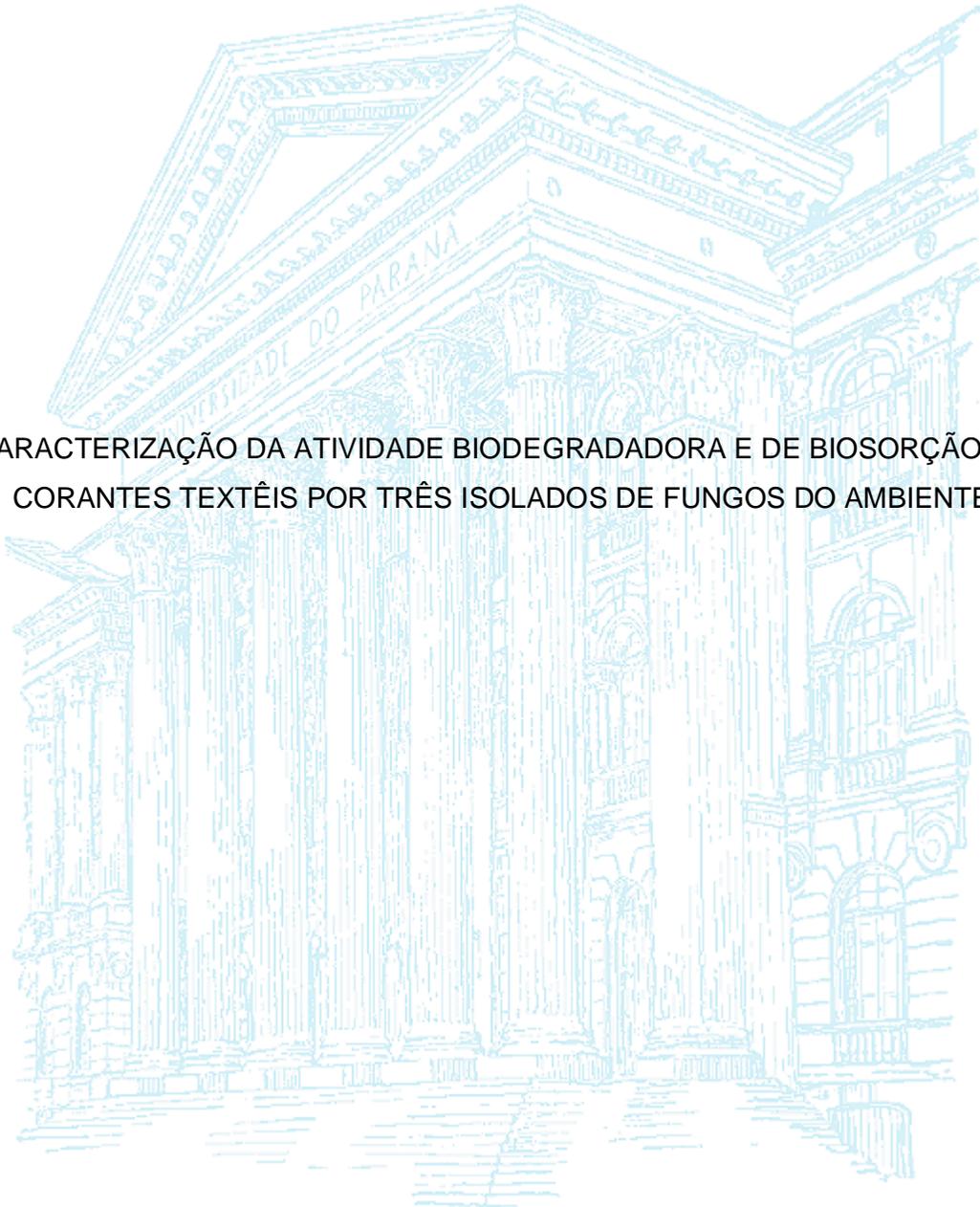


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILE FOLTRAN

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIODEGRADADORA E DE BIOSORÇÃO DE  
CORANTES TEXTÉIS POR TRÊS ISOLADOS DE FUNGOS DO AMBIENTE



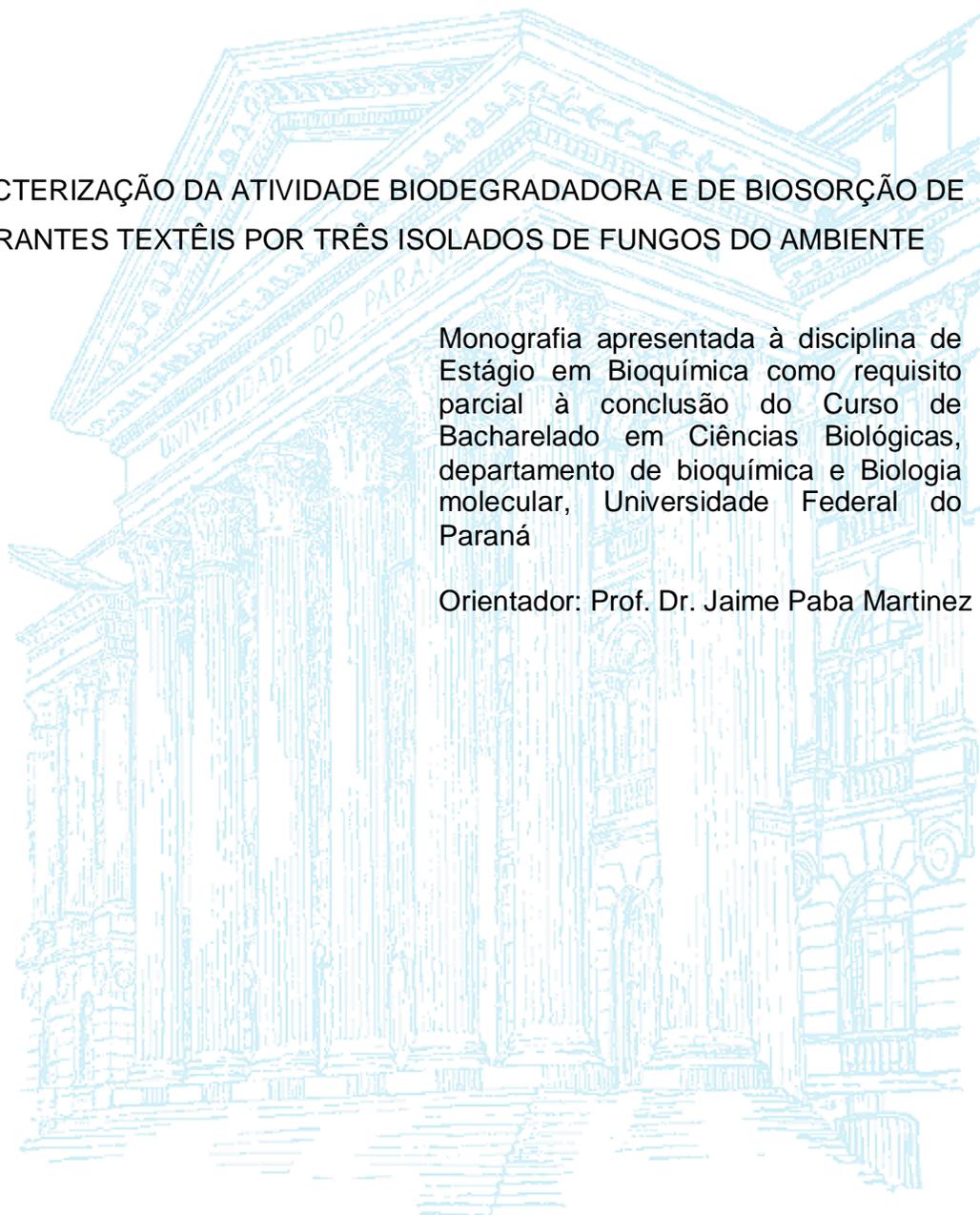
CURITIBA  
2009

CAMILE FOLTRAN

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIODEGRADADORA E DE BIOSORÇÃO DE  
CORANTES TEXTÉIS POR TRÊS ISOLADOS DE FUNGOS DO AMBIENTE

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Bioquímica como requisito parcial à conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, departamento de bioquímica e Biologia molecular, Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Jaime Paba Martinez



CURITIBA

2009

## RESUMO

O impacto causado pelo homem no meio ambiente nas últimas décadas aumentou drasticamente tornando-se um grave problema. Os danos causados pelos efluentes têxteis liberados sem tratamento prévio são notórios, pois possuem uma ampla gama de componentes de natureza poluidora devido a sua recalcitrância e/ou toxicidade. Tal fato requer a busca por métodos eficientes que minimizem esses efeitos de uma forma economicamente viável, uma vez que os métodos atualmente aplicados possuem baixa eficiência ou alto custo. Métodos biológicos como biodegradação e biosorção são uma alternativa atraente. Este projeto teve como objetivo avaliar o efeito da composição do meio de cultura e condições de crescimento de dois isolados de fungos: *Heteroporus biennis* e cepa 002 (sem identificação) na atividade de biodegradação de corantes, e ainda caracterizar o processo de biosorção de corantes por um terceiro isolado denominado de 003. A atividade descorante de *H. biennis* cultivado em meio sólido otimizado com glicerol 10 g/L, agar 10 g/L e tartarato de amônia 10 g/L apresentou uma melhora quando suplementado com 0,1 mM de  $MnSO_4$  e nenhuma melhora quando adicionado  $CuSO_4$ . No meio líquido otimizado (maltose 5 g/L e tartarato de amônia 10 g/L) observamos que a suplementação com  $Cu^{+2}$  e  $Mn^{+2}$  não alterou tal atividade. Embora o eluído tenha produzido aumento na produção de enzimas oxidases normalmente associadas ao processo. A cepa 002, quando cultivada nas melhores condições maltose 5 g/L e oxalato de amônia 5 g/L também não apresentou melhora na sua atividade após suplementação das culturas. Nos dois casos as enzimas que aparentemente participam do processo correspondem a uma manganês peroxidase, majoritariamente, e uma lacase em menor proporção. A cepa 003 revelou capacidade para absorver corantes têxteis de variadas origens e estruturas. Esta qualidade manteve-se alta em variadas condições de pH 2 a 9, temperatura 28 °C, 35 °C e 45 °C, concentração de sal 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M e 1,5M, revelando assim sua potencial aplicação no tratamento de efluentes da indústria têxtil.

## ABSTRACT

The impact of human activities on the environment in recent decades has increased dramatically and is becoming a serious problem. As the textile industry accounts for a portion of this current situation, it is necessary to search for efficient methods that minimize these effects in an economically viable way, since the methods currently used have low efficiency or high cost. Biological methods such as biodegradation and biosorption are an attractive alternative. This project aimed to evaluate the effect of media composition on the destaining of textile dyes by an isolate of *Heteroporus biennis* and a non-identified isolate called 002. Also it was characterized the process of biosorption of textile dyes by a third fungal strain called 003. The bleach activity of *H. biennis* grown on solid medium optimized with glycerol 10g / L, agar 10g / L ammonium tartrate and 10g / L showed an improvement when supplemented with 0.1 mM MnSO<sub>4</sub> and no improvement when added CuSO<sub>4</sub>. In liquid medium optimized (maltose 5 g / L ammonium tartrate and 10 g / L) showed that supplementation with copper and Mn<sup>+2</sup> did not enhance the destaining activity although a higher level of oxidative enzymes, normally associated to the process, was detected. Similar results were obtained for the 002 strain. The enzymes involved in the destaining process seem to be mainly a Mn-dependent peroxidase and a laccase in minor proportion. Strain 003 revealed a great capacity for the biosorption of textile dyes from different sources and structure. The efficiency of the process remained high even in, extreme pHs 2 to 9; variation of temperatures, 28°C, 35° and 45°; high salt contents 0,25M, 0,5 M, 0,75M, 1M and 1,5M suggesting a great potential for its application on the treatment of textile dye effluents.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
1.1 OBJETIVOS .....	8
1.2 OBJETIVO GERAL .....	8
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL .....	9
2.2 CORANTES .....	10
2.2.1 Toxicidade .....	12
2.3 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES .....	13
2.4 BIODEGRADAÇÃO .....	15
2.4.1 Fungos Lignolíticos .....	16
2.4.1.1 Enzimas modificadoras de lignina (LMEs) .....	16
2.5 BIOSORÇÃO .....	17
2.6 DESCRIÇÃO DE MICROORGANISMOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO .....	18
2.6.1 MICROORGANISMOS .....	18
2.7 RESULTADOS ANTERIORES .....	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL GERAL .....	20
3.1.1 FLUXOGRAMA DE TRABALHO .....	21
3.2 CORANTES TÊXTEIS .....	21
3.3 ESPÉCIMES E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS .....	22
3.4 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO .....	22
3.4.1 Inoculação de culturas e Obtenção de amostras .....	22
3.4.2 ENSAIOS DE DESCOLORAÇÃO .....	23
3.4.3 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção de atividade descorante .....	24
3.4.4 Efeito da suplementação com sulfato de cobre e manganês na atividade descorante .....	25
3.4.5 Atividade de enzimas modificadoras de lignina, LME <sub>s</sub> .....	25
3.4 ENSAIOS DE BIOSORÇÃO .....	26
3.3.1 Efeito do tratamento do micélio .....	26
3.3.2 Efeito da quantidade de massa micelial na descoloração .....	27
3.3.3 Efeito do pH e temperatura no potencial de biosorção .....	28
3.3.4 Efeito da concentração de sal no potencial de biosorção .....	29
3.3.5 Efeito da concentração de corante no potencial de biosorção .....	29
3.5.6 Tratamento do micélio após biosorção .....	29
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 ATIVIDADE DESCORANTE DA CEPA <i>HETEROPORUS BIENNIS</i> .....	30
4.1.1 Resultados anteriores .....	30
4.1.2 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio .....	30
4.1.3 Suplementação com sais de cobre e manganês .....	34
4.2 ATIVIDADE DESCORANTE DA CEPA 002 .....	37
4.2.1 Resultados anteriores .....	37

4.2.2 Suplementação com sais de cobre e manganês.....	38
4.3 ENSAIO DE BIOSORÇÃO COM A CEPA 003.....	40
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
5.1 BIODEGRADAÇÃO .....	44
5.2 BIOSORÇÃO .....	46
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O impacto causado no meio ambiente nas últimas décadas aumentou drasticamente, principalmente devido a questões referentes aos hábitos de vida, como o consumismo, além do crescimento populacional desenfreado. Tais atividades acabam por produzir alta quantidade de resíduos que muitas vezes não seguem o destino adequado, sendo liberados no solo, no ar e na água sem tratamento prévio, comprometendo a longo prazo a qualidade de vida da biota ali presente. Uma parcela deste impacto é gerada pelas indústrias têxteis, as quais ao eliminarem seus efluentes não tratados corretamente, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental.

Corantes sintéticos são usados extensivamente na coloração de tecidos e processos de impressão. Eles são classificados como reativos, diretos, dispersos, ácidos e básicos, sendo que os corantes reativos são os mais utilizados, já que cerca de 50% das fibras têxteis de algodão são tingidas com estes e o algodão persiste como principal tecido utilizado pela indústria. Infelizmente esta classe é muito desfavorável no ponto de vista ecológico, uma vez que o efluente resultante é altamente colorido, contendo altas concentrações de sal e altos valores de BOD (demanda bioquímica de oxigênio) e COD (demanda química de oxigênio). Estes, além dos fatores citados acima, tendem a passar pelos métodos de tratamentos de água comum, sem serem afetados. Todos os corantes utilizados na indústria têxtil são formulados para resistir a agentes físicos, químicos e biológicos, tais como, suor, luz solar, água, vários produtos químicos etc., e permanecer intacto na fibra durante o maior tempo possível.

Alguns métodos físico-químicos têm potencial para o tratamento de efluentes têxteis como coagulação, separação por flotação ou sedimentação, filtração, oxidação, dentre outros. Mas em comparação com os métodos biológicos tais técnicas mostram-se excessivamente caras e podem ainda aumentar a quantidade de poluentes devido aos produtos químicos utilizados. Por esta razão, os métodos biológicos como biodegradação e biosorção, surgem como uma alternativa promissora, possuindo algumas vantagens como baixo custo e completa mineralização dos poluentes. Oferecem também a possibilidade de que efluentes contendo produtos tóxicos possam retornar ao ambiente sem causar danos aos

seres vivos e inclusive permitir a sua reutilização. Alguns dos organismos mais utilizados neste método incluem fungos, bactérias e algas.

Para o tratamento de efluentes têxteis a classe de fungos mais estudada é a dos fungos da podridão branca (*White-rot fungi-WRF*), também chamados de fungos lignolíticos. Tal nome deve-se ao fato de que possuem a capacidade de realizar a despolimerização aeróbia da lignina, sendo a maioria destes fungos pertencentes ao grupo Basidiomycota. Essa capacidade é devido à produção de enzimas lignolíticas, chamadas de enzimas modificadoras de lignina (LMEs). Manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e lacase (Lac) são as constituintes deste grupo. Os WRF secretam uma ou mais dessas enzimas as quais, por possuírem baixa especificidade, podem degradar outros substratos que apresentem estrutura similar à lignina, como os poluentes produzidos na indústria.

A extrema variabilidade nas características dos efluentes têxteis como tipo de corante, pH, temperatura e concentração de sal tornam necessária a constante busca por enzimas ou organismos que se adaptem a esta ampla gama de situações, o que dificilmente pode ser atingida por um único isolado de fungo, alga ou bactéria ou por enzimas derivadas destes.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a produção de enzimas com potencial biodegradador de corantes em *Heteroporus biennis* e na cepa 002, assim como o processo de biosorção de corantes em uma cepa isolada do ambiente, chamada de 003.

### 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para as cepas de *Heteroporus biennis* e 002:

- Determinar o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de atividade descorante;
- Comparar a produção de atividade descorante em meio líquido e sólido;
- Verificar o tipo de LME produzida nas condições avaliadas;
- Examinar o efeito da suplementação com íons metálicos na produção da atividade descorante;

Para a cepa 003:

- Verificar a capacidade de biosorção sobre corantes têxteis de diferente natureza;
- Verificar o efeito do tratamento do micélio no processo de biosorção;
- Estudar o efeito da variação da temperatura, pH, concentração de corante e força iônica no processo de biosorção;
- Verificar possíveis estratégias de recuperação do biosorvente pela eluição do corante retido;

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL**

As cores sempre exerceram fascínio sobre a humanidade. Por toda a história, corantes e pigmentos foram objetos de atividades comerciais presentes tanto em roupas como em inscrições rupestres, os quais eram inicialmente retirados de plantas. Entretanto, muitos corantes naturais utilizados na antiguidade ainda são empregados, e em larga escala. Exemplos é o índigo, um pigmento azul, extraído da planta (*Indigofera tinctoria*), a alizarina, um corante extraído de uma raiz e a henna. O primeiro corante orgânico sintetizado com técnica mais apurada foi o Mauve obtido acidentalmente em 1856, pelo inglês William H. Perkin, que para dar apoio à sua indústria montou um amplo laboratório de pesquisa onde conseguiu sintetizar

outros corantes. Após essa descoberta, houve uma corrida dos químicos para conseguir criar tais compostos.

No fim do século XIX, fabricantes de corantes sintéticos estabeleceram-se na Alemanha, Inglaterra, França e Suíça, suprindo as necessidades das indústrias que, na época, fabricavam tecidos, couro e papel. 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).

Hoje, mais de 90% dos corantes empregados é sintético sendo que tal comércio cresceu de forma assustadora, movimentando grande quantidade de capital por todo o mundo, sendo mais de 700 mil toneladas de 10 mil tipos de corantes e pigmentos produzidos anualmente e mais de 26 mil toneladas somente no Brasil (ZANONI, M. V. B; CARNEIRO, P. A. 2001).

A distribuição do mercado de corantes global mudou durante na última década, com a Ásia, sendo o maior mercado de tintas hoje (cerca de 40%). Mesmo sendo a indústria de corantes caracterizada por um grande número de produtores (cerca de 2000 mundiais), apenas quatro companhias ocidentais são responsáveis por quase metade do mercado.

A maior parte dos corantes fabricados destina-se a indústria têxtil, mas as indústrias de artefatos de couro ou de papel, indústrias alimentícias, de cosméticos, tintas e plásticos também são usuários importantes. Como a demanda é muito grande e diversa, os químicos são desafiados a produzir corantes e pigmentos com propriedades particulares para obter boa fixação da coloração dos tecidos, oferecendo grande resistência aos agentes que causam o desbotamento (ZANONI, M. V. B; CARNEIRO, P. A. 2001).

## 2.2 CORANTES

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, absorvem energia eletromagnética, sendo que tal absorção deve ocorrer no espectro compreendido entre 400 e 700 nm para que as moléculas se apresentem

perceptíveis à nossa visão. Porém, as mesmas características que conferem aos corantes a capacidade de interagir com a superfície do material e permanecer ali inalterado por períodos prolongados, podem ser responsáveis pela sua recalcitrância e toxicidade (BANAT, I. M *et al.*, 1996).

Os compostos químicos chamados corantes apresentam estruturas químicas complexas, possuindo anéis aromáticos e/ou duplas ligações, que conferem cor à substância e que chamamos de cromóforo. Baseado na estrutura química deste grupo, os corantes sintéticos são classificados em diferentes grupos sendo o mais representativo e largamente empregado o dos azocorantes. Estes se caracterizam por apresentar grupamentos  $-N=N-$  ligados a anéis aromáticos (Figura 1).

A segunda parte é a estrutura responsável pela fixação do corante à fibra chamada de auxocromo. Existem atualmente várias classes de corantes classificados segundo sua fixação, como por exemplo, corantes ácidos, diretos, básicos, de enxofre e reativos, sendo este último o mais utilizado em nível mundial (KUNZ, A. *et al.* 2002, GUARATINI C. C. I.; ZANONI, M. V. B, 1999).

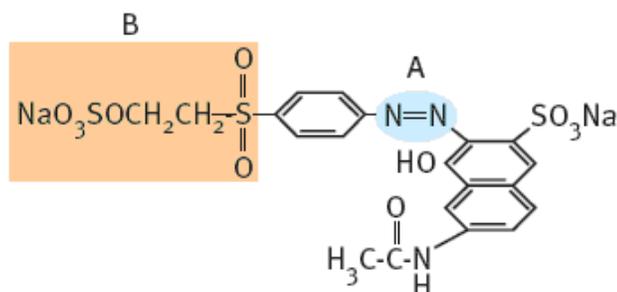


FIGURA 1 – EXEMPLO DE GRUPO CROMÓFORO (A) E AUXOCROMO (B).  
FONTE: GUARATINI C. C. I.; ZANONI, M. V. B, 1999

Tendo em vista que muitos corantes são compostos complexos, muitas vezes é impossível traduzi-los por uma fórmula química definida. Por esse motivo, a nomenclatura química usual raramente é usada, prefere-se utilizar os nomes comerciais. Para identificar os corantes, utiliza-se o Colour Index (C.I.), este 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 associados à indústria têxtil (WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N., 2003).

### 2.2.1 Toxicidade

A indústria de corantes libera efluentes têxteis que são um dos mais problemáticos por apresentarem várias características que acabam influenciando negativamente o ambiente. O primeiro sinal de contaminação é a alteração da cor do corpo de água onde é liberado. Este fato acarreta problemas principalmente em seres aquáticos e fotossintetizantes, pois sua presença altera a quantidade de luz que penetra na água assim como a solubilidade de gases, causando danos nas guelras e brânquias dos organismos aquáticos, além de perturbar seus locais de desova e refúgio. Os efluentes apresentam altos valores de BOD (demanda bioquímica de oxigênio), sólidos em suspensão, pH extremos e altas temperaturas que alteram o equilíbrio nos locais de despejo (SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S.; OLIVEIRA, P.R., 2005)

O efeito nos seres humanos varia com o modo e o tempo de exposição ao corante, podendo ser inalado, ingerido ou entrar em contato com a pele. Os sintomas resultantes da inalação dessas substâncias são asma e rinite, e os de contato são as dermatites, sendo estes efeitos insignificantes quando comparados aos causados pela sua ingestão. Mas de acordo com Zanoni *et al.* 2001, apenas um pequeno número de corantes pode apresentar toxicidade aguda.

Além deste fato, estudos têm mostrado que algumas classes, principalmente os azocorantes, os quais constituem o maior grupo de corantes orgânicos produzidos mundialmente, juntamente com seus subprodutos possuem potencial carcinogênicos e/ou mutagênicos (KUNZ, A. *et al.* 2002). Isto se deve ao fato de ocorrer clivagens das ligações azo, que são responsáveis pela formação de aminas tóxicas benzidinas e outros intermediários (AKSU, Z., 2005). Pelo menos 3.000 corantes azo foram catalogados como cancerígenos e suspensos do mercado. Entretanto, a literatura mostra que países menos desenvolvidos como Brasil, México, Índia e Argentina, não têm cessado completamente a produção de alguns corantes à base de benzidinas (e.g. CongoRed 14) de grande potencialidade econômica (GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B., 1999).

A carcinogenicidade de um corante azo é devida aos derivados de aril amina, gerados durante a biotransformação da ligação azo. Os quatro principais mecanismos de biotransformação envolvendo esta classe são baseados principalmente em modificações devido a processos de oxidação, hidrólise, conjugação e redução (SPADARO, J.T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V., 1992).

Estudos recentes têm associado a exposição de corantes ao aumento no risco de câncer de bexiga e do fígado em humanos. Outros podem ser acumulados por plantas expostas a efluente da indústria têxtil e, conseqüentemente, passar para a cadeia alimentar, contaminando seus consumidores (MASTRANGELO, G., *et al.*, 2002, ZANON, M.V.B.; CARNEIRO, P.A., 2001).

## 2.3 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES

Devido a grandes problemas ambientais causados pela liberação irresponsável de efluentes têxteis, foi criado em 1974 o órgão internacional *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing Industry* (ETDA), com o objetivo de minimizar os danos ambientais, proteger usuários e consumidores reduzindo seu impacto. Foram ainda criados com o mesmo intuito, a *Environment Agency* (EA), localizada na Inglaterra e País de Gales, e na Escócia, a *Scottish Environment Protection Agency* (SEPTA). Nos países desenvolvidos as leis ambientais voltadas para o tratamento de efluentes se tornaram mais rígidas a partir da criação destes órgãos, as quais ainda falham nos países em desenvolvimento (ROBINSON, T. *et al.*, 2001, GUARATINI, C.C.I; ZANONI, M.V.B., 1999; ZANONI, M.V.B; CARNEIRO, P.A., 2001).

O acabamento tradicional da indústria têxtil consome cerca de 100 litros de água para cada quilograma de material têxtil. No panorama atual a introdução de novas estratégias de purificação e re-aproveitamento poderiam auxiliar na redução da grande quantidade de água utilizada no sistema de coloração do tecido (ABADULLA, E., *et al.*, 2000).

Além do volume exorbitante de água utilizada pela indústria têxtil, há ainda a adição de uma grande quantidade de substâncias químicas para o processamento de têxteis. Existe mais de oito mil produtos químicos associados a processos de

coloração de tecidos listados no “Colour Index” (“Society of Dyers and Colourists”, 1976) (BANAT, I.M. *et al.*, 1996) A composição destes elementos varia desde umectantes, antiespumantes, dispersantes até ajustadores de pH. Estima-se que pelo menos 20% dos corantes sejam descartados devido a perdas ocorridas durante o processo de fixação da tintura ao tecido. Neste processo, está ainda presente uma variada gama de componentes orgânicos: (carboidratos, gorduras graxas), corantes, nutrientes (uréia), tampões, altas concentrações de sais (hidróxido de sódio, sulfatos carbonatos), e compostos tóxicos (metais pesados) necessários para banho de tintura, a montagem e a fixação (HESSEL, C. *et al.*, 2007).

Devido à complexa estrutura química do corante juntamente com os compostos químicos citados acima, torna-se difícil a completa retirada deste do efluente têxtil, sendo necessário utilizar mais de uma técnica de remoção.

Atualmente, vários métodos podem ser utilizados na retirada de corantes em efluentes industriais, estes podem ser distribuídos em três categorias: químicos, físicos e biológicos. Os métodos químicos abrangem, ozonização, processos fotoquímicos, destruição eletroquímica e processos oxidativos. Sendo este último o mais utilizado devido à sua grande simplicidade de aplicação. A oxidação química remove a cor de efluentes como resultado da quebra das ligações aromáticas das moléculas de corantes.

Os métodos físicos consistem em técnicas de remoção resultantes de mecanismos como: eletroquímica, adsorção, filtração por membrana, coagulação/floculação, troca iônica, dentre outros. A adsorção é um processo economicamente viável, sua descoloração é o resultado de dois mecanismos: adsorção 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 (ROBINSON, T. *et al.*, 2001).

O terceiro grupo de métodos, descrito a seguir, se refere ao biológico. Este se mostra como o mais promissor para o tratamento de efluentes têxteis devido a vários fatores, como versatilidade, observada na implementação de sistemas que operem em grande escala e baixo custo. Quando aplicados em conjunto com as técnicas previamente descritas revelam resultados excelentes (CAMERON, M.D.; TOMIFEEVSKI, S.; AUST, D.S., 2000, ELIASASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M., 2008).

Os processos biológicos utilizados com maior frequência estão representados pela descoloração por fungos ou outras culturas microbianas, adsorção por biomassa e pelos sistemas de lodos ativados. Este último permite a remoção de aproximadamente 80% da carga de corantes e consiste na agitação dos efluentes na presença de microrganismos e ar, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica. Infelizmente, o problema relacionado com a geração e acúmulo de lodo torna-se crítico, descartado, em muitos casos, em aterros, que pode contaminar lençóis freáticos, rios e lagos, ao ser carregado pela chuva (KUNZ, A. *et al.*, 2002).

Atualmente há uma tendência na utilização de enzimas de fungos, bactérias e biomassa de maneira geral, como materiais promissores na remoção ou degradação de efluentes têxteis, mas ainda é necessário aprimorar a sua utilização, realizando novos estudos para que se tornem viáveis na aplicação em larga escala (GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B., 2001, YAMANAKA, R. *et al.*, 2008).

## 2.4 BIODEGRADAÇÃO

A biodegradação tem recebido grande atenção devido à sua potencial aplicação na descoloração de uma ampla variedade de corantes (KUMARASAMY, M. *et al.*, 2009). Também é considerada um método promissor devido ao fato de provocar a completa mineralização de poluentes, resultando em moléculas de água, gás carbônico e/ou qualquer outro produto inorgânico (KAUSHIK, P.; MALIK, A. *et al.*, 2009). Alguns estudos apontam que a taxa desta mineralização em corantes possa atingir até 98%, mas a maioria relata uma degradação de 60% a 92% (YAMANAKA, R. *et al.*, 2008, ZANONI, M.V.B; CARNEIRO, P.A., 2001). Em contrapartida, sua aplicação em escala comercial requer não somente o entendimento de aspectos relacionados ao processo de degradação, mas também conhecimentos sobre aspectos básicos da fisiologia do fungo e das características das enzimas envolvidas.

De acordo com POINTING, S.B. (2001) a biodegradação já é uma tecnologia estabelecida, porém a maioria dos tratamentos empregados utiliza microrganismos procariotos. Neste contexto, fungos lignolíticos têm despertado grande interesse

devido à produção de enzimas que apresentam ação sobre múltiplos substratos de origem industrial. Tais organismos oferecem vantagens em relação às bactérias como a de possuírem a habilidade de oxidar uma ampla diversidade de compostos e pelo fato de suas enzimas serem extracelulares, o que impede a difusão limitada sobre os substratos, observada em bactérias (PRACHI, K.; ANUSSHREE, M., 2009).

#### 2.4.1 Fungos Lignolíticos

A classe de fungos mais amplamente estudada no tratamento de efluentes têxteis é a dos fungos da podridão branca (*White-rot fungus*), devido à sua capacidade de descolorir uma ampla variedade de corantes sintéticos. Esta habilidade está baseada no fato destes fungos produzirem enzimas capazes de modificar e degradar a lignina, conhecidas como enzimas modificadoras de lignina (LMEs), as quais por não possuírem especificidade por substrato são também responsáveis por degradar uma ampla gama de xenobióticos, incluindo corantes (KUMARASAMY, M., *et al.*, 2009, POINTING, S.B., 2001, PRACHI, K.; ANUSHREE, M., 2009).

##### 2.4.1.1 Enzimas modificadoras de lignina (LMEs)

As enzimas lignolíticas liberadas pelos WRF são de extrema importância devido a sua capacidade de degradar a molécula de lignina, o polímero protetor na madeira, a dióxido de carbono. Tais enzimas podem degradar um amplo número de poluentes presentes no ambiente que possuem similaridades com a lignina, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos aromáticos, corantes sintéticos e explosivos (BRITO, N.N. de. *et al.*, 2004, CAMERON, M.D.; TOMIFEEVSKI, S.; AUST, D.S., 2000).

Os fungos lignolíticos são capazes de produzir até três das principais enzimas extracelulares, a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e a lacase (POINTING, S.B., 2001). Sendo as duas primeiras classificadas como peroxidases e a última uma fenoloxidase. A produção destas é fortemente afetada

pela natureza e quantidade de nutrientes no meio de cultivo (HATVANI, N.; MÉCS, I., 2002).

MnP (E.C 1.11.1.13) são enzimas dependentes de peróxido de hidrogênio e íons manganês que contêm íons ferro ligados a um grupamento heme. A oxidação dos íons manganês serve de mediador para a oxidação do substrato final, usualmente compostos fenólicos (WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N., 2003). Semelhantemente a MnP, as LiP (E.C 1.11.1.14) são enzimas dependentes de peróxido de hidrogênio que catalisam a oxidação de compostos não fenólicos. As Lacases (E.C 1.10.3.2) são multi-cobre oxidases que catalisam a oxidação de substâncias orgânicas e inorgânicas através da redução de oxigênio a água. São tipicamente glicoproteínas contendo de dois a quatro átomos de cobre por molécula (DEDEYAN, B. *et al.*, 2000). Entre estas enzimas a MnP foi encontrada em praticamente todos os WRF estudados, alguns a secretando como sendo a única enzima lignolítica.

## 2.5 BIOSORÇÃO

A definição de biosorção muitas vezes se torna algo difícil devido aos vários mecanismos que contribuem para o processo, dependendo da substância a ser absorvida, bem como características do adsorvente, fatores ambientais e a presença ou ausência de processos metabólicos quando os organismos estão vivos. Mais simplificada, podemos defini-la como sendo a remoção de substâncias da solução pelo uso de material biológico. Tais substâncias podem se apresentar na forma orgânica, inorgânica, solúvel ou insolúvel. Esta técnica vem sendo amplamente estudada por se apresentar significativamente mais barata que outros métodos de adsorção, com eficiência comparável. Como exemplo, podemos citar o carbono ativado, o qual se destaca, mas devido ao alto custo sua aplicação torna-se inviável em empresas de países em desenvolvimento (GADD, G.M., 2008).

A biomassa microbiana é um material relativamente barato, com propriedades de adsorção significativas, tal biomassa pode ter origem de bactérias, fungos, algas entre outros. Entre estes organismos a biomassa de fungos parece possuir a produção mais barata, através da utilização de técnicas relativamente

simples de fermentação e meios de cultivo de baixo custo. Uma grande quantidade de biomassa de fungo gasto por vários processos de fermentação industrial também podem ser utilizadas no tratamento de efluentes têxteis (FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T., 2002). Em contrapartida, apesar de estes organismos mostrarem um excelente potencial de descoloração sua aplicação comercial como biosorvente ainda não é praticável devido a problemas associados com a sua fisiologia (IQBAL, M.; SAEED, A., 2007).

Quando comparada com outros métodos de adsorção encontramos as seguintes porcentagens relacionadas a este potencial: biomassa (51%), troca aniônica (48%), carbono ativado (37%), quitosana (34%), quitina (7%), troca catiônica (4%).

A capacidade de biosorção depende de vários fatores como o tipo da biomassa (espécie e idade), tipo do sorvente, presença de outros íons competidores, métodos de preparação da biomassa (condições da cultura) e ainda fatores físicos químicos como temperatura, pH e concentração iônica.

Estudos revelam que o uso de biomassa morta parece ser mais eficaz comparado com a biomassa viva, uma vez que a natureza tóxica dos íons de poluentes não surtem efeito no processo de sorção (MAURIA, N.S.; MITTAL, A.K.; ROTHER, E., 2006).

## 2.6 DESCRIÇÃO DE MICRORGANISMOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

### 2.6.1 MICRORGANISMOS

O fungo *Heteroporus biennis* (Figura 2) pertence à família Polyporaceae, e habita substratos como árvores caídas ou madeira enterrada. Esta espécie foi uma das cepas utilizadas por Suay, I. *et al.*, (2000), a qual testou a atividade antifúngica, antiviral e antibactericida destas. *H.biennis* apresenta atividade bactericida contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Não há antecedentes

de aplicação na biodegradação de poluentes nem estudos sobre a presença de enzimas lignolíticas no mesmo.



FIGURA 2 – FOTO DE *Heteroporus biennis*  
FONTE: SCHADECK, R. 2006

Os isolados 002 e 003 não possuem ainda identificação, mas resultados preliminares mostraram atividade descolorante e de biosorção de corantes têxteis respectivamente (CAMPOS, R., 2009).

## 2.7 RESULTADOS ANTERIORES

No trabalho de CAMPOS, R., 2009 foi observada a atividade biodegradativa de *Heteroporus biennis* e da cepa 002 para o corante Remazol Azul. Houve uma diferença na eficiência de degradação quando a cepa 002 foi cultivada em meios diferentes, apresentando eficiência máxima quando em meio líquido, enquanto que *H. biennis* teve seu potencial maximizado tanto no meio líquido quanto em meio sólido. O potencial de degradação do corante é devido à atividade enzimática, os testes de oxidação usando substratos aromáticos sugerem que as enzimas envolvidas são da classe das peroxidases dependentes de manganês. Já a cepa 003, embora carente de atividade de biodegradação, manifestou uma alta capacidade de biosorção de corantes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL GERAL

Com o intuito de determinar as melhores condições de produção de atividade descorante a cepa *Heteroporus biennis* foi crescida em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Após escolhidos as melhores fontes, foi avaliado o efeito da suplementação com sulfato de cobre e de manganês. Tal suplementação foi realizada também para a cepa 002 (Figura 3).

Já para o fungo 003 foi realizada a caracterização do processo de biosorção verificando sua dinâmica em diferentes condições como micélio liofilizado X micélio úmido X micélio seco, pH, concentração de sal, concentração de corante e variações da temperatura. E, por fim, a tentativa de esclarecer se o micélio possuiria capacidade de incorporar ou somente fazer ligações externas com o corante (Figura 3).

### 3.1.1 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

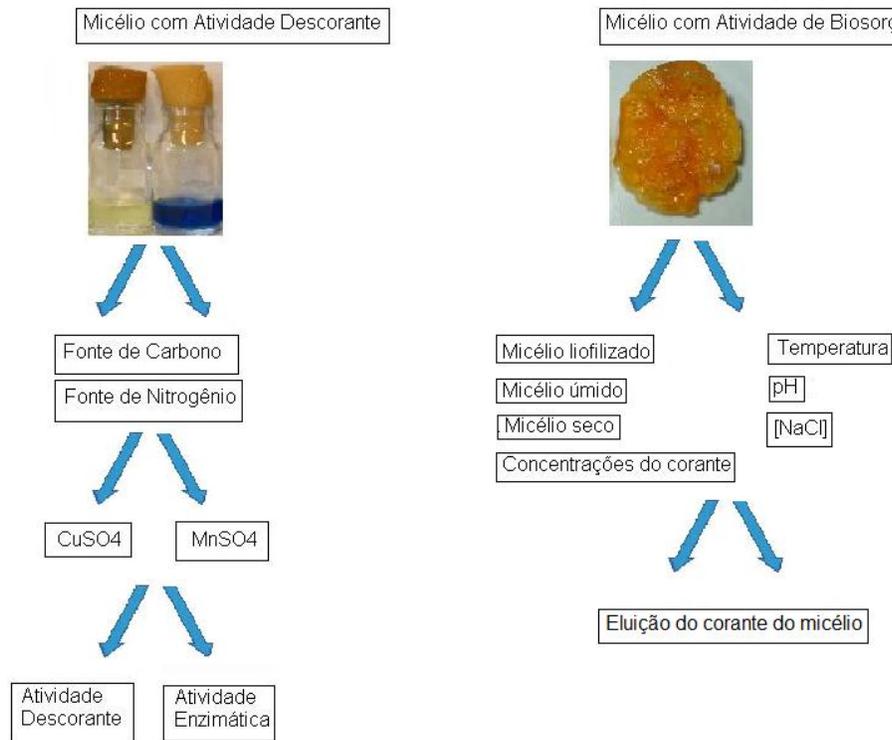


FIGURA 3 – FLUXOGRAMA  
 FONTE: O autor (2009)

### 3.2 CORANTES TÊXTEIS

O corante têxtil utilizado nos experimentos de biodegradação foi o Remazol azul, fornecido pela empresa Dystar®, localizada em São Paulo, possui o nome de Reactive Blue 220 de acordo com a nomenclatura fornecida pela Colour Index International sendo seu nome técnico Azul Brilhante Remazol BB 133% gran.

Já para os ensaios de biosorção foram utilizados nove corantes fornecidos pela empresa Siderquímica® localizada no município de São José dos Pinhais e correspondem aos respectivos nomes: Amarelo Sidercron HE4R, Amarelo Sidercron HE6G, Azul Sidercron PFNG 200%, Azul Sidercron VSBB 133%, Crimson Sidercron

HEXL, Preto Sidercron RC, Vermelho Sidercron BF3SR 150%, Vermelho Sidercron HE7B, Vermelho Sidercron PF3B.

### 3.3 ESPÉCIMES E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

As espécies utilizadas nos ensaios de biodegradação foram duas: O fungo *Heteroporus biennis* obtido em coleta de campo pela professora Ruth Schadeck do departamento de Biologia Celular da UFPR, e uma linhagem ainda não identificada isolada do ambiente, nas dependências do laboratório de biodegradação da Bioquímica da UFPR, denominada 002.

Para os ensaios de biosorção o fungo utilizado corresponde a cepa ainda sem identificação, denominada 003 isolada do ambiente nas dependências do laboratório de biodegradação da bioquímica da UFPR.

As culturas foram mantidas em placas de Petri em dois tipos de meio: BDA (batata-dextrose ágar) e meio mínimo sólido (MMS), o qual contém:  $\text{NaNO}_3$  (6,0 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g/L),  $\text{KCl}$  (0,5 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,02 g/L), Glucose (10,0 g/L), Ágar (10,0 g/L), incubadas a 28°C na ausência de luz e repicadas periodicamente.

### 3.4 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO

#### 3.4.1 Inoculação de culturas e obtenção de amostras

A partir de culturas crescidas em MMS durante sete a dez dias foram retirados fragmentos de tamanho padronizado usando *punch* de biopsia estéril, de quatro mm de diâmetro. As replicas dos ensaios consistiram em vidros contendo cinco mL de meio líquido ou sólido contendo o corante, cada um deles inoculado com quatro *plugs* de micélio de tamanho padrão e incubados a 28 °C. Todos os

ensaios foram feitos em quadruplicata. Após 15 dias de incubação foram retiradas as amostras para análise. Nas culturas em meio líquido foi feita a centrifugação das amostras a 5000 rpm por cinco minutos (centrifuga Hsiangtai Machinery Ind.C. Ltda, modelo MCD-2000) e o sobrenadante retirado para medição da absorbância, atividade descorante e atividade de enzimas lignolíticas (espectrofotômetro Spectrumlab 22PC). Para as culturas realizadas em meio sólido foi feita a eluição das substâncias contidas no meio de cultivo colocando 2 mL de meio sais (meio sais tem a mesma composição do MMS, porém sem o  $\text{NaNO}_3$ ; Glucose 10,0 g/L e ágar bacteriológico 10,0 g/L) e agitando os vidros em um agitador mecânico (CERTOMAT MO B. Braun Biotech International) por quinze minutos a 150 rpm. Após esse intervalo, foi retirada a fase líquida, adicionados mais 2 mL do meio sais e repetido o procedimento. As fases líquidas coletadas foram guardadas para posterior análise.

### 3.4.2 ENSAIOS DE DESCOLORAÇÃO

Dois tipos de ensaios foram realizados: o ensaio de descoloração em cultura e o ensaio de atividade descorante. No ensaio de descoloração em cultura, foi avaliada a degradação do corante quando o fungo crescia na presença deste no meio de cultura. Os cultivos do microrganismo foram monitorados através da medição da absorbância do corante em sobrenadantes e eluídos dos mesmos em 260 e 600 nm após 15 dias de incubação. A percentagem de descoloração foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ descoloração} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{cultura}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

De outro lado, os ensaios de atividade descorante avaliaram a capacidade de descorar uma solução padrão de corante, presente em sobrenadantes e eluídos de culturas onde o fungo cresceu. Para isto, um ml de sobrenadante/eluído era misturado com 100  $\mu\text{L}$  de solução de corante 1,1 g/L e aferida a absorbância a 600 nm em intervalos de 30 minutos durante 90 minutos.

### 3.4.3 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção de atividade descorante

Para o *Heteroporus biennis*, foram testadas seis fontes de carbono (glucose, sacarose, maltose, amido, frutose e glicerol) em três concentrações diferentes (5 g/L; 10 g/L e 15 g/L).

Para os meios de cultivo líquido, a composição foi a mesma já descrita para o MML, a única variação foi a substituição da glucose por uma das outras fontes de carbono citadas, bem como a variação na concentração das mesmas. Após o período de incubação foram feitas as análises espectrofotométricas de atividade descorante. O micélio foi retirado com o auxílio de uma alça de plástico para serem acomodados em eppendorfs previamente pesados e identificados. O sobrenadante foi transferido para tubos falcon também identificados, para realizar a atividade descorante, descrita acima.

Os eppendorfs contendo o micélio foram levados até a estufa de secagem a 50 °C overnight. Em seguida uma nova pesagem foi feita e do novo valor foi descontado o peso anterior, nos revelando o peso do micélio. O que permitiu avaliar se a atividade de descoloração estava relacionada com o tamanho da massa micelial ou não.

Determinada a melhor fonte de carbono, foram testadas seis fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, uréia, cloreto de amônia, tartarato de amônia, oxalato de amônia e peptona) em três concentrações diferentes (5 g/L; 10 g/L e 15 g/L).

Este experimento foi montado à semelhança daquele realizado para as fontes de carbono. Porém, os meios de cultivo dos frascos continham a melhor fonte de carbono obtida do experimento anterior juntamente com sua concentração, variando apenas a fonte de nitrogênio. Todos os cultivos realizados em MML foram submetidos à verificação da atividade descorante dos micélios e foram determinados os pesos secos destes. Estes experimentos permitiram elucidar o meio de cultivo onde a atividade descorante era maximizada.

### 3.4.4 Efeito da suplementação com sulfato de cobre e manganês na atividade descorante

Culturas do fungo em meios otimizados para carbono e nitrogênio foram suplementados separadamente com sulfato de cobre ou manganês (0,1 e 0,5 mM), crescidas durante 15 dias e determinada a atividade descorante assim como a presença de LMEs nos sobrenadantes e eluídos.

### 3.4.5 Atividade de enzimas modificadoras de lignina, LME<sub>s</sub>

A presença de MnP, MiP e lacase foi determinada pelo teste de oxidação de ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico) (Jordann e Leukes (2003). Em cada ensaio 250 µL de sobrenadante/eluído foram incubados na presença de íons manganês, peróxido de hidrogênio e substrato (tabela 1). A oxidação do substrato foi monitorado por mudanças da absorbância a 420 nm nos tempos de 0 a 15 minutos.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DOS QUATRO ENSAIOS USADOS PARA CARACTERIZAR E MEDIR A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

<b>ENSAIO</b>	<b>Sulfato de Manganês 20 Mm</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05 mM</b>	<b>Catalase 200 U/L</b>	<b>EDTA 20 Mm</b>	<b>ABTS 0,05 mM</b>	<b>Tampão Acetato (pH 5,0) 50 mM</b>
<b>MnP</b>	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
<b>MiP</b>	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
<b>Lacase</b>	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim

FONTE: Adaptado de JORDAAN, J.; LEUKES, W.D.,(2003)

### 3.4 ENSAIOS DE BIOSORÇÃO

Para caracterizar a atividade de biosorção do fungo foi realizada uma série de testes relacionados a diferentes condições como:

- Efeito sobre diferentes tipos de corantes têxteis;
- Uso de micélio fresco versus micélio seco;
- Cinética de descoloração ao longo do tempo
- Efeito da quantidade de micélio;
- Efeito da temperatura, pH, concentração de sal;
- Efeito da concentração de corante;

Foram utilizadas duas condições para a determinação do potencial de biosorção da cepa 003, o de descoloração em cultura e o de descoloração diretamente em soluções do corante na ausência de nutrientes. No primeiro método o fungo foi incubado em meio mínimo líquido contendo por separado cada um dos corantes descritos acima (0,1 g/L) e após 15 dias de crescimento era verificada a absorbância do meio após centrifugação. Após verificar o efeito do micélio sobre os diferentes corantes, foi escolhido um deles para dar a continuidade à caracterização do processo.

Para os ensaios de descoloração diretamente sobre soluções de corante e na ausência de nutrientes, fragmentos de tamanho padronizado do micélio eram adicionados a vidros contendo 10 mL de solução de corante em meio de sais, incubados durante tempos predeterminados e após centrifugação verificada a absorbância dos mesmos.

#### 3.3.1 Efeito do tratamento do micélio

Para analisar o potencial de descoloração em cultura, foram retirados, após o cultivo das cepas em placas de Petri com MMS padrão, pequenos círculos deste meio de cultivo (plugs) utilizando o “punch” juntamente com o micélio crescido os quais eram inoculados em vidros estéreis contendo 5 mL de meio mínimo líquido

(MML) que dissolvia os corantes a serem testados (SIDERQUÍMICA), chegando a uma concentração final de 0,1 g/L. Este ensaio foi realizado em quadruplicata com três controles não inoculados, após 15 dias de incubação a 28 °C foram feitas as análises espectrofotométricas para avaliar o potencial de descoloração.

Já para a análise de descoloração diretamente sobre soluções de corante e na ausência de nutrientes, foi feito um teste com os micélios em três diferentes condições. Logo após seu crescimento, foram submetidos a liofilização por 24 horas, à secagem por 24 horas em temperatura ambiente, próximo a um papel filtro, e, na última condição, o micélio continuou úmido, ou seja, o experimento foi realizado logo após a retirada deste do meio de cultivo. Assim será possível avaliar se a porcentagem de absorção alterava-se. Utilizaram-se os micélios cultivados em 100 mL de MML, citado acima, os quais foram realizados vários plugs circulares com o auxílio de um tubo de ensaio de nove mm de diâmetro, estes plugs foram incubados em frascos, os quais continham 5 mL da solução do corante a ser testado, dissolvido em meio sais, resultando na concentração final de 0,1 g/L. A medição da absorbância realizou-se após 12 horas e 32 horas. A massa micelial seca foi determinada como descrita anteriormente.

Tal experimento visou observar se o estado do micélio (liofilizado, seco ou úmido) iria influenciar na biosorção do fungo.

### 3.3.2 Efeito da quantidade de massa micelial na descoloração

Após obter o resultado de qual tratamento micelial foi mais eficiente, este foi fixado nos ensaios posteriores. Então foi necessário determinar a massa micelial necessária para obter índices de descoloração superiores a 50% em um tempo não maior a 6 horas.

Os plugs padronizados foram incubados com a mesma solução do corante a ser testado dissolvido em meio sais, resultando na concentração final de 0,1 g/L.

A variável neste ensaio se trata do número de plugs colocados em cada tubo da série. Foram realizadas seis séries, a primeira contendo somente um plug, a

segunda contendo dois plugs, a terceira contendo quatro e seguindo a sequência de seis, oito e finalmente dez plugs. Após obter o resultado deste experimento foi fixado o número de plugs para os ensaios posteriores. A leitura dos resultados foi feita após seis horas, a escolha deste tempo para a realização de leitura, deve-se ao fato de que tempos maiores não seriam de interesse para a indústria devido aos grandes volumes de água com corante que seriam manipulados. Cada ensaio foi realizado em triplicata com dois controles não inoculados, tal procedimento foi realizado nos três ensaios posteriores. Para obter a certificação do peso do micélio, foram acomodados papéis filtro na estufa a 50 °C durante 24 horas, os quais foram identificados e pesados. Após a leitura da absorbância a amostra foi filtrada, sendo que os filtros retornaram à estufa e finalmente foram pesados. Tal procedimento foi realizado nos três ensaios posteriores.

### 3.3.3 Efeito do pH e temperatura no potencial de biosorção

O mesmo procedimento de cultivo e corte do micélio foi utilizado neste ensaio, sendo o corante dissolvido em meios sais 0,1 g/L. Esta solução foi calibrada em diferentes pHs (2 a 9) e colocada em contato com o micélio. Deu-se continuidade ao ensaio, verificando se a temperatura iria influenciar na taxa de absorção, sendo elas 28, 35 e 45 °C (três séries). Depois de mantidos por 6 horas em suas respectivas estufas, foi realizada a leitura da absorbância.

O objetivo do experimento foi observar se a eficiência de biosorção era alterada pela manipulação do pH e temperatura.

### 3.3.4 Efeito da concentração de sal no potencial de biosorção

Este ensaio segue o protocolo de cultivo e corte do micélio citado acima, sendo a variável neste ensaio o fato de possuir diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl). Foram realizadas cinco séries, na primeira foi inserida uma concentração de 0,25 M, aumentando para 0,5 M, 0,75 M, 1 M e finalmente 1,5 M.

O objetivo destes ensaios foi observar se o fungo possuía a capacidade de bioissorver em diferentes concentrações salinas, inclusive nas mais altas, as quais são vistas nas indústrias.

### 3.3.5 Efeito da concentração de corante no potencial de biosorção

Para a avaliação do efeito da concentração do corante, este foi testado em seis concentrações 0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L. Tais soluções foram distribuídas e colocadas em contato com o micélio durante 6 horas e determinada a absorvância dos sobrenadantes.

### 3.5.6 Tratamento do micélio após biosorção

Para este experimento foram utilizadas as seguintes soluções: NaCl 2 M , tampão fosfato 50 mM com pH 3 e 9 e os micélios coloridos obtidos no ensaio de biosorção. Quatro eppendorfs contendo os micélios de cada corante entraram em contato com cada uma dessas soluções e três eppendorfs que continham somente as soluções, serviram como controle. Após seis horas realizou-se a análise.

Um segundo teste foi feito utilizando os mesmos métodos, mas com diferentes soluções, HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M e acetona 70%. Este experimento teve como objetivo verificar a possibilidade de remover o corante absorvido pelo fungo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ATIVIDADE DESCORANTE DA CEPA *HETEROPORUS BIENNIS*

#### 4.1.1 Resultados anteriores

Resultados prévios mostraram que *H. biennis* possui atividade biodegradativa do corante têxtil Remazol Azul, sendo sua cinética de descoloração semelhante quando cultivado em meio mínimo líquido ou sólido (Gráfico1).

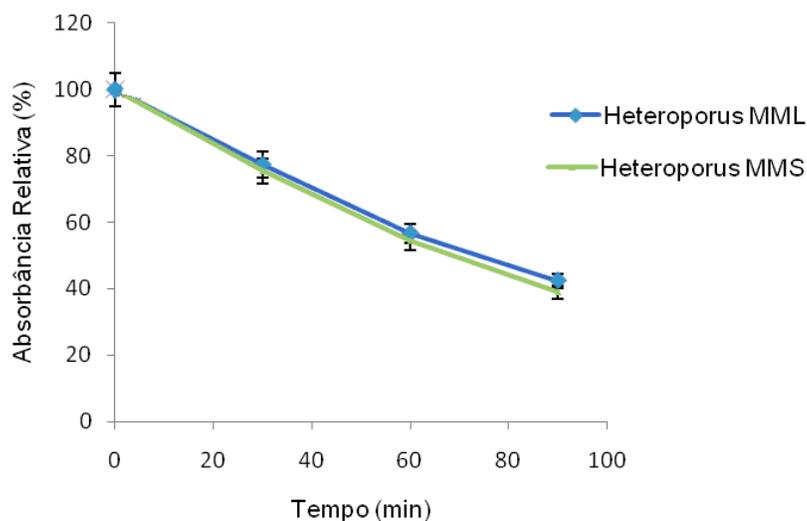


GRÁFICO 1- DESCOLORAÇÃO DE RB220 POR *H. biennis* EM MML E MMS  
FONTE: CAMPOS, R. (2009)

#### 4.1.2 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio

O primeiro experimento foi uma seleção das melhores fontes de carbono *H. biennis* em MML, uma vez que sua atividade descorante neste meio era igual ao MMS. Este experimento tinha por objetivo analisar se a mudança na fonte de carbono produziria alguma alteração na descoloração ou na atividade descorante.

Neste experimento os fungos foram crescidos separadamente em meios contendo seis fontes de carbono: glicose, sacarose, maltose, amido, frutose e glicerol em concentrações de 5; 10 e 15 g/L. Após 15 dias de incubação foi medida a degradação do corante na cultura e a atividade descorante contida nos sobrenadantes.

Ao final dos 15 dias a maioria dos meios haviam sido descorados visualmente como mostra a figura 4.

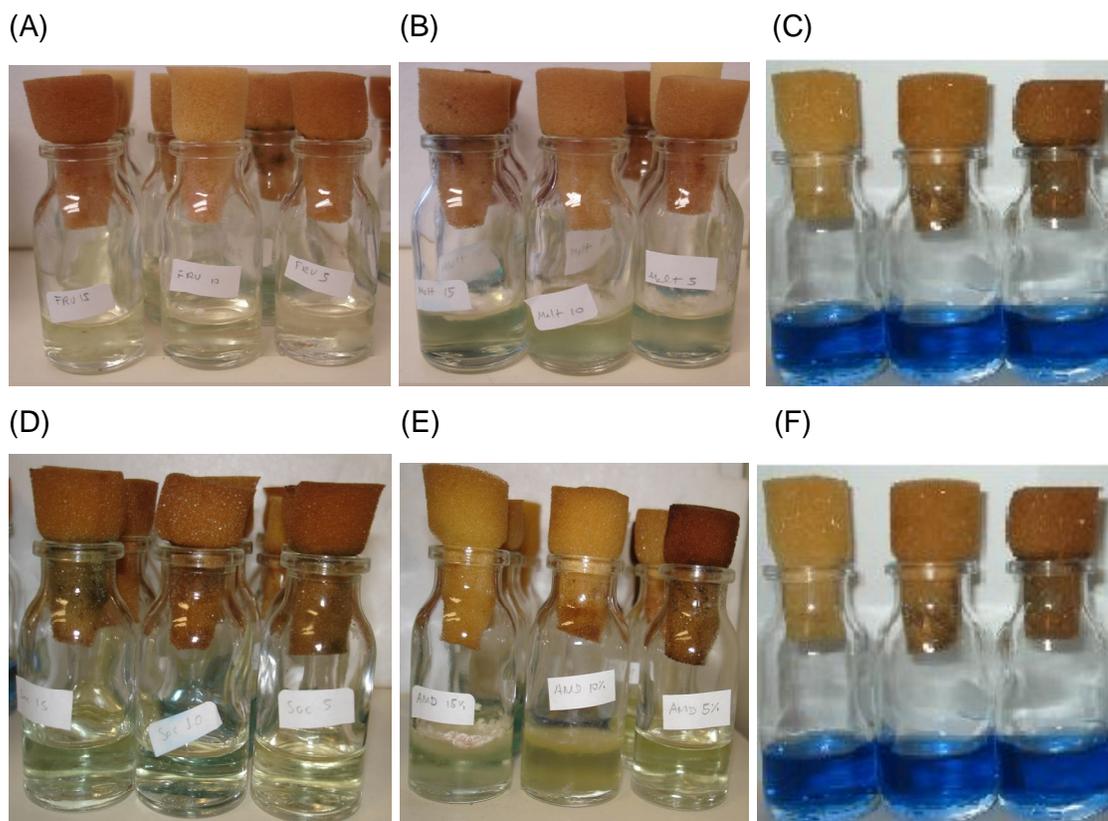


FIGURA 4 – FOTO DO EXPERIMENTO DE SELEÇÃO DAS FONTES DE CARBONO COM REMAZOL AZUL APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO. As fotos indicam a fonte de carbono frutose (A) e suas concentrações de 5 g/L, 10 g/L e 15 g/L, seguida das fontes maltose (B), sacarose (D) e amido (E). Os controles estão representados pelas letras (C) e (F).  
FONTE: O autor (2009)

E tal descoloração visual pode ser confirmada através das porcentagens de descoloração em cultura (Gráfico 2).

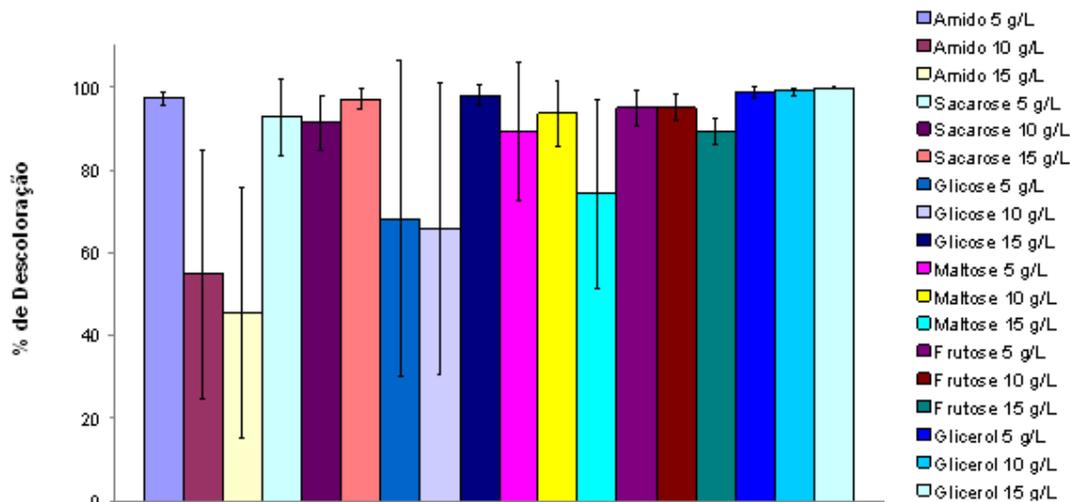


GRÁFICO 2 – DESCOLORAÇÃO EM CULTURA DO RB220 POR *H.biennis* EM MEIOS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO  
 FONTE: O autor (2009)

Quando medida a atividade decolorante ou capacidade de eluídos/sobrenadantes de culturas decolorarem soluções de RB220 em 90 minutos foi observado que a fonte de carbono maltose nas concentrações de 5 g/L e em seguida a de 10 g/L se mostraram nitidamente como sendo as melhores, possuindo uma porcentagem de decoloração de quase 90%. Sendo as menos eficientes fontes de carbono a sacarose com concentração de 5 g/L e a de 10 g/L (Gráfico 3). Comparando-se a fonte onde foi maximizada a atividade decolorante com a fonte presente no meio mínimo original (glicose 10 g/L) aquela obteve uma melhora de aproximadamente 300% em relação a esta.

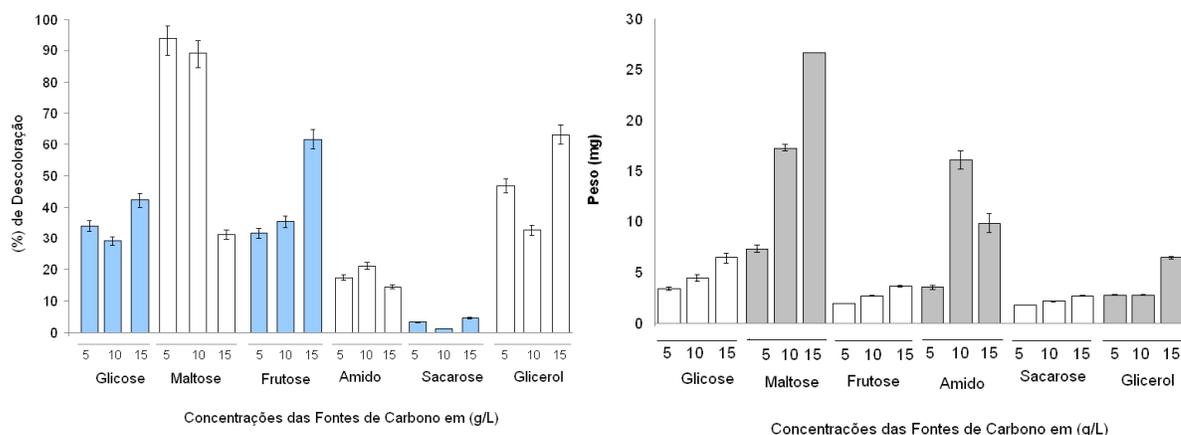


GRÁFICO 3 – EFEITO DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DESCORANTE (ESQUERDA) E NO CRESCIMENTO DE *H.biennis* (DIREITA)  
 FONTE: O autor (2009)

Quando analisa-se a variação na massa fúngica, verifica-se um aumento da mesma à medida que a quantidade de carbono disponível aumenta. Mas este aumento não está vinculado à atividade descolorante. Assim, as condições onde houve maior crescimento do fungo (por ex. maltose 15 g/L) não correspondem às melhores condições para a produção de atividade descolorante (Gráfico 3).

Após fixar a melhor fonte de carbono para o fungo, ou seja, em qual delas o fungo apresentava maior atividade descolorante, foi necessário determinar também qual era a melhor fonte de nitrogênio, visando assim maximizar a produção de atividade descolorante. O procedimento para a realização deste experimento foi o mesmo citado para as fontes de carbono só que, desta vez, utilizando fontes de nitrogênio. Foram testadas seis fontes, nitrato de sódio, cloreto de amônia, tartarato de amônia, oxalato de amônia, uréia e peptona bacteriológica.

Como observado acima, a fonte de carbono maltose com concentração 5 g/L mostrou ser a melhor dentre as outras, então esta foi fixada, variando-se apenas as fontes de nitrogênio.

Após os 15 dias de incubação todas as culturas apresentaram-se descoloradas, exceto aquelas contendo nitrato de sódio nas concentrações 10 e 15 g/L, uréia nas três concentrações e peptona 15 g/L. Em relação à análise das fontes, a peptona mostrou possuir, ao final do experimento, uma cor esverdeada ou amarelada, adicionado ao fato de apresentar grande viscosidade, o que dificultou sua análise (Gráfico 4).

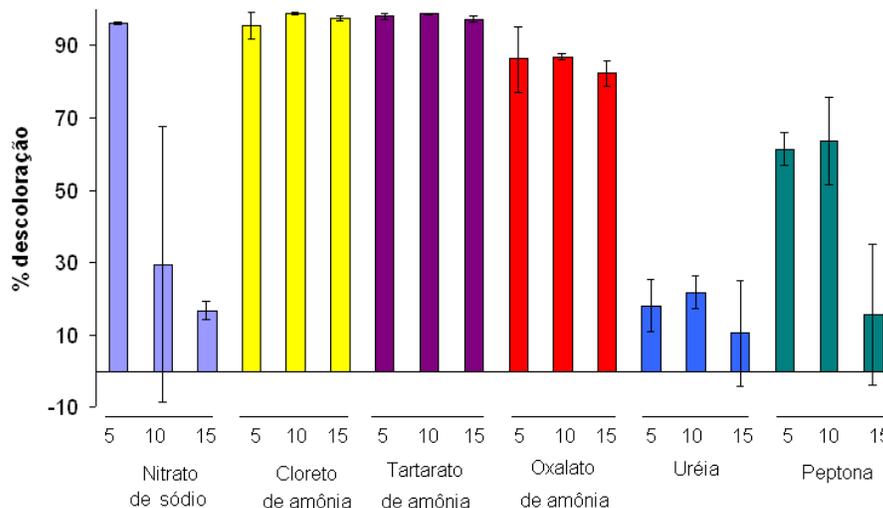


GRÁFICO 4 – DESCOLORAÇÃO EM CULTURA DO RB 220 POR *H. biennis* EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO  
 FONTE: O autor (2009)

A atividade descorante mostrou-se alta principalmente nos meios contendo cloreto e tartarato de amônia e nitrato de sódio 5g/L (Gráfico 4). Neste experimento os pesos secos das amostras foram aferidos, os quais parecem ter mantido seu tamanho na mesma fonte entre concentrações diferentes, exceto na fonte nitrato de sódio. A turbidez apresentada nas fontes de uréia e peptona impossibilitou a pesagem destes micélios.

Assim como no experimento com fontes de nitrogênio, o crescimento fúngico não esteve diretamente atrelado à produção de atividade descorante. Tomando como base os dados do nitrato 5 g/L que correspondem à fonte de nitrogênio e concentração original do meio mínimo pode-se deduzir que nenhuma das outras fontes melhorou a produção de atividade descorante, atingindo, no melhor dos casos, o mesmo valor (ex. tartarato e cloreto de amônia) da original (Gráfico 5).

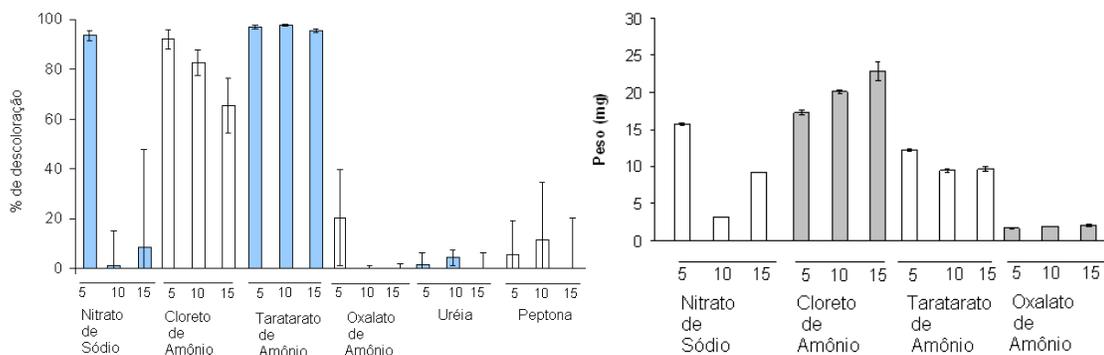


GRÁFICO 5 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO E FONTE DE NITROGÊNIO NA ATIVIDADE DESCORANTE E NO CRESCIMENTO DO MICÉLIO EM *H.biennis* APÓS 90 MIN (ESQUERDA) E CRESCIMENTO DE *H.biennis* EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO (DIREITA)  
FONTE: O autor (2009)

#### 4.1.3 Suplementação com sais de cobre e manganês

A investigação do fato de que a suplementação com  $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{MnSO}_4$  favoreceria a produção de enzimas lignolíticas, foi testada inicialmente em *Heteroporus biennis* em meio sólido otimizado com glicerol 10 g/L, tartarato de amônia 10 g/L e Agar 10 g/L. Na análise da atividade descorante, o sobrenadante derivado de culturas suplementadas com  $\text{MnSO}_4$  mostra uma melhora na

porcentagem de descoloração em relação à amostra não suplementada ao final de 90 minutos. A suplementação com cobre não melhorou a produção de atividade decolorante derivada das culturas (Gráfico 6). Os resultados foram analisados pelo teste estatístico ANOVA.

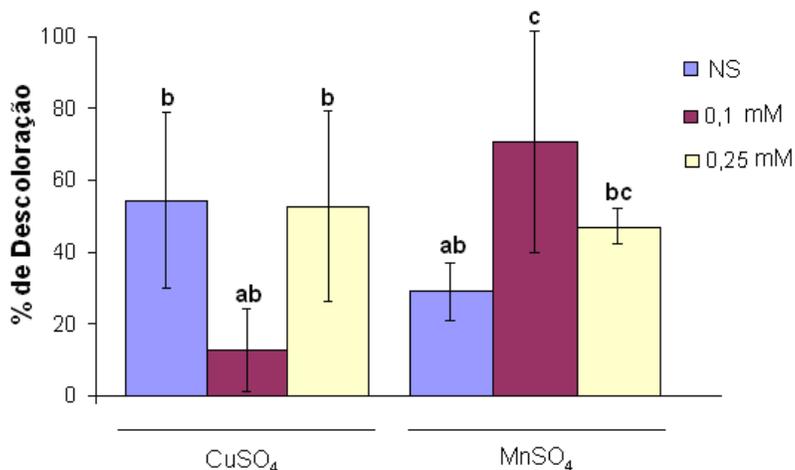


GRÁFICO 6 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM COBRE E MANGANÊS NA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DESCORANTE DE *H.biennis*. Análise após 90 minutos, em meio sólido otimizado com glicerol 10 g/L, tartarato de amônia 10 g/L e Agar 10 g/L.  
 FONTE: O autor (2009)

O último experimento realizado com *Heteroporus biennis* em meio sólido foi para avaliar se as suplementações citadas acima produziram um aumento na expressão de enzimas lignolíticas (LME). Nas culturas não suplementadas ou suplementadas unicamente com MnSO<sub>4</sub> encontrou-se oxidação do ABTS majoritariamente quando na presença de íons manganês e peróxido de hidrogênio, sugerindo atividade de uma peroxidase dependente de manganês (MnP). A atividade remanescente na ausência de peróxido de hidrogênio e íons manganês sugere a presença de uma lacase (Gráfico 7).

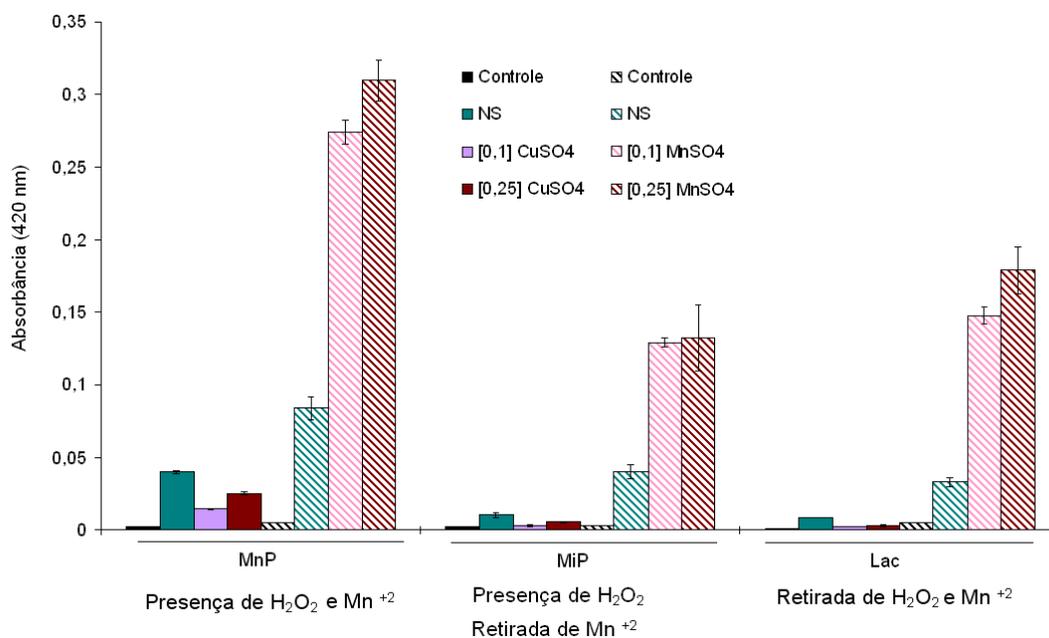


GRÁFICO 7 – ATIVIDADE DE LMES EM *H. biennis* EM MS OTIMIZADO (glicerol 10 g/L e tartarato de amônia 10 g/L) com suplementação de CuSO<sub>4</sub> e MnSO<sub>4</sub> após 15min.  
 FONTE: O autor (2009)

A suplementação de MnSO<sub>4</sub> em *Heteroporus biennis* aumentou a atividade total de oxidase de ABTS (MnP e lac) embora o perfil UV do RB220 após descoloração não foi alterado pela suplementação (Gráfico 7 e 8).

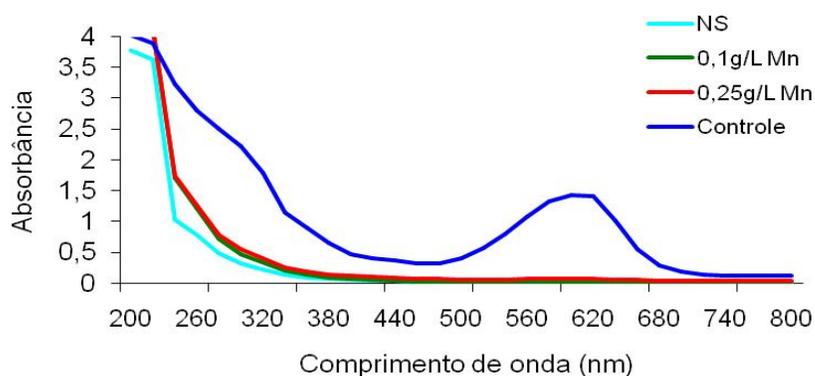


GRÁFICO 8 – PERFIL DE UV DE 200 A 600 NM EM *H.biennis*  
 FONTE: O autor (2009)

Já utilizando meio líquido otimizado com maltose 5 g/L e cloreto de amônio 10 g/L segue-se com a suplementação de  $\text{MnSO}_4$  e  $\text{CuSO}_4$ , para *Heteroporus biennis*. A atividade decolorante revela que em 90 minutos os três tipos de amostra possuíram uma eficiência próxima de 100%. Não havendo diferenças significativas entre as amostras suplementadas e não suplementadas (Gráfico 9).

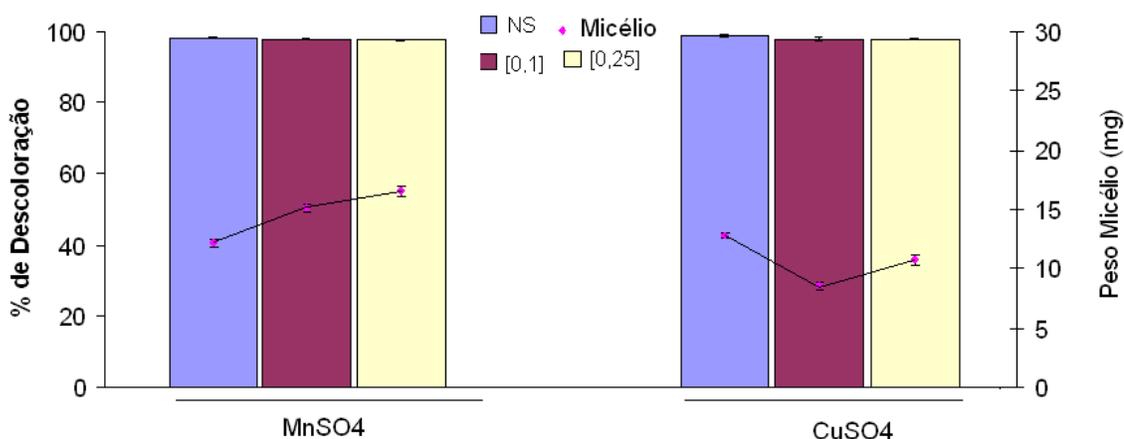


GRÁFICO 9 – PORCENTAGEM DE DESCOLORAÇÃO EM *H. biennis*. Crescimento em MML com suplementação de  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{MnSO}_4$  no ensaio de atividade decolorante após 90 minutos. FONTE: O autor (2009)

## 4.2 ATIVIDADE DESCORANTE DA CEPA 002

### 4.2.1 Resultados anteriores

Resultados prévios mostraram que a cepa 002 possui atividade decolorante e que esta é maior em sobrenadantes de MML em relação a eluídos de MMS (Campos, 2009) (Gráfico 10). A partir dessas informações foram realizados testes de avaliação da suplementação de sulfato de cobre e manganês em MML.

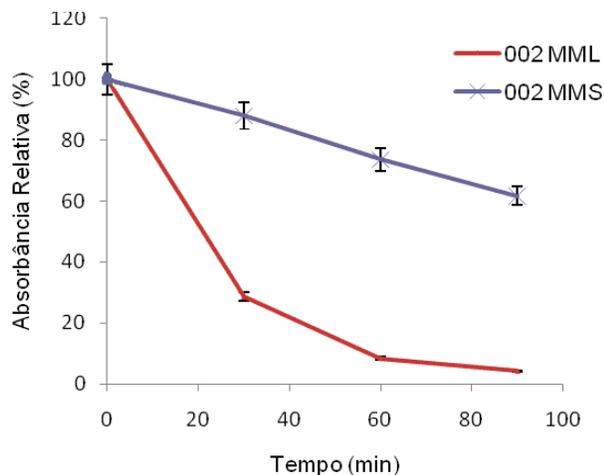


GRÁFICO 10- DESCOLORAÇÃO DE RB220 PELA CEPA 002 EM MML E MMS  
 FONTE: O autor (2009)

#### 4.2.2 Suplementação com sais de cobre e manganês

A suplementação com  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  foi realizada em 002 em meio líquido otimizado com maltose 5 g/L e oxalato de amônia 5 g/L. Ao observarmos o gráfico da atividade descolorante concluiu-se que não houve diferenças significativas entre as amostras não suplementadas, com 0,1 mM e 0,25 mM de sulfato de manganês ao final de 90 minutos, mantendo-se em torno de 93%. A adição de sulfato de cobre obteve uma porcentagem de descoloração de 82%, não havendo também diferenças significativas entre as amostras (Gráfico 11). Os valores citados acima se referem após 90 minutos de atividade descolorante, mas ressalto que com apenas 30 minutos dessa atividade os valores já estavam próximos aos resultados postos acima, variando de 75% com suplementação de  $\text{MnSO}_4$  e 80% para as amostras suplementadas com  $\text{CuSO}_4$ . Embora não tenha havido mudanças na descoloração em 600 nm quando monitoradas as amostras no espectro UV, unicamente aquelas derivadas de culturas suplementadas mostraram diminuição da absorbância em 260 nm, permitindo maior biodegradação (Gráfico 12).

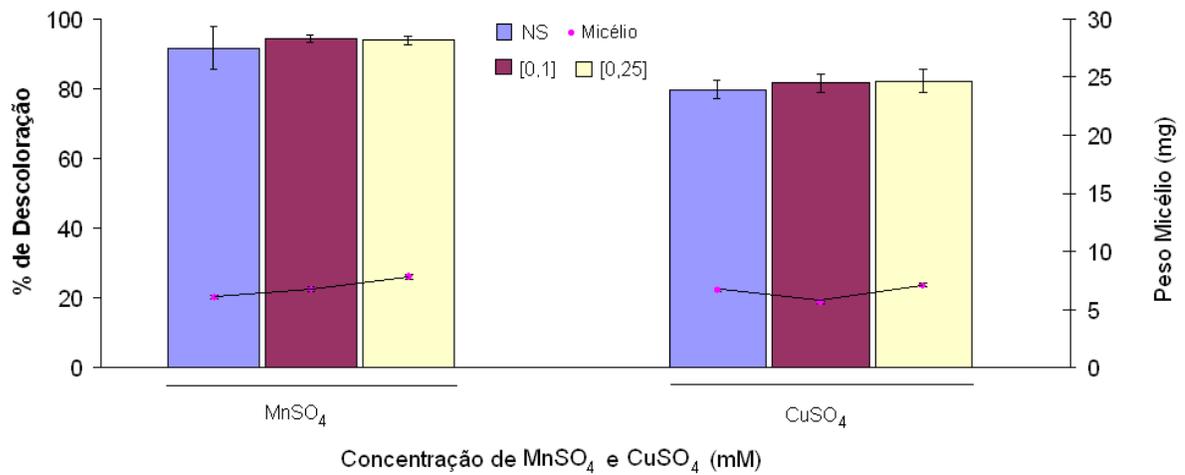


GRÁFICO 11 – PORCENTAGEM DE DESCOLORAÇÃO EM 002 EM MML SUPLEMENTADO COM  $CuSO_4$  E  $MnSO_4$ . Ensaio de atividade decolorante após 90 minutos.  
 FONTE: O autor (2009)

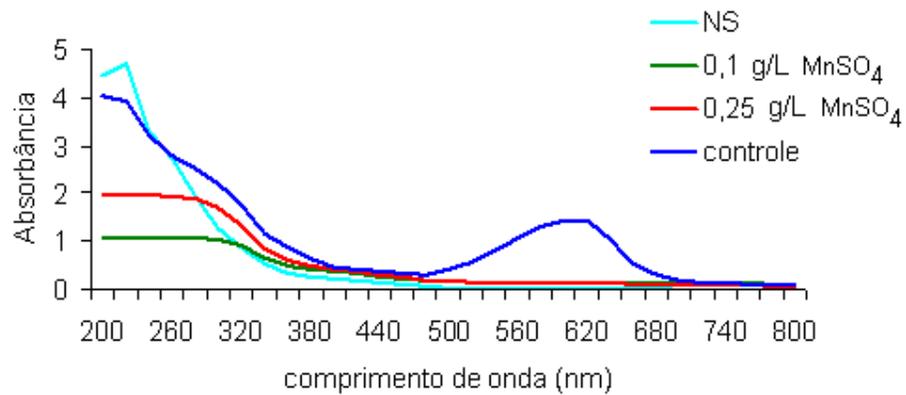


GRÁFICO 12 - PERFIL DE UV DE 200 A 800 NM DE 002  
 FONTE: O autor (2009)

### 4.3 ENSAIO DE BIOSORÇÃO COM A CEPA 003

Uma triagem preliminar mostrou que a cepa 003 apresentava capacidade para absorver diferentes corantes em solução (Figura 5). A partir deste dado, o objetivo foi verificar se diferentes condições como temperatura, pH, concentração de NaCl e concentração de corante influenciaria a eficiência de tal atividade.

O teste inicial foi o de descoloração em cultura contendo nove diferentes corantes, durante 15 dias de crescimento. O resultado deste experimento nos revela que a cepa 003 possui grande capacidade de absorção de todos os nove corantes testados. Como mostra o gráfico 13, a grande maioria das soluções de corantes foi descorada ao redor de 95%, com exceção do PFNG, na qual esta foi ao redor de 60%.

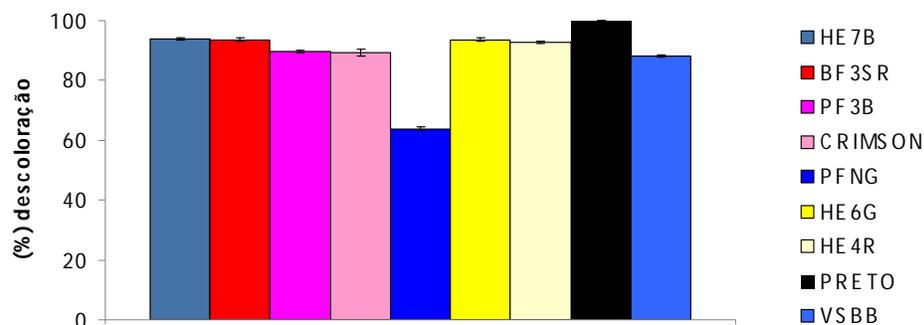


GRÁFICO 13 – PORCENTAGEM DE DESCOLORAÇÃO EM CULTURA DA CEPA 003



FIGURA 5 - FOTO DO MICÉLIO 003 APÓS REALIZAR DESCOLORAÇÃO EM CULTURA

Durante a descoloração em cultura, à medida que o fungo cresce o corante vai sendo absorvido pela massa micelial durante 15 dias. Os experimentos a seguir utilizaram massa micelial crescida anteriormente e adicionada (em diferentes quantidades) a soluções de corante em meio de sais, verificando a descoloração durante 6, 12 ou 32 horas. Então foi avaliado o efeito do pré-tratamento do micélio, quantidade necessária de micélio para encurtar o tempo de monitoramento para 6 horas, e o efeito de outras variáveis como temperatura, pH, concentração de sal e de corante.

O micélio submetido a liofilização não apresentou resultados favoráveis, sua taxa de absorção foi muito baixa, não alterando visivelmente a mudança de cor, tal resultado não foi submetido a leitura espectrofotométrica. Já o micélio úmido mostrou-se mais eficiente que o seco (Gráfico 14).

Ao observarmos os gráficos nota-se que a cepa 003 absorve mais eficientemente o corante HE7B em relação aos outros, sendo então o selecionado para os próximos experimentos.

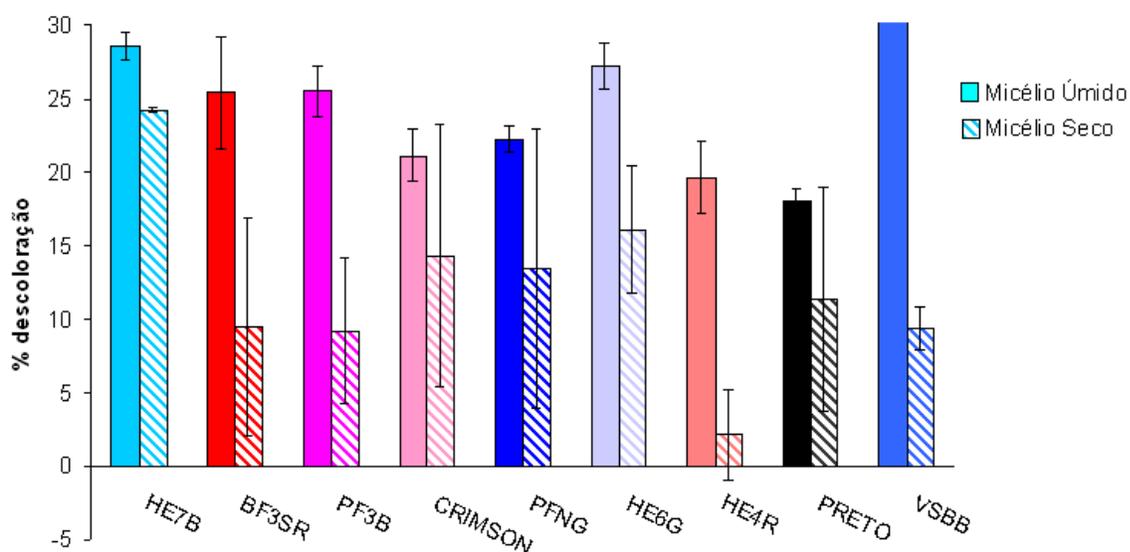


GRÁFICO 14 – DESCOLORAÇÃO DA CEPA 003 EM NOVE CORANTES COM MICÉLIO NA CONDIÇÃO ÚMIDA E SECA. Leitura da absorbância após 12 horas.

Após comprova-se que o micélio úmido foi o mais eficiente em relação aos demais tratamentos, este foi utilizado para os ensaios posteriores juntamente com o corante HE7B, mais suscetível a biosorção pelo fungo. O próximo ensaio refere-se à obtenção da informação da quantidade micelial necessária para absorver o máximo de corante na concentração 0,1 g/L. Chegamos à conclusão de que a amostra que possuía dez plugs mostrou a porcentagem de descoloração mais eficiente dentre as outras, chegando a um valor próximo de 80% comparado com menos de 20% na que possuía um plug. O número de dez plugs foi fixado nos próximos ensaios (Gráfico 15)

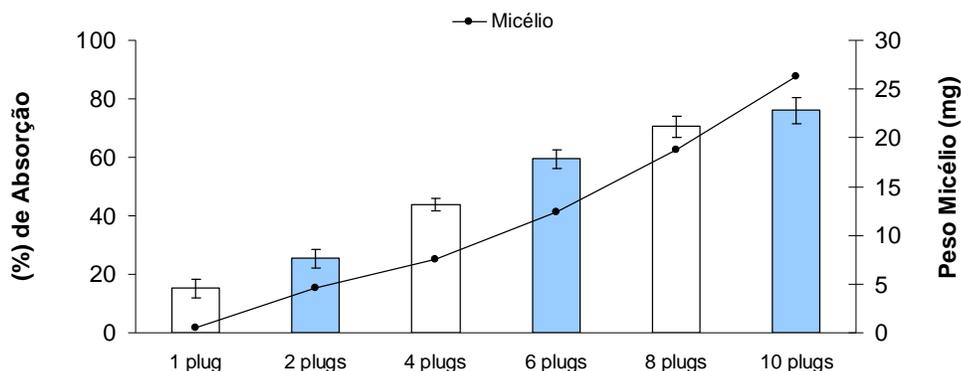


GRÁFICO 15 – PESO DO MICÉLIO X PORCENTAGEM DE ABSORÇÃO DO CORANTE HE7B  
 FONTE: O autor (2009)

Após fixado o número ideal de plugs (dez) no ensaio anterior, foi realizado o presente ensaio visando obter a informação se diferentes concentrações de sal alterariam a descoloração do corante pelo fungo, bem como diferentes pHs. No primeiro ensaio, foram realizadas cinco séries, com as respectivas concentrações de NaCl 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M e finalmente 1,5 M. No segundo experimento, os valores de pH de 2-9 totalizaram oito séries.

Analisando as amostras observamos que o fungo não altera significativamente a sua capacidade de descoloração do meio em diferentes concentrações de cloreto de sódio e pH, mantendo sempre a porcentagem de descoloração ao redor de 80% (Gráfico 16).

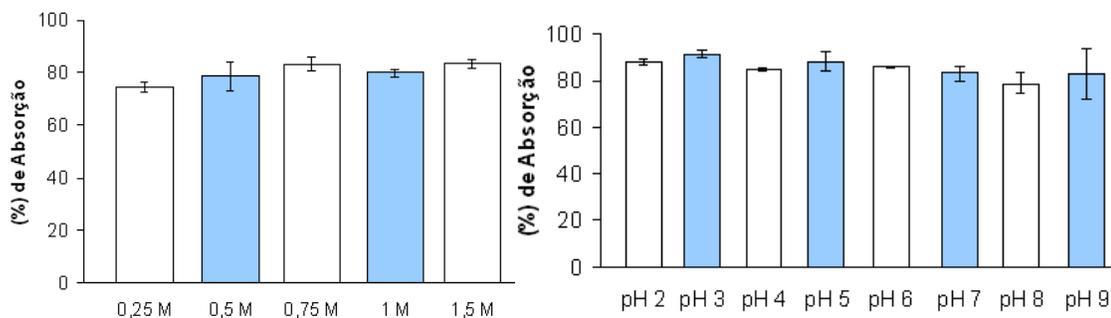


GRÁFICO 16 – CONCENTRAÇÃO NaCl X PORCENTAGEM DE ABSORÇÃO E DIFERENTES (ESQUERDA) E pHs X PORCENTAGEM DE ABSORÇÃO DO CORANTE HE7B (DIREITA)  
 FONTE: O autor (2009)

Por este motivo prosseguiu-se os ensaios utilizando meio saís, o qual contém pH 6,8. Realizou-se, então, o teste de absorção em diferentes concentrações de corante, e temperatura. Seguindo os mesmos procedimentos de cultivo e corte do micélio, dissolveu-se o corante em meios saís resultando diferentes concentrações, 0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L. Tais soluções foram distribuídas em alíquotas de cinco ml e posteriormente colocadas em contato com o micélio.

A leitura do sobrenadante das amostras mantidas em diferentes concentrações de corante mostra que a absorção é muito maior quando este está em baixas concentrações, por exemplo, 0,1 g/L, o qual apresenta em torno de 85% de descoloração, já as concentrações de 0,25 M e 0,5 M reduzem este valor para 70% e 30% respectivamente. As concentrações de um e dois g/L quase não apresentaram nenhuma absorção (Gráfico 17).

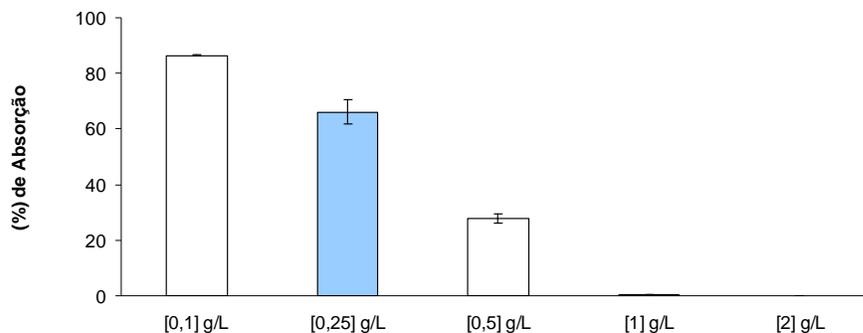


GRÁFICO 17 – DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CORANTE HE7B X PORCENTAGEM DE ABSORÇÃO DO CORANTE HE7B  
 FONTE: O autor (2009)

Uma vez que a descoloração do meio é maior na concentração de 0,1 g/L, fixou-se este valor nos ensaios posteriores. A próxima variável foi a temperatura, objetivando obter a informação se esta iria influenciar na taxa de absorção. Utilizaram-se três temperaturas, 28, 35 e 45 °C (três séries). As amostras mantidas em diferentes temperaturas revelam que a variação desta não alterou significativamente o potencial de descoloração (Gráfico 18).

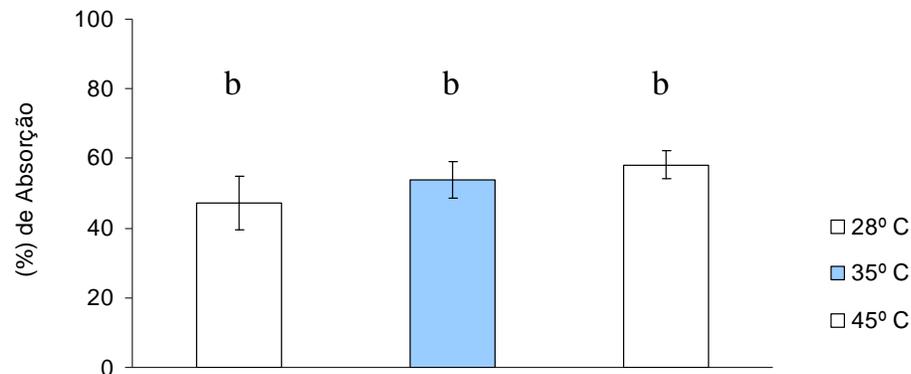


GRÁFICO 18 – DIFERENTES TEMPERATURAS X PORCENTAGEM DE ABSORÇÃO DO CORANTE HE7B

FONTE: O autor (2009)

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 BIODEGRADAÇÃO

Um crescente número de estudos revela a importância das condições e composições do meio em que o fungo com potencial de biodegradação (WRF) é mantido. Tal importância deve ser considerada, uma vez que variações dessas condições influenciam na expressão das enzimas envolvidas na degradação de xenobióticos.

Um amplo número de componentes pode variar no meio, como é o caso das fontes de carbono e nitrogênio bem como suas concentrações e a suplementação com íons metálicos, onde se encaixam o cobre e o manganês (TEKERE, M., *et al.*

2001, YAMANAKA, R. *et al.* 2008, BUSWELL, J.A.; CAI, Y.; CHANG,S.,1995, ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M., 2008).

No trabalho com o principal modelo dos WRF, o *Phanerochaete chrysosporium*, era geralmente aceito que a produção de LMEs se tornava favorecida quando seu crescimento ocorria em meios limitados de nutrientes, como o carbono e o nitrogênio, mas à medida que novas espécies foram sendo estudadas verificou-se que estas condições são extremamente variáveis e particulares a cada espécie ou isolado (BUSWELL, J.A.; CAI, Y.; CHANG,S.,1995). Alguns trabalhos revelam resultados diversos de acordo com as condições testadas, como é o caso de TEKERE, M., *et al.*, (2001), o qual demonstrou em *T. cingulata* e *T. pocas* uma baixa produção de MnP em meio contendo alto teor de carbono e baixa concentração de nitrogênio, ao mesmo tempo a alta atividade desta enzima foi notada para *T. versicolor* quando ambos, carbono e nitrogênio, estavam presentes em altas quantidades. O mesmo trabalho revelou que *T. gallica* requer uma grande quantidade de nitrogênio pra síntese de lacase e MnP. Ainda, BUSWELL, J.A.; CAI, Y.; CHANG,S.,1995, relatou que grande produção de lacase foi observada em altas concentrações de nitrogênio quando comparado com as culturas mantidas em baixa concentração de nitrogênio.

Em relação a mudanças na fonte de carbono, HATVANI, N.; MÉCS, I. (2002) utilizando *Lentinus edodes* observou a mais rápida descoloração com extrato de maltose como fonte e PARK, C. *et al.*, (2007), encontraram maior descoloração quando utilizavam glicerol e frutose como fonte ao invés de glucose. MIKIASHVILI, N. *et al.*, (2005) testaram várias fontes de carbono em *Trametes versicolor* em meio líquido, sendo manose e celobiose os melhores substratos para a produção da mesma enzima. Como fonte de nitrogênio, PRACHI, K.; ANUSHREE, M., (2009) trabalhando com a cepa *A. ochraceus* reportaram um efeito inibitório da peptona, a qual necessitou de 15 dias para descolorir o meio. HATVANI, N.; MÉCS, I., (2002), relatou que a cepa *Lentinus edodes* obteve uma rápida descoloração quando utilizado cloreto de amônia seguido de peptona e extrato de malte.

Os resultados obtidos parecem estar de acordo com tais informações, uma vez que a mudança na fonte de carbono e nitrogênio induz diferenças nas taxas de descoloração do meio para *H. biennis*.

Além de tais mudanças, a suplementação com íons metálicos como cobre e manganês tem mostrado efeito modulador da expressão de LMEs. O íon cobre

forma parte do esqueleto estrutural das lacases enquanto os íons manganês são mediadores necessários para a atividade das MnPs. A presença em baixas concentrações na maioria dos metais não produziu um efeito inibitório na atividade da lacase em *Ganoderma lucidum*, inclusive aumentou quando utilizado metais como o  $\text{Cu}^{+2}$ . Entretanto em altas concentrações na maioria dos metais pesados houve uma redução na atividade desta enzima, novamente com exceção do  $\text{Cu}^{+2}$  (KUMARASAMY, M. *et al.*, 2009).

Em contrapartida, YAMANAKA, R. *et al.*, (2008) mostra que um aumento na concentração de cobre inibe o crescimento de *T. vilosa*, mas estimula a produção de lacase e peroxidases, quando comparada com a amostra sem suplementação.

A utilização do manganês, deve estimular a produção de LMEs, mas o mesmo estudo citado acima revela que este papel algumas vezes mostra-se controverso. Em *P. chrysosporium* a presença desse metal é de fato importante para estimulação de tal enzima, o que não se confirma para *Bjerkandera sp.* Ainda um aumento na concentração de manganês em *T. villosa*, não induziu uma produção de MnP pelo fungo e nenhuma estimulação de lacase foi observada.

A adição de  $\text{MnSO}_4$  em *L. edodes* em diferentes concentrações apresentou uma zona de descoloração igual, mas diferenças na extensão da degradação foram visivelmente observadas, o amarelo brilhante tornou-se laranja em baixas e altas concentrações, sendo que a melhor descoloração ocorreu em uma concentração intermediária. A produção de lacase foi maximizada quando a suplementação foi realizada em altas concentrações, e a expressão de ambas, lacase e MnP aumentou quando em baixas concentrações de  $\text{MnSO}_4$ . (HATVANI, N.; MÉCS, I. (2002).

O resultado obtido neste trabalho indica que a suplementação não alterou a produção de atividade descorante em nenhum dos fungos testados quando monitorada pela absorvância no espectro visível, mas foi observado um aumento da capacidade oxidante total (usando ABTS como substrato) no fungo *H. biennis* em MS, quando adicionada sulfato e manganês. E, ainda, houve diminuição da absorvância no espectro UV unicamente após suplementação de  $\text{MnSO}_4$  para o fungo 002.

## 5.2 BIOSORÇÃO

Vários fatores podem afetar a biosorção, como o tipo e natureza da biomassa, fase de crescimento, nutrientes disponíveis, composição da parede e membrana externa bem como a solubilidade do corante. Assim como fatores relacionados ao meio ambiente como físico-químicos podem interferir na atividade descorante, como é o caso do pH, temperatura, concentração de corante e força iônica (GADD, G.M., 2008, PRACHI, K.; ANUSHREE, M., 2009). Segundo AKSU, Z. (2005), o pH é um dos principais fatores que afetam não somente a capacidade de biosorção. A solução de pH influencia sítios de ligação da superfície da célula com o corante e a química deste na água. Alto nível de descoloração obtido a baixos pHs deve-se a atrações eletrostáticas entre os ânions do corante, e os cátions presentes na superfície da célula. O hidrogênio também age como uma ponte entre as paredes celulares de leveduras e a molécula do corante (BANKS, C.J.; PARKINSON, M.E., 1992, FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T., 2001).

O trabalho de AKZU, Z.; DÖNMEZ, G. (2003) revela que nove espécies de fungos sofreram diferenças na absorção do corante remazol azul quando submetidos a diferentes pHs. A biossorção do corante foi máxima em pH baixo, havendo um decréscimo desta taxa quando o meio se tornava básico.

Em outro estudo, a taxa de biosorção em *A. bisporus* aumentou quando submetido a pHs ácidos, a qual decaiu significativamente quando o pH se tornou básico (AKAR, T., *et al.*, 2009). Contraditoriamente, MAURYA, N.S.; MITTAL, A.K.; ROTHER, E., (2006), utilizando o corante azul de metileno observou um aumento no potencial de biosorção quando se elevava o pH com duas cepas de fungo (*Fomes fomentarius* e *Phellinus igniarius*). No entanto, a absorção de um segundo tipo de corante (Rodamina B) não foi significativamente afetada pelo aumento do pH.

A cepa 003 não apresentou os mesmos resultados, sem haver alteração da atividade descorante em diferentes pHs, o qual se manteve em torno de 80%.

Outro fator que altera a taxa de descoloração do meio é a variação da temperatura, uma ampla quantidade de efluentes têxteis é descarregada no ambiente em altas temperaturas (50–60°C), tornando-se um importante parâmetro que influencia em tal taxa (AKSU, Z., 2005).

Segundo PRACHI, K.; ANUSHREE, M., (2009), a maioria dos trabalhos relata que o aumento da temperatura influencia positivamente na atividade de

biosorção. Contraditoriamente a cepa *R. nigrican* em uma temperatura inicial de 20° C mostrou uma forte adsorção para três corantes testados, sendo sua atividade de biosorção reduzida quando se aumentou a temperatura para 30°C. (KUMARI, P., 2006).

Neste trabalho a variação da temperatura não afetou significativamente a atividade descorante para a cepa 003.

A presença de sais e cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  no efluente têxtil induz um aumento na força iônica, o que pode acabar influenciando significativamente a taxa de adsorção. Foi observado que a atividade reduz quando se aumenta a força iônica, como exemplo em *Phellinus igniarius* e *Fomentarius*. Tal efeito adverso pode ser devido a mecanismos de troca iônica que estejam em operação com o processo de biosorção. E o fato de ocorrer a competição de íons  $\text{Na}^+$ , presente no sal utilizado, com as cargas positivas, presentes na molécula do corante, pelos mesmos sítios de ligação na superfície do biosorvente (MAURYA, N.S.; MITTAL, A.K.; ROTHER, E., 2006).

Em nosso estudo, o aumento da concentração de sal de 0,25 M para 1,5 M não alterou significativamente a biosorção da cepa 003.

O último fator com potencial de influenciar na adsorção do corante é a sua concentração inicial. Esta fornece a força impulsionadora necessária para que sejam superadas as resistências de transferência de massa entre as fases sólida e líquida. Dependendo da espécie de fungo são observadas diferentes capacidades de biosorção. AKZU, Z.; DÖNMEZ, G. (2003), revela que tal capacidade chegou a 90%, quando quatro cepas (*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *K. marxianus* e *C. membranaefaciens*) foram submetidas a uma concentração inicial de 0,1 g/L, mas quando se elevava este valor não havia alteração na biosorção, indicando que as cepas chegaram a suas capacidades de saturação. A adsorção de Remazol Azul na concentração de 0,1 g/L dessas leveduras foi determinada como sendo 90, 87, 89 e 95 mg/g de micélio. Diferenças entre espécies alteram sua capacidade de ligação com o corante, devido a propriedades deste, como estrutura, grupos funcionais, área de superfície e diferenças morfológicas dependendo do gênero e espécie de fungo (AKZU, Z.; DÖNMEZ, G., 2003).

No presente estudo, observou-se que quando aumentou-se a concentração de corante de 0,1 para 0,2, 0,5, 1 e 2 g/L houve uma redução na atividade de

biosorção e a descoloração realizada pela cepa 003 diminuiu de acordo com o aumento da concentração de corante. A adsorção do corante HE7B na concentração de 0,1 g/L pela mesma cepa foi determinada como sendo 25 mg/g de micélio.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o cultivo dos fungos em meio sólido e meio líquido produziu diferenças na atividade descorante de *Heteroporus biennis*.

O tipo de fonte de carbono e de nitrogênio assim como a concentração destas no meio de cultura alterou significativamente a produção de atividade descorante.

A suplementação com sulfato de cobre e manganês não alteram a atividade descorante nas cepas de *H. biennis* e 002. Mas em UV a adição de sulfato de manganês diminui o pico de 460 nm.

O micélio na condição úmida da cepa 003 possui maior potencial de absorção quando comparado com liofilizado e seco, é capaz de biosorver nove tipos de corantes.

Alterações nos valores de pH, concentração de sal e temperatura não influenciaram na taxa de absorção. De acordo com o aumento na concentração de corante, a biosorção diminui.

O tratamento do micélio após biosorção com diferentes soluções indicou que o corante parece ser internalizado pelo fungo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADULLA, E. TZANKO; T.; SILGIA, C.; KARL-HEINZ, R.; ARTUR, C.P.; GEORG, M. G. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsute*. **Applied and environmental microbiology**, v.66, p. 3357–3362, 2000.

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

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

AKAR, T., TOSUN, I.I., KAYNAK, Z., KAVAS, E., INCIRKUS, G., AKAR, S.T. Assessment of the biosorption characteristics of a macro-fungus for the decolorization of Acid Red 44 (AR44) dye. **Journal of Hazardous Materials**, v171, p.865-871, 2009.

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

BANKS, C.J. e PARKINSON, M.E. The mechanism and application of fungal biosorption to color removal from raw waters. **J. Chem. Technol. Biotechnol**, v.54, p. 192–196, 1992.

BRITO, N.N.; ZAMORA, P.P.; OLIVEIRA, A.L. de. N.; BATTISTI, A, de.; PATERNIANI, J.E.S.; PELEGRINI, R.T. Biorremediação e controle ambiental. **IV Fórum de Estudos Contábeis**, 2004.

BUSWELL J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lactase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **Fems Microbiology Letters**, v128, p.81-88, 1995.

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

DEDEYAN, B.; KLONOWSKA, A.; TAGGER, S.; TRAN, T.; IACAZIO, G.; GIL, G.; LE PETIT, J. Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. 2000

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINGCKX, M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v35, p.1534-1538, 2008.

FU, Y., VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolourization of dye wastewaters: a review. **Biosource and Technology**, v.79, p.251-262, 2001.

GADD, G.M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal Chem Technol Biotechnol**, v84, p.13-18, 2008.

GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v.23, n.1, p.71-78, 1999.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v30, p.381-386, 2002

HESSEL, C.; ALLEGREA, M.M.; CHARBITA, F.; MOULINA, P. Guidelines and legislation for dye house effluents. **Journal of Environmental Management**, v.83, p.171-180, 2007.

IQBAL, M.; SAEED, A. Biosorption of reactive dye by loofa sponge-immobilized fungal biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v.42, p.1160-1164, 2007.

JORDAAN, J.; LEUKES, W.D. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic White rot fungus, **Enzyme and microbial technology**, v.33, n.2-3, p.212-219, 2003.

KAUSHIK, P; MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environment International**, v35, p. 127-141, 2009.

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

KUMARASAMY, M.; YOUNG-MO, K.; JONG, J.R.; YOON, C.S. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from, *Ganoderma lucidu*, **Journal of Hazardous Materials**, v168, p.523-529, 2009

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.

KUMARI, P.; SHARMA, P.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, M.M. Biosorption studies on shelled Moringa oleifera Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system. **International Journal of Mineral Processing**, v.78, p.131-139, 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.

MAURYA, N.S., MITTAL, A.K., ROTHER, E. Biosorption of dyes using dead macro fungi: Effect of dye structure, ionic strength and Ph, **Bioresource Technology**, v.97, p.512-521, 2006.

McMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes, **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.81-87, 2001.

McMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNELLY, 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.

MIKIASHVILI, N.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S.; NEVO, E. Carbon and nitrogen sources influence the lignolytic activity of *Trametes versicolor*, **Biotechnology Letters**, v27, p.955-959, 2005.

PARK, C.; MYUNGGU, L.; LEE, B.; KIM, S.; HOWARD, A.C.; LEE, J.; KIM, S. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. **Biochemical Engineering Journal**, v.36, p.59-65, 2007.

PRACHI, K.; ANUSHREE, M. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environment International**, v.35, p.127-141, 2009.

POINTING,S.B. Feasibility of bioremediation by White-rot-fungi, **Appl Microbiol Biotechnol**, v.57, p.20-33, 2001.

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.

SILVA, C.M.M.S, MELO, I.S, OLIVEIRA, P.R. Lignolytic enzyme production by *Ganoderma spp*, **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.324-329, 2005.

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.

SUAY,I.; ARENAL,F.; ASENSIO,F.J.; BASILIO,A.; CABELLO,M.A.; DIEZ,M.T.; GARCIA,J.B.; DEL-VAL,A.G. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities, **Antonie van Leeuwenhoek**, v.78, p.129-139, 2000.

TEKERE, M.; MSWAKA, A.; ZVAUYA, Y. R.; READ, J. S. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.420-426, 2001.

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.

YAMANAKA, R.; SOARES, C.F.; MATHEUS, D.R.; MACHADO,K.M.G. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.78-84, 2008.

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