

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISANDRA SANTOS FERREIRA

**BIODEGRADAÇÃO POR FUNGOS ENDOFÍTICOS E
ISOLADOS DO AMBIENTE**

CURITIBA

2007

LISANDRA SANTOS FERREIRA

BIODEGRADAÇÃO POR FUNGOS ENDOFÍTICOS E ISOLADOS DO AMBIENTE

Monografia apresentada à disciplina
Estágio em Genética como requisito
parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa
Kava-Cordeiro

Co-orientador: Prof.Dr.Jaime Paba

CURITIBA

2007

Aos meus pais
Dedico
Ao Pablo
Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força e entendimento quando as coisas pareciam não dar certo e também pelas horas em que tudo correu bem.

Agradeço aos meus pais por me darem amor, condições de estudo e apoio em todas as horas.

Agradeço especialmente ao Pablo pelo amor e carinho nos momentos difíceis e também pela paciência.

Aos meus irmãos pelo apoio, incentivo e suporte técnico no meu computador.

A toda minha família pelo apoio e incentivo.

A minha grande amiga Larice pela companhia na faculdade e no laboratório, pela ajuda no dia-a-dia e pela paciência.

As minhas queridas amigas Marcela, Thais pela amizade, pelas boas risadas e pelo grande apoio sempre que precisei.

A minha orientadora Vanessa que sabe dar conselhos nas horas certas e com isso acalmar ânimos nos momentos ruins, pela amizade e incentivo.

Ao meu co-orientador Jaime e sua orientada Carol por resolverem alguns problemas que sempre apareciam de última hora.

As amigas de laboratório Josiane, Renata Tati pela ajuda no dia-a-dia.

Ao pessoal do laboratório: Camila, Carol S., Carol, Danny, Douglas, Fer, Flávia, Jociney, Juliana, Maysa, Patrícia, Rosana pela ótima convivência.

Às professoras Chirlei e Lygia por ajudarem a fazer o LabGeM funcionar e pela convivência.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
RESUMO.....	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 CORANTES E MEIO AMBIENTE.....	4
3.2 ESTRATÉGIAS PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS.....	10
3.2.1 Tratamento com Ozônio.....	10
3.2.2 Fotocatálise Heterogênea.....	12
3.2.3 Processos Físicos.....	13
3.2.4 Processos Combinados.....	13
3.2.5 Biodegradação.....	14
3.3 O Gênero <i>Colletotrichum</i>	16
3.4 O Gênero <i>Phomopsis</i>	16
3.5 ^o Gênero <i>Pestalotiopsis</i>	17
3.6 O Gênero <i>Heteroporus</i>	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 MEIOS DE CULTURA.....	19
4.1.1 Meio Completo (MC) (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973).....	19
4.1.2 Meio Mínimo (MM).....	19
4.1.3 Meio Mínimo Sais	20
4.1.4 Solução de Vitaminas	20
4.1.5 Meio Batata – Dextrose - Ágar (BDA).....	21
4.2 PROTOCOLOS.....	21
4.2.1 Capacidade de crescimento com o corante e seleção de isolados com potencial de degradação.....	21
4.2.2 Determinação do espectro de absorção dos corantes a serem utilizados.....	21
4.2.3 ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO.....	21
4.2.3.1 Em Meio líquido	21
4.2.3.2 Em Meio sólido.....	22

4.2.4 Efeito da concentração do corante no crescimento do microrganismo	23
4.2.5 Uso do corante como fonte de carbono e nitrogênio	23
4.2.6 Peso seco do micélio	24
4.2.7 Espectrofotometria	24
4.2.8 Dosagem de proteínas do micélio seco.....	24
4.2.9 Protocolo de eletroforese em gel de poliacrilamida	24
4.3 PRÓXIMAS ETAPAS.....	26
4.3.1 Verificar de a composição do meio altera a secreção de enzimas	26
4.3.2 Atividade biodegradativa da secreção do fungo	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÕES.....	40
7 REFERÊNCIAS	
BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 Ensaio 45 dias de incubação em meios acrescidos com corantes na concentração 0,1g/L.....	30
Tabela 2 Ensaio 30 dias de incubação em meios acrescidos com corantes na concentração 0,1g/L.....	31
Tabela 3 Ensaio 15 dias de incubação em meios acrescidos com corantes na concentração 0,1g/L.....	32
Tabela 4 Quantidade de proteína e micélio seco das réplicas	37
Figura 1 Estrutura química do corante Remazol Vermelho.....	9
Figura 2 Estrutura química do corante Remazol Amarelo.....	10
Figura 3 Remazol Vermelho e Remazol Amarelo Ouro em concentração 0,1g/L..	33
Figura 4: <i>Heteroporus biennis</i> em meio mínimo líquido com diferentes concentrações de Remazol Azul Brilhante, após 30 dias a 28°C.	34
Gráfico 1: <i>Heteroporus biennis</i> em concentração 0,1g/L de corante.	35
Gráfico 2: Amostras de Remazol Azul Brilhante lidas nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 g/L em espectrofotômetro, no controle e no tratamento.	36
Gráfico 3: Crescimento do fungo em função do aumento da concentração de Remazol.....	37
Gráfico 4: Curva padrão do BSA.....	38

RESUMO

O tratamento de efluentes têxteis é de grande importância da perspectiva ambiental. Devido ao grande volume gerado e a sua composição, é considerado um dos grandes geradores de poluentes. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de fungos capazes de biodegradar soluções da classe de corantes reativo empregados na indústria têxtil. Foram utilizados os corantes Remazol Azul Brilhante, Remazol Vermelho e Remazol Amarelo. Estes foram escolhidos pela importância na utilização dentro da indústria têxtil. Como meio de cultivo, para os ensaios de degradação, empregou-se meio mínimo com diferentes concentrações de Remazol e meio mínimo de sais. A observação da primeira triagem foi feita após 15, 30, 45 dias de incubação, Nestes ensaios foram utilizados os fungos *Phomopsis* sp, *Pestalotiopsis microspora*, *Pestalotiopsis* sp, *Pestalotiopsis vismae*, *Colletotrichum boninense* (FAC25) e *Heteroporus biennis*, Os resultados obtidos permitem concluir que o *Pestalotiopsis vismae* e o *Heteroporus biennis* são microrganismos promissores quando utilizados na biodegradação das soluções dos corantes azul, em função dos seus altos rendimentos. Os fungos *Phomopsis* sp, *Pestalotiopsis microspora*, *Pestalotiopsis* sp, *Colletotrichum boninense* mostraram-se ineficientes para os corantes estudados, pois necessita de um período muito longo de incubação para descolorir os corantes, o que não seria interessante para a indústria. O corante Remazol Amarelo e o Vermelho não foram degradados efetivamente por nenhum dos microrganismos neste estudo. Estes resultados levam a estudos mais aprofundados dos microrganismos com um bom potencial biodegradador, para otimização do método e também redução no tempo de tratamento dos efluentes.

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural indispensável e em função da degradação ambiental e da poluição dos mananciais, a água potável vem se tornando escassa. Atualmente ela é um dos bens mais caros e preciosos da qual depende a sobrevivência humana.

Alguns fatores como: o crescimento acelerado da população, a forte urbanização das cidades, a indústria e a expansão das áreas agrícolas, contribuíram para a poluição das reservas de águas disponíveis, comprometendo-as total ou parcialmente.

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria Têxtil, este setor é de grande importância no Brasil, sendo o sétimo parque industrial do mundo e um dos que mais utiliza água: cerca de 150 litros por quilo de tecido produzido.

O reuso direto de efluentes gerados nas etapas do processo têxtil é muito limitado, pois existem diversos contaminantes e em concentrações muito variadas, que dependem do tipo de preparação e do protocolo de tingimento utilizado. Como exemplos desses contaminantes são os diversos corantes utilizados para os mais variados tipos de fibras.

Os corantes têxteis atuais possuem alto grau de estabilidade química e fotocatalítica, de forma a manter sua cor por mais tempo. Devido à característica recalcitrante dos corantes e a diversidade de produtos químicos presentes nos efluentes, uma combinação de tratamentos é necessária para a purificação.

A remoção de corantes de águas residuais têxteis tem sido um assunto de grande interesse nas últimas décadas. Em geral, os corantes não são biodegradáveis, não sendo eficientemente removidos durante o tratamento biológico do efluente.

A utilização de microrganismos capazes de degradar compostos orgânicos tem se mostrado um método bastante promissor para o tratamento desses rejeitos. Porém, este processo apresenta algumas limitações como, por exemplo: não é uma solução imediata e os locais a serem tratados devem estar preparados para suportar a ação dos microrganismos. Estudos baseados no uso de microrganismos para degradar compostos químicos, como é o caso dos corantes, têm obtido maiores atenções por parte de pesquisadores, para que essas limitações sejam superadas.

Pesquisas têm demonstrado que o complexo enzimático dos basidiomicotas atua naturalmente na degradação da lignina, principalmente devido à ação das lacases e peroxidases. Devido à semelhança entre os grupos químicos presentes na lignina e nos corantes têxteis, estas enzimas também são capazes de degradá-los, constituindo uma possível alternativa para o uso na remediação de efluentes da indústria têxtil (DAVIS e BURNS, 1990).

Devido ao caráter tóxico das variedades de corantes, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias adequadas para o seu controle. Neste contexto, novas idéias para o tratamento de águas e efluentes que destroem ou imobilizam compostos orgânicos tóxicos vêm sendo direcionadas para criar estratégias onde o tratamento de poluentes seja o mais efetivo e econômico possível (MORAIS, 1999).

2 OBJETIVOS

- Averiguar a capacidade de isolados do fungo isolado do ambiente *Heteroporus biennis*, e dos fungos endofíticos *Pestalotiopsis vismae*, *Pestalotiopsis* sp, *P. microspora*, *Phomopsis* sp e *Colletotrichum boninense* crescerem em meios com corante do tipo Remazol (vermelho, amarelo ouro e azul brilhante);
- Selecionar isolados fúngicos com a capacidade de degradação dos corantes.
- Verificar o uso dos corantes como fonte de carbono e nitrogênio pelos fungos;
- Verificar se há inibição de crescimento dos fungos selecionados em concentrações crescentes dos corantes;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CORANTES E MEIO AMBIENTE

A origem dos corantes têxteis é incerta, mas há indicações de seu uso pelo homem desde o início das civilizações. Sua presença foi detectada em amostras de tecidos em tumbas egípcias e antigos hieróglifos datados de 2500 a.C. Até a metade do século 19, só existiam pigmentos naturais, provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais, cujas fórmulas de extração e aplicação eram muito bem guardadas.

A grande revolução na história desses compostos ocorreu quando o químico William H. Perkin descobriu, em 1856, o primeiro corante sintético (malva), derivado do coque. Foi o primeiro passo para a produção de corantes sintéticos em grande escala.

Segundo a revista de química da Universidade Federal de Santa Catarina, uma grande variedade de corantes químicos é utilizada na indústria e a maior parte deles vai para a área têxtil; mas as áreas de produtos em papel, indústrias alimentícias, cosméticos, tintas e plásticos também são usuários importantes. O Colour Index (catálogo da Society of Dyers and Colourists) registra atualmente mais de oito mil corantes sintéticos associados à indústria têxtil. Essa diversidade se justifica pelo grande sucesso comercial dos produtos têxteis que passam por um processo de tintura.

Para atender a um mercado cada vez mais exigente, a indústria tem investido no desenvolvimento de corantes econômicos, com propriedades específicas, para obter boa fixação da coloração nos tecidos, oferecendo alta resistência aos agentes desencadeadores da descoloração. Normalmente, a fixação do corante à fibra é feita através de reações químicas ou por adsorção (fixação de moléculas de uma substância na superfície de outra) ou também por derivados gerados por reações químicas durante o processo de tintura.

Os corantes apresentam estruturas moleculares complexas que podem envolver, durante seu processo de síntese, até 500 reações intermediárias. Para isso apresentam um grupo cromóforo, que dá cor ao composto pela absorção de uma parte de energia radiante, também conhecido como azo, antraquinona, nitro, entre outros, e grupos auxiliares que propiciam sua afinidade pela fibra têxtil sendo ela natural ou sintética.

Neste contexto, os diversos corantes utilizados em vários segmentos industriais surgem como um problema ambiental. Dentro deste uso, uma significativa porção destes aparece sob forma de resíduos e o descarte de corantes em rios e lagos prejudica a absorção de energia luminosa e alteram os ecossistemas aquáticos (FERREIRA *et al*,2000). Alguns corantes de alto poder de fixação liberam substâncias tóxicas como altas concentrações de metais pesados. Outros podem ser acumulados por plantas expostas aos efluentes e conseqüentemente passar para a cadeia alimentar, contaminando outros organismos. Normalmente os corantes são recalcitrantes (compostos que permanecem num ambiente de forma inalterada, podendo ser naturais ou sintéticos) ou apresentam uma cinética de degradação muito lenta para os processos biológicos convencionais (KUNZ, 1999).

A água possui sua qualidade avaliada em termos de suas características físicas, químicas e biológicas. No entanto, o conceito de pureza depende destas características, mas também de seu uso. O Brasil detém uma das maiores reservas de água do mundo – 15% da água doce superficial disponível no planeta (segundo o Instituto para o Desenvolvimento Ambiental), mas este recurso está sendo mal utilizado e políticas de minimização e reuso de águas residuárias, principalmente industriais, devem ser estabelecidas e colocadas em prática.

Na indústria, a água é utilizada principalmente para três finalidades: incorporação em produtos específicos, atuação como fluido térmico (aquecimento ou resfriamento) e eliminação de componentes indesejáveis (PUIGJANER *et al*, 2000). Além disso, a legislação ambiental é restritiva, aliada a elevados custos de tratamento, disposição final de poluentes industriais, e ainda considerando o desperdício que significa um resíduo não aproveitado no final do processo, torna-se importante a necessidade de adaptação das indústrias para a redução de efluentes aquosos. Os efluentes são geralmente produtos líquidos ou gasosos produzidos por [indústrias](#) ou resultante dos [esgotos](#) domésticos urbanos, que são lançados no [meio ambiente](#).

A minimização de insumos químicos tem como principais objetivos: a redução do volume, da toxicidade e da carga poluidora dos efluentes aquosos gerados num determinado processo. Assim, este conceito baseia-se em ações

que levem à redução ou eliminação dos poluentes em sua fonte de geração, por meio de modificações nos processos produtivos

Atualmente, o tratamento e reuso dos efluentes da indústria têxtil constitui um mercado potencial para a água recuperada, já que esta é ideal para as indústrias que não necessitam de água potável em seus processos

Problemas ecológicos com relação aos corantes vêm da idéia de que uma pequena quantidade causa um pequeno impacto ambiental. Isto leva algumas indústrias a adotarem um processo de diluição dos rejeitos, demandando uma grande quantidade de água (quer tratada por órgãos governamentais ou mesmo captadas e tratadas pela própria indústria), aumentando o custo final de seus produtos sem efetuar um real tratamento dos resíduos (GUARATINI, 2000).

A indústria vem gerando, durante décadas, milhões de quilos de corantes. Mais de 700 mil toneladas de 10 mil tipos de corantes e pigmentos são produzidas anualmente no mundo. Segundo dados da Associação Brasileira de Química (Abiquim), de 1997, o Brasil é responsável por 2,6% da demanda mundial de corantes.

Estima-se que cerca de 15% dos corantes utilizados no processo de tingimento são descartados nos efluentes (DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2006) e que essa perda representa um lançamento de 1,2 tonelada por dia desta classe de compostos para o meio ambiente. A principal fonte dessa perda corresponde à incompleta fixação dos corantes (10 - 20% do corante não se fixa à fibra) durante a etapa de tingimento das fibras têxteis (GUARATINI & ZANONI, 1999).

Nos últimos anos, regulamentações rigorosas têm sido estabelecidas em muitos países referentes ao descarte de efluentes coloridos. A legislação governamental está se tornando cada vez mais rigorosa, especialmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, no que diz respeito à remoção de cor dos efluentes industriais. A aplicação destas leis assegura que indústrias têxteis e demais ramos da indústria, tratem seus efluentes para que se ajustem aos padrões requeridos, minimizando assim o impacto ambiental (ANJANEYULU *et al.*, 2005).

Considerando que os corantes não pertencem a uma mesma classe de compostos químicos e que unido ao seu uso há vários outros aditivos químicos de composição diversificada como os umectantes, antiespumantes, dispersantes, ajustadores de pH, entre outros, durante o banho de tintura, a montagem e a fixação, o processo de remoção dos resíduos torna-se difícil e caro.

Os corantes podem ser classificados de acordo com sua estrutura química ou de acordo com o método pelo qual é fixado à fibra têxtil. Os principais grupos de corantes, classificados pelo modo de fixação, são (IMMICH, 2006):

- **CORANTES ÁCIDOS:** são solúveis em água. As cores são, geralmente, brilhantes e o material tingido apresenta níveis bons de resistência. Esta classe de corante inclui os metais: cromo, cobre, estanho e alumínio. E em função de problemas ambientais, seu uso vem decrescendo continuamente, praticamente já em desuso nos EUA.
- **CORANTES AZÓICOS (NAFTÓIS):** constituídos de dois compostos quimicamente reativos, que são aplicados à fibra em diferentes estágios, produzindo pigmento insolúvel dentro da fibra. Produzem tonalidades brilhantes e escuras de amarelo, laranja, vermelho, marrom, preto e azul. O corante apresenta boa solidez à luz e resistência ao peróxido e outros alvejantes. No entanto, seu uso tem diminuído nos últimos anos devido aos custos de aplicação e suspeitas quanto à possível presença de produtos carcinogênicos nos efluentes.
- **CORANTES BÁSICOS (CATIÔNICOS):** são corantes de baixa solubilidade em água. Ligações iônicas são formadas entre o cátion da molécula do corante e os sítios aniônicos na fibra. São fortemente ligados e não migram facilmente. Produzem cores brilhantes e resistentes (exceto em fibras naturais), e apresentam uma variedade de cores ilimitada.
- **CORANTES A CUBA:** apresentam uma boa cartela de cores, mas as tonalidades, geralmente, são opacas. São usados, principalmente, no

tingimento e estamparia de algodão e fibras celulósicas, ou em produtos que requeiram boa resistência a vários agentes. Apresentam ótima solidez à lavagem, luz e transpiração. São fornecidos tanto na forma solúvel, quanto na insolúvel em água.

- **CORANTES DIRETOS OU SUBSTANTIVOS:** são compostos solúveis em água. Produzem cores escuras e brilhantes, que variam enormemente quanto à solidez à luz. A resistência à lavagem é limitada e o uso de fixadores químicos pode aumentar sua resistência à umidade. A grande vantagem desta classe de corantes é a diminuição do conteúdo do corante nas águas de rejeitos.

- **CORANTES DISPERSOS:** são compostos com solubilidade em água extremamente baixa, comercializados na forma pulverizada e líquida. As fibras de poliéster são tingidas quase exclusivamente com corantes dispersos. São também utilizados para a obtenção de cores claras em poliamidas e acrílicos. Apresentam boa solidez à luz, resistência à transpiração e lavagens a úmido e a seco.

- **CORANTES DE ENXOFRE:** é uma classe de corantes que após a aplicação se caracterizam por compostos macromoleculares insolúveis em água. Estes compostos têm sido utilizados principalmente no tingimento de fibras celulósicas, conferindo cores como preto, verde oliva, azul marinho, marrom, apresentando boa fixação.

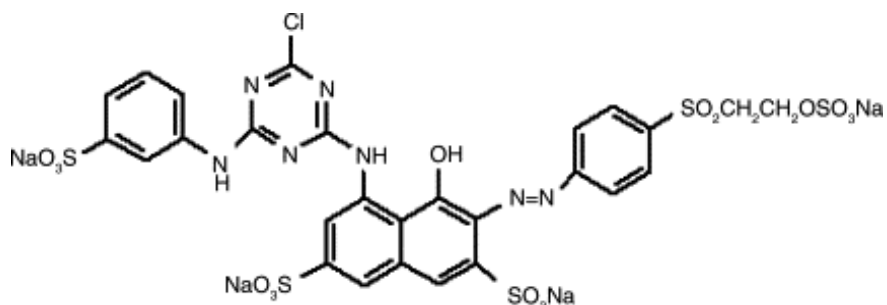
- **CORANTES BRANQUEADORES:** as fibras têxteis no estado bruto, por serem compostas primariamente de materiais orgânicos, apresentam como característica uma aparência amarelada por absorver luz particularmente na faixa de baixo comprimento de onda. A diminuição dessa tonalidade tem sido realizada na indústria ou na lavanderia pela oxidação da fibra com alvejantes químicos ou utilizando os corantes brancos também denominados de branqueadores ópticos ou mesmo branqueadores fluorescentes. A utilização destes corantes no beneficiamento têxtil, bem como de outros produtos químicos adicionais, acaba gerando um efluente tóxico.

- **CORANTES PRÉ-METALIZADOS:** são úteis principalmente para tingimento de fibras protéicas e poliamidas. Os corantes são caracterizados pela formação de complexos com íons metálicos. A desvantagem ecológica deste tipo de corante está associada ao alto conteúdo de metal nas águas de rejeito.

- **CORANTES REATIVOS:** existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos. A outra parte da molécula do corante, ligada ao grupo cromóforo, é responsável pela fixação do corante à fibra. Os corantes reativos são assim chamados devido a sua capacidade de formarem ligações covalentes com a fibra.

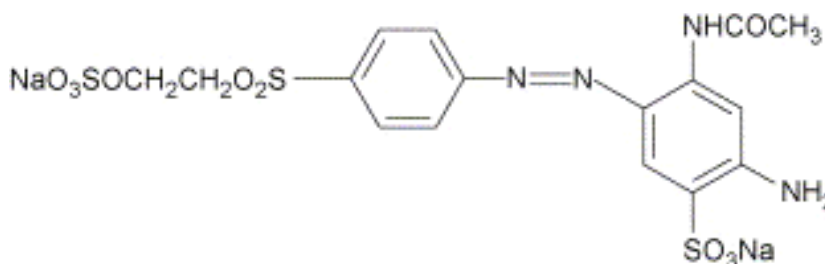
Devido a estas implicações ambientais, a busca de novas tecnologias faz-se necessária para a degradação ou imobilização destes compostos em efluentes têxteis. Dentro dessa classe de corantes reativos encontra-se o Remazol. Neste trabalho foi utilizado o Remazol Vermelho (RB 133%) (Figura 1) , Remazol Amarelo Ouro (RNL 150%) (Figura 2) e Remazol Azul Brilhante (BB 133%). O mais utilizado devido a sua importância industrial é o Remazol Azul Brilhante, um derivado do antraceno que representa uma classe importante de poluentes orgânicos, freqüentemente tóxicos e recalcitrantes.

Figura 1: Estrutura química do corante Remazol Vermelho



Fonte: Autor desconhecido.

Figura 2: Estrutura química do Corante Remazol Amarelo



Fonte: Química Nova v.29 n.5 São Paulo sep./oct. 2006

A estrutura do Remazol Azul Brilhante é mantida em segredo no meio industrial.

3.2 ESTRATÉGIAS PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

Existem algumas estratégias que têm como objetivo minimizar o impacto ambiental que os efluentes causam. Devido estas implicações, novas tecnologias são buscadas para a degradação ou imobilização destes compostos em efluentes têxteis.

As técnicas de tratamento fundamentadas em processos de coagulação, seguidos de separação por flotação ou sedimentação, apresentam uma elevada eficiência na remoção de material particulado. No entanto, a remoção de cor e compostos orgânicos dissolvidos mostra-se deficiente. Os processos de adsorção em carvão ativado apresentam uma eficiência significativamente maior, contudo em função da superfície química do carvão ser positiva, a adsorção de corantes de caráter catiônico é uma limitação bastante importante (AL-DEGS *et al*, 2000).

Algumas estratégias para tratamento de efluentes:

3.2.1 TRATAMENTO COM OZÔNIO

A combinação de processos oxidativos avançados utilizando-se peróxido de hidrogênio, ozônio, luz ultravioleta, TiO_2 tem sido testados recentemente como alternativas aos processos de tratamento estabelecidos atualmente, com resultados promissores (ARSLAN, 1999).

Ozônio, a forma triatômica do oxigênio, é um gás incolor de odor pungente. Em fase aquosa, o ozônio se decompõe rapidamente a oxigênio e espécies radicalares. O ozônio é um agente oxidante poderoso quando comparado a outros agentes oxidantes conhecidos como, por exemplo, H_2O_2 permitindo com que esta espécie reaja com uma numerosa classe de compostos (KUNZ *et al*, 1999). A oxidação de poluentes ou efluentes pode ocorrer de maneira direta ou indireta (KUNZ, 1999).

Oxidação direta

Através deste processo a molécula de ozônio pode reagir diretamente com outras moléculas orgânicas ou inorgânicas via adição eletrofílica. O ataque eletrofílico do ozônio pode acontecer a átomos com uma densidade de carga negativa (N, P, O ou carbonos nucleofílicos) ou a ligações duplas ou triplas do tipo carbono-carbono, carbono-nitrogênio e nitrogênio-nitrogênio (ESPLUGAS, 1995).

Oxidação indireta

Indiretamente, o ozônio pode reagir através de reação radicalar (principalmente $\cdot OH$) que é gerado pela decomposição do ozônio. O radical hidroxila é um poderoso e não seletivo oxidante que pode reagir através de três mecanismos distintos: abstração de hidrogênio, transferência de elétrons e adição radicalar. Os radicais secundários formados durante estas reações podem novamente reagir com ozônio ou outros compostos.

Para o tratamento de efluente têxtil o ozônio se mostra muito atrativo. Geralmente, os cromóforos encontrados no efluente têxtil são compostos orgânicos com grande conjugação de ligações duplas como mencionado acima. Estas ligações podem ser rompidas por ozônio (direta ou indiretamente) formando moléculas menores descolorindo assim o efluente. Neste sentido, vários estudos têm sido realizados demonstrando a eficiência do ozônio na remoção de cor em efluentes têxteis.

KUNZ (2002) e PERALTA-ZAMORA (1999) estudando a descoloração de alguns corantes reativos e KUNZ *et al*, estudando a degradação de efluente

têxtil também observaram uma efetiva e rápida descoloração das amostras com ozônio. No entanto, um inconveniente muitas vezes encontrado nos estudos de degradação com ozônio refere-se ao aumento da toxicidade de alguns intermediários de reação (LANGLAIS *et al*, 1992), o que torna necessário o acompanhamento do processo através de testes de toxicidade.

3.2.2 FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA

A degradação de compostos orgânicos através de fotocatalise heterogênea, assim como os princípios que fundamentam o processo, são bastante documentados (LEGRINI, 1993). A aplicação da fotocatalise no tratamento de efluentes têxteis tem sido estudada, há vários artigos publicados sobre a degradação de corantes isolados (WANG, 2000).

Embora a elevada eficiência da fotocatalise heterogênea permita uma rápida mineralização de inúmeras espécies químicas de relevância ambiental, existem vários inconvenientes de ordem prática que têm dificultado bastante a consolidação desta estratégia como alternativa de tratamento em grande escala. Dentre as mais importantes limitações contam-se: necessidade de fontes artificiais de radiação, uma vez que grande parte dos fotocatalisadores apresenta um "band gap" correspondente à região ultravioleta; dificuldades na penetração da radiação no meio de reação; na separação dos fotocatalisadores, uma vez que estes são utilizados na forma de finas suspensões e na implantação de sistemas contínuos em grande escala, principalmente em função dos inconvenientes anteriores.

Muitos estudos que visam contornar tais inconvenientes estão sendo realizados. Dentre as várias alternativas estudadas destacam-se: desenvolvimento de fotocatalisadores de maior eficiência, implementação de sistemas que operem com fotocatalisadores e utilização de fotocatalisadores passíveis de ativação por luz solar ou de sistemas assistidos por agentes sensibilizadores (ZHU *et al*, 2000).

3.2.3 PROCESSOS FÍSICOS

Dentre os processos físicos mais utilizados no tratamento de efluentes e corantes têxteis, a adsorção com carvão ativado ainda é intensamente estudada (NICOLET, 1999). O estudo de alguns agentes alternativos utilizando-se de biomassa como adsorvente também tem despertado atenção. Alguns artigos publicados nos últimos anos utilizaram carvão ativado de coco, bambu e cascas de eucalipto como materiais adsorventes.

A utilização de tecnologias de membranas, como osmose reversa, microfiltração, nanofiltração e ultrafiltração, torna-se muito atrativa, pois possibilitam o reuso da água no processo industrial. Isto é especialmente interessante se analisarmos as perspectivas futuras não muito animadoras de escassez deste recurso natural essencial (KUNZ *et al*, 2002).

3.2.4 PROCESSOS COMBINADOS

Para o tratamento de um efluente uma solução inteligente é a utilização de processos combinados para uma melhor eficiência do sistema. Estes métodos podem ser utilizados de maneira complementar, de tal forma que possam suprir deficiências apresentadas pelos processos quando aplicados isoladamente.

Os métodos para tratar os efluentes podem ser classificados como físicos, químicos e biológicos. A combinação destes para tratamento de um efluente depende dos objetivos que se quer atingir no tratamento.

Para o tratamento de efluentes têxteis, a combinação de métodos mostra-se mais adequada, devido à presença de corantes que normalmente são resistentes à degradação nos sistemas convencionais de tratamento. Em geral, maior ênfase dá-se ao estabelecimento de métodos que combinem processos biológicos com alternativas físicas ou físico-químicas, tais como floculação, adsorção ou oxidação eletroquímica (VANDEVIVERE e *col*, 1998).

Processos físicos utilizando-se tecnologias de membranas combinadas principalmente com ozônio também têm recebido atenção devido a possibilidade de reuso da água. A combinação de processos biológicos anaeróbios - aeróbios, também é útil, pois permite a efetiva descoloração do efluente (GALINDO *et al*, 2000).

3.2.5 BIODEGRADAÇÃO

A grande motivação de pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação pode ser a busca contínua de microrganismos capazes de degradar de maneira eficiente e em tempo razoável, um grande número de poluentes a um baixo custo operacional. Na prática, sabemos que isto é muito complicado principalmente em função da diversidade, concentração e composição de espécies químicas presentes em cada efluente. Fungos em combinação com métodos biológicos e químicos também têm sido testados e se mostrado bastante eficientes na descoloração de efluentes e corantes têxteis, como é o caso desta pesquisa. A associação com químicos possui o inconveniente de gerar produtos indesejáveis.

Segundo o Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (Universidade Federal de S. Catarina) a utilização de bactérias, como *Pseudomonas sp* e *Sphingomonas sp* tem sido publicada em artigos sobre a degradação de corantes. Estes microrganismos são particularmente úteis para degradação de azocorantes, pois tem a capacidade de realizar a clivagem nas ligações azo deste tipo de composto, fato este que geralmente está associado à enzima azoredutase. Alternativa recente para o tratamento de efluentes e compostos resistentes à degradação refere-se ao uso de agentes quelantes naturais, produzidos por alguns fungos e bactérias. Estes compostos apresentam uma alta afinidade por metais, principalmente ferro, formando complexos de alta estabilidade. A função biológica é a de seqüestrar ferro em ambientes com deficiência deste.

Entre os organismos utilizados, os fungos lignolíticos têm despertado grande interesse devido à diversidade de enzimas (lignina peroxidases, lacases, fenol oxidases, entre outras) por eles secretados, com ação sobre múltiplos substratos de origem industrial. Recentemente, pesquisadores têm aumentado o interesse no fungo de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium*. Este fungo tem a capacidade de mineralizar, além da lignina, pelo menos parcialmente e em alguns casos completamente, uma variedade de poluentes resistentes a degradação (PASZCZYNSKI *et al*, 1991). O sistema lignolítico deste fungo é representado principalmente pelas enzimas lignina e manganês peroxidase, as quais são produzidas em meios contendo fontes limitadas de carbono e nitrogênio. Estas enzimas têm a capacidade de despolimerizar a lignina e uma grande variedade de outros compostos. Especialmente para efluentes têxteis, alguns estudos têm sido realizados explorando sua capacidade de degradar e mineralizar corantes. SPADARO *et al*, 1992 demonstraram que *P. chrysosporium* foi capaz de mineralizar alguns azocorantes.

Outros fungos como, por exemplo: *Phomopsis* sp, *P. microspora*, *Pestalotiopsis* sp, *P. vismae*, *C. boninense*, *H. biennis*., foram utilizados neste trabalho com o objetivo de analisar o potencial de crescimento e possível potencial de degradação de corantes.

Os microrganismos *Phomopsis* sp, *P. microspora*, *Pestalotiopsis* sp, *P. vismae*, *C. boninense* são endofíticos. De acordo com BACON e WHITE (2000), microrganismos endofíticos são organismos que colonizam tecidos internos das plantas sem causar qualquer efeito negativo imediato. Os fungos endofíticos são geralmente intercelulares e podem ser identificados ou por exame microscópico do tecido ou por isolamento em meios de cultura. Microrganismos capazes de colonizar tecidos internos de um vegetal foram denominados de endofíticos pela primeira vez por De Bary em 1866 (STONE, 1988). PETRINI (1991) propôs que a definição expandida para incluir todos os

organismos que fossem capazes de colonizar os tecidos internos dos vegetais, sem causar um dano aparente.

Os microrganismos endofíticos encontrados nos vegetais são fungos e bactérias, sendo fungos mais freqüentes. Estes penetram nos tecidos vegetais de seus hospedeiros pelos estômatos e raízes, ferimentos ou através de secreção de enzimas hidrolíticas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004)

PETRINI (1986) encontrou fungos endofíticos em todas as espécies vegetais estudadas e concluiu que todas as plantas vivas podem, potencialmente, ser hospedeiras destes fungos.

Potencialmente úteis, os microrganismos endofíticos podem ser utilizados como fonte de metabólitos primários e secundários. O ácido coletótrico, um metabólito do fungo endofítico *Colletotrichum*, apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Sarcina lútea* (ZOU et al.,2000). Outro exemplo observado foi a presença de fungos endofíticos na árvore tropical *Theobroma cacao* no Panamá, que confere a defesa da planta contra um dos seus maiores patógenos, *Phytophthora* sp. (ARNOLD et al.,2003).

3.3 O GÊNERO *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* é um dos principais causadores de doenças em plantas de cultivos tropicais, provocando grandes perdas de produção em fruteiras, hortaliças, leguminosas, gramíneas e ornamentais, espécies presentes em grande quantidade na Região Nordeste. Também é freqüentemente relatado em diferentes espécies de plantas cultivadas em todo o mundo causando doenças (LOPEZ, 2001). Desta forma, estudos relacionados com a fisiologia destes fungos se tornam relevantes.

3.4 O GÊNERO *Phomopsis*

Phomopsis é um ascomiceto, cujo habitat é o caule de plantas lenhosas e herbáceas (HANLIN & MENEZES, 1996). É o agente causal da queima da

haste de soja e da podridão de seus frutos e de outras sementes. Este gênero tem sido relatado como endófito tanto em diferentes hospedeiros tropicais (PEREIRA, 1993; MEDEIROS-GALVÃO, 1998 ; GUIMARÃES, 1998) como em palmeiras (RODRIGUES & SAMUELS, 1990; GUO *et al.*, 2000).

Muitos fungos deste gênero são importantes patógenos de plantas (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Carrol (1986) observou que diversas linhagens têm sido classificadas como endofíticos mutualísticos. SINCLAIR & CERKAUSKAS (1996) informaram que várias espécies também estão associadas com infecção latente em diversas plantas.

3.5 O GÊNERO *Pestalotiopsis*

Espécies de *Pestalotiopsis* são encontradas como parasitas ou endófitos, presentes no solo ou em ramos, folhas, pecíolos e sementes, respectivamente. São pertencentes à ordem Melaconiales, família Amphispinariaceae. Os conidióforos são produzidos dentro do corpo de frutificação compacto, denominado acérvulo (SUTTON, 1980). Os conídios em geral apresentam cinco células, sendo três células medianas de coloração marrom e duas células (apical e basal) hialinas, com dois ou mais apêndices apicais (JEEWON *et al.*, 2002).

STROBEL (1996; 1997), declara que *Pestalotiopsis* sp podem ser um grupo de fungos com grande potencial biotecnológico devido à produção de importantes metabólitos secundários, entre eles o taxol, descoberto inicialmente na planta *Taxus* spp. O endófito *P. microspora*, isolado da árvore *Torreya taxifolia*, produz vários compostos com propriedades antifúngicas, incluindo pestalosite, pestalopirone e hidroxipestalopirone (LEE *et al.*, 1996). LI *et al.* (2001) destacaram a produção de ácido ambuico, um agente antifúngico, produzido por *P. microspora*. STROBEL *et al.* (2002) detectaram a produção do metabólito isopestacina, por *P. microspora* com propriedades antifúngicas e antioxidantes.

3.6 O GÊNERO *Heteroporus*

É um basidiomiceto e caracteriza-se pela produção de enzimas capazes de degradar lignina, por esse motivo é de grande interesse para a realização

de ensaios com biodegradação (KAMIDA,2007). BETTUCCI et al. (2002) relataram em levantamento de fungos do ambiente da delta do Rio Paraná, a ocorrência deste gênero dentre os organismos de isolamento raro. Apesar de ser um organismo bastante promissor pela produção de ligninases, pouca informação é encontrada na literatura sobre este gênero.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O pesquisa foi realizada no Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. E contou com o auxílio do professor Jaime Paba do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

O material biológico utilizado foram os fungos endofíticos dos gêneros *Phomopsis* sp, *P. microspora* (6JA), *Pestalotiopsis* sp (SD07), *Pestalotiopsis vismae* (48 J), *C. boninense* (FAC25) e basidiomiceto *H. biennis*.

Os corantes utilizados foram do tipo Remazol, sendo eles: o Azul Brilhante, Amarelo Ouro e o Vermelho.

4.1 MEIOS DE CULTURA

4.1.1 MEIO COMPLETO (MC) (PONTECORVO *et al.*, 1953, modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973).

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Peptona	2,0 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL
Água destilada	p/ 1.000 mL

4.1.2 MEIO MÍNIMO (MM)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g

FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	5,0 g
pH	6,8
Água destilada	p/ 1.000 mL

4.1.3 MEIO MÍNIMO SAIS

KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
pH	6,8
Água destilada	p/ 1.000 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1.0M. Para MC sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. Para MM sólido foi adicionado ágar, para a versão líquida não foi colocado ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

4.1.4 SOLUÇÃO DE VITAMINAS

Ácido Nicotínico	100,0 mg
Ácido <i>p</i> -Aminobenzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
H ₂ O destilada esterilizada	p/ 100 mL

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e armazenada em frasco escuro, previamente autoclavado, a 4°C.

4.1.5 MEIO BATATA – DEXTROSE - ÁGAR (BDA)

Batata descascada e cortada	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	15,0 g
H ₂ O destilada	p/1000,0 mL

As batatas foram cozidas em 500 mL de água destilada durante 20 minutos. Filtrou-se com gaze, adicionou-se a dextrose ao caldo e completou-se com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado para 5,8 adicionando-se NaOH 1.0M e/ou HCl 1.0M conforme a necessidade. Acrescentou-se o ágar.

4.2 PROTOCOLOS

4.2.1 CAPACIDADE DE CRESCIMENTO COM O CORANTE E SELEÇÃO DE ISOLADOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO

Todos os isolados fúngicos foram ensaiados quanto à capacidade de crescimento em meio mínimo acrescido de cada corante. Também ocorreu uma primeira seleção dos isolados que depois de incubados por até 45 dias, alteram a coloração do corante ensaiado. Esta análise foi apenas visual. Os isolados selecionados foram utilizados nas próximas análises.

4.2.2 DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS CORANTES A SEREM UTILIZADOS

Foi preparada uma solução de cada corante em água, em concentração 0,1g/L. Usando água como branco, foi determinada a absorbância de cada solução entre 200-700 nm a intervalos de 50 nm. Realizou-se o mesmo procedimento com o meio mínimo líquido para determinar a concentração para o ensaio de degradação. De acordo aos espectros obtidos foi escolhido a concentração para o ensaio de degradação.

4.2.3 ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO

4.2.3.1 EM MEIO LÍQUIDO

- Cultivou-se o fungo em meio sólido mínimo e foi incubado a 28°C no escuro (5 -10 dias antes do ensaio).

- Dissolveu-se o corante em meio mínimo líquido (sem ágar) em concentração 0,1g/L .
- Foi distribuído em tubinhos (5mL por frasco) e autoclavado.
- Inoculou-se 4 vidrinhos, cada um com 1 disco (obtido com furador de rolhas) da cultura do fungo em meio sólido.
- Foi incubado a 28°C no escuro e monitorada a mudança de cor a cada 5 dias.
- No dia 15 (devido à mudança visual) retirado os sobrenadantes de cada vidrinho, colocado em tubo de centrifuga calibrado e completado o volume com água.
- Foi centrifugado 05 min/10.000 rpm e retirado o sobrenadante (uma alíquota para espectro e outra para eletroforese).
- Mediu-se no espectrofotômetro cada amostra por varredura entre 200-700 nm usando água como branco (dados ilustrativos).
- Foi medida a absorbância em comprimentos de onda fixos: 220, 240, 260, 280, 300 e o λ máximo de absorção para cada corante.
- Congelou-se amostra de sobrenadante centrifugada para eletroforese, hplc, contendo inibidor de proteases.

4.2.3.2 EM MEIO SÓLIDO

- Cultivou-se o fungo em meio mínimo sólido e incubou-se a 28°C na escuridão (10 dias antes do ensaio).
- O corante foi dissolvido (0,1g/L) em meio mínimo sólido (com ágar), esterilizado no autoclave e servido 5mL por vidrinho.
- Inoculou-se o meio com corante usando 1 disco (cortado com furador de rolhas) da cultura previa.
- Incubou-se 28°C na escuridão.
- Finalizado o tempo de incubação (15 ou 30 dias) rasgou-se o meio (controle e amostra) totalmente usando alça de arame ou estilete, etc.
- Adicionou-se 2 mL de água destilada estéril.
- Incubou-se com agitação durante algumas horas.
- A solução aquosa foi retirada em tubo do tipo falcon 15 mL e repetir a extração.

- Centrifugou-se a solução aquosa 5 min/max velocidade.
- O sobrenadante reservado.
- Determinaou-se o espectro de absorção do sobrenadante.

4.2.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE NO CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO

- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 0,1g/L .
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 0,1g/L (controles).
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 0,5 g/L .
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 0,5 g/L (controles).
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 1,0 g/L .
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 1,0 g/L (controles).
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 2,0 g/L .
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 2,0 g/L (controles).
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 5,0 g/L .
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 5,0 g/L (controles).

4.2.5 USO DO CORANTE COMO FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO

- 4 frascos com sol. de sais e corante 0,1g/L.
- 4 frascos com sol. de sais sem corante.
- 4 frascos com meio mínimo.
- Inoculou-se todos os tubos com fungo.
- Incubou-se por 15 dias ou 30 dias.

4.2.6 PESO SECO DO MICÉLIO

- Colocou-se as culturas líquidas em tubo do tipo falcon de 15 mL e centrifugou-se 5min / 5000 rpm.
- Retirou-se o sobrenadante.
- Ressuspendeu-se o pellet (sedimento) em 1,5 mL de água e transferido para tubo do tipo *Eppendorf* (previamente pesado).
- Centrifugou-se 5 min/10.000 rpm e o sobrenadante foi retirado.
- Repetiu-se a lavagem.
- Secou-se em estufa a 50 °C por 12 h.
- O tubo foi novamente pesado.

4.2.7 ESPECTROFOTOMETRIA

- Coletou-se os sobrenadantes das culturas após centrifugação 5 min a 5000 rpm.
- Verificou-se a absorvância no lambda máximo de absorção do corante [quando necessário e possível por varredura de 200 a 800 nm (continua ou a intervalos de 50 nm)].

4.2.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO MICÉLIO SECO

- Adicionou-se ao micélio seco 200 uL de NaOH 1.0M.
- Foi colocado em banho fervente por 5 min.
- Esperou-se tempo suficiente para que a amostra resfriasse.
- Foi usado para dosagem o método de Bradford.

4.2.9 PROTOCOLO DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

- Componentes acrílicos (73g acrilamida, 2g Bis): 250 mL de água desmineralizada. A solução foi filtrada e armazenada em geladeira.
- Tampão do gel separador (Tris-HCl 3,778 M, Ph 8,9): 45,75g Tris; 60 mL de água desmineralizada. A água deve ser previamente aquecida para facilitar a dissolução. Após o resfriamento, titulou-se com HCl concentrado para pH 8,9. Completou-se o volume para 100 mL. Filtrou-se a solução e armazenou-se em temperatura ambiente.

- Tampão do gel concentrador (Tris-HCl 0,6173, pH 6,8): 7,475g Tris; 50 mL de água desmineralizada, titulou-se com HCl para pH 6,8 e completou-se o volume para 100 mL. A solução foi filtrada e armazenada em temperatura ambiente.
- Tampão do tanque (Tris-Glicina, pH 8,9): 63,2g Tris base; 39,9g glicina; 900 mL; sob agitação, dissolveu-se os produtos, completou-se o volume para 1000 mL. (O pH da solução deve ficar em torno de 9,2). Filtrou-se a solução e armazenou-se em geladeira. Diluir a solução a 1:10 antes do uso. O pH diminuirá para aproximadamente 8,9.
- Solução estoque de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%: 10g de SDS; Completou-se o volume para 100 mL com água destilada.
- Tampão da amostra: 5 mL de glicerol; 2,5 mL de solução-tampão do gel concentrador; 2,5 mL de azul-de-bromofenol; completou-se o volume para 25 mL. Armazenou-se a solução em -20°C.
- Solução de persulfato de amônia a 10%: 0,05g de persulfato de amônia; 0,5 mL de água desmineralizada.
- Logo que foram adicionados os catalisadores (persulfato e o TEMED) aplicou-se a solução nas formas do gel. Com o auxílio de uma seringa, aplicou-se a solução do gel separador no espaço entre as placas de vidro, até a altura de 1,5 cm abaixo da extremidade inferior do pente. Imediatamente após, completou-se com água destilada o espaço entre as duas placas para uniformização da parte superior do gel. Depois da polimerização (aproximadamente 15 a 20 minutos), o excesso da água entre as placas e a superfície do gel, foi removido. Inseriu-se o pente na solução de acrilamida. Removeu-se o pente e enxaguadas as cavidades resultantes com solução-tampão do tanque, diluída à razão de 1:10.
- Após a polimerização do gel concentrador, removeu-se o excesso de tampão com o auxílio de papel absorvente e as amostras foram aplicadas nas cavidades do gel, com o auxílio de uma pipeta, 50 a 100 mL do extrato de proteína. Completou-se as cavidades com solução-tampão do tanque, diluída e adicionado nos tanques superiores e inferiores, respectivamente 500 e 1000 mL, da mesma solução.
- Corar com nitrato de prata.

4.3 PRÓXIMAS ETAPAS

4.3.1 VERIFICAR SE A COMPOSIÇÃO DO MEIO ALTERA A SECREÇÃO DE ENZIMAS

- 4 Frascos com meio mínimo líquido e com Microrganismo.
- 4 Frascos com meio mínimo sólido e com Microrganismo.
- 4 Frascos com meio mínimo líquido, com corante (0,1g/L) e com Microrganismo.
- 4 Frascos com meio mínimo sólido, com corante (0,1g/L) e com Microrganismo.
- Incubado por 15 dias:
- Comparado o perfil de secreção de enzimas em SDS-PAGE

4.3.2 ATIVIDADE BIODEGRADATIVA DA SECREÇÃO DO FUNGO

- Incubou-se com antecedência (10 dias) o fungo em meio mínimo líquido contendo o corante, retirou-se o sobrenadante, esterilizar por microfiltração e adicionou-se um volume igual (500 uL) à cada replica biológica abaixo.
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 0,1g/L (inoculado com o filtrado sobrenadante).
- 4 Frascos com meio mínimo e com corante a concentração de 0,1g/L (controles).

Neste trabalho, durante a etapa 01, foram realizados três ensaios. No primeiro foram feitas oito réplicas de cada corante para as linhagens de fungos, sendo quatro com meio mínimo líquido e quatro com meio mínimo sólido, portanto um total de 120 vidrinhos.

As linhagens utilizadas neste ensaio foram: *Phomopsis* sp, *P. microspora* (6JA), *Pestalotiopsis* sp (SD07), *Pestalotiopsis vismae* (48J), *C. boninense* (FAC25).

No segundo experimento foram utilizadas as mesmas linhagens do experimento anterior e o mesmo número de réplicas.

Em vista de resultados desfavoráveis, observados na primeira triagem, com as linhagens *Phomopsis* sp, *P. microspora* (6JA), *Pestalotiopsis* sp (SD07)

e *C. boninense* (FAC25), estas não foram inoculadas no terceiro ensaio. Assim somente a linhagem *Pestalotiopsis vismae* (48J) foi inoculada. Uma nova linhagem foi adicionada a este ensaio: *Heteroporus biennis*. Esta foi adicionada por já possuir boas possibilidades na degradação de poluentes. O número de réplicas com os corantes, para cada linhagem foi igual ao dos outros ensaios.

Em todas as réplicas, separadamente, foi colocado 5 mL de meio mínimo, em pequenos frascos, acrescido dos seguintes corantes Remazol Amarelo Ouro (RNL 150%), Remazol Azul Brilhante (BB 133%) e o Remazol Vermelho (RB 133%) na concentração de 0,1g/L, conforme o protocolo.

Os fungos utilizados tinham 10 dias de crescimento em placa de *petry*, cada um cultivado em meio de cultura favorável. Para o inóculo foi utilizado o “padrão punch” com 5 mm de diâmetro. Os ensaios foram realizados ao lado do bico de Bunsen, dentro do fluxo laminar, com os materiais devidamente esterilizados. Os frascos ficaram incubados a 28⁰C no escuro, conforme o protocolo. A partir do terceiro ensaio foi utilizado apenas meio mínimo líquido, pois no meio sólido não houveram resultados consideráveis nos dois primeiros ensaios, portanto na etapa seguinte os meios utilizados para os ensaios não continham ágar.

Conforme os protocolos dos próximos experimentos foram realizados dois ensaios, ambos com as linhagens *Heteroporus biennis* e *Pestalotiopsis vismae*.

O primeiro avalia o efeito da concentração do corante no crescimento do microrganismo. Para isso foi inoculado os fungos em vidros com meio mínimo e corante nas seguintes concentrações 0,1 g/L - 0,5 g/L - 1,0 g/L - 2,0 g/L - 5,0 g/L, conforme o protocolo. Após 30 dias de incubação foi coletado o micélio para determinação de peso seco e teor de proteína. Os sobrenadantes foram retirados para espectrofotometria no lambda máximo de absorção. A dosagem de proteína foi feita de acordo com o método de Bradford.

O outro ensaio tinha como objetivo observar se o microrganismo utiliza o corante como fonte de carbono e nitrogênio. Após 15 dias de incubação o micélio foi coletado e seco em estufa, para determinação de peso seco e teor de proteínas. Os tubos tipo *Eppendorf* utilizados foram previamente pesados para que a massa deles fosse descontada da massa final já com os micélios secos.

Após isto foi feita a maceração do micélio com NaOH 1.0 M e posteriormente banho – maria para que todas as células fossem colapsadas. Com o micélio preparado foi utilizado o método de Bradford para dosagem das proteínas. Essa dosagem traria melhores resultados se fosse feita com o sobrenadante (admitindo-se que o fungo secretou enzimas para a biodegradação), mas o reagente de Bradford é alterado pelo corante presente no sobrenadante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento da complexidade e dificuldade para o tratamento de efluentes têxteis de um modo geral tem levado a busca constante de novas metodologias para tratamento destes rejeitos. Dispomos de uma variedade de métodos físicos, químicos e biológicos e a escolha do melhor, ou melhores, métodos certamente deve ser feita levando-se em conta os objetivos a serem alcançados com o tratamento.

Aliado a isso, uma visão moderna com relação aos efluentes industriais deve estar baseada não somente no tratamento, mas sim na busca constante da minimização de resíduos gerados através de tecnologias otimizadas, ou seja, o pensamento deve se voltar para a raiz do problema que é a fonte do efluente dentro da empresa e não somente como resolver o problema após sua geração.

Os corantes lançados no meio através dos efluentes da indústria têxtil, como já citado, é um grave problema ambiental acarretando um sério impacto para os locais onde são despejados. Sem um tratamento que seja realmente efetivo esses rejeitos alteram a qualidade da água assim como as plantas e outros seres vivos ao redor. Por ser um tema muito importante e interessante é um ótimo tema a ser pesquisado, que é o caso deste trabalho.

Os ensaios foram analisados no início de novembro, portanto houveram dados de 45 dias, de 30 dias e 15 dias. Estes aparecem resumidos nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Ensaio 45 dias de incubação em meios acrescidos com corantes na concentração 0,1g/L

Fungos	Remazol Azul Brilhante	Remazol Vermelho	Remazol Amarelo Ouro
<i>Meio Sólido</i>			
<i>P. vismae</i>	Parcial	*	Negativo
<i>P. microspora</i>	Parcial	*	Negativo
<i>Pestalotiopsis</i> sp	Negativo	*	Negativo
<i>Phomopsis</i> sp	Negativo	*	Negativo
<i>C. boninense</i>	Negativo	*	*
<i>Meio Líquido</i>			
<i>P. vismae</i>	*	*	Negativo
<i>P. microspora</i>	Parcial	*	Negativo
<i>P. sp</i>	Negativo	*	*
<i>Phomopsis</i> sp	Total	*	Negativo
<i>C. boninense</i>	Negativo	*	Negativo

Nota: * Experimento perdido por contaminação

Tabela 2 - Ensaio 30 dias de incubação em meios acrescidos com corantes na concentração 0,1g/L

Fungos	Remazol Azul Brilhante	Remazol Vermelho	Remazol Amarelo Ouro
<i>Meio Sólido</i>			
<i>P. vismae</i>	*	*	*
<i>P. microspora</i>	*	*	*
<i>P. sp</i>	*	*	*
<i>Phomopsis sp</i>	*	Negativo	Negativo
<i>C. boninense</i>	*	Negativo	Negativo
<i>Meio Líquido</i>			
<i>P. vismae</i>	*	*	*
<i>P. microspora</i>	*	*	*
<i>P. sp</i>	*	*	*
<i>Phomopsis sp</i>	*	*	Negativo
<i>C. boninense</i>	*	*	Negativo

Nota: * Experimento perdido por contaminação

Neste ensaio houve um grande número de frascos contaminados, principalmente com as linhagens de *Pestalotiopsis*, devido a razões desconhecidas.

Tabela 3 - Ensaio 15 dias de incubação em meios acrescidos com corantes na concentração 0,1g/L

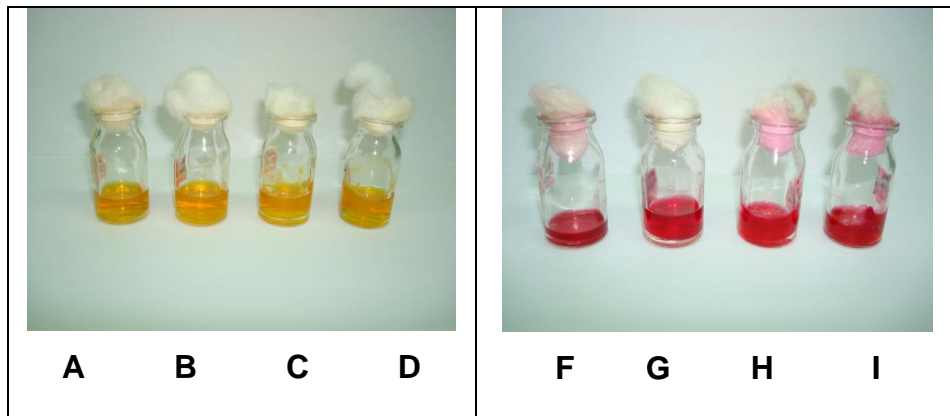
Fungos	Remazol Azul Brilhante	Remazol Vermelho	Remazol Amarelo Ouro
Meio Sólido			
<i>P. vismae</i>	Mínima	Negativo	Negativo
<i>H. biennis</i>	Total	Parcial	Negativo
Meio Líquido			
<i>P. vismae</i>	Negativo	Negativo	Negativo
<i>H. biennis</i>	Total	Negativo	Negativo

Em nenhum dos ensaios não houveram evidências de bioadsorção, ou seja, o micélio não adquiriu a cor do corante.

Após a análise dessa primeira triagem foram realizados os seguintes experimentos. O primeiro avalia o crescimento do microrganismo em diferentes concentrações dos corantes e foi realizado com o *Heteroporus biennis* e o *P. vismae*. Com este fungo houve quase total contaminação do ensaio, provavelmente os inóculos já continham o contaminante. Por essa razão o ensaio com o *P. vismae* não foi analisado.

No ensaio com o *H. biennis*, os corantes amarelo e vermelho não foram descoloridos pelo fungo ou a descoloração foi mínima (Figura 3). Resultados satisfatórios foram obtidos com o Remazol Azul Brilhante (Figura 4). As fotos dos frascos com corantes amarelo e vermelho dizem respeito ao *H. biennis* em meio mínimo com uma concentração de 0,1 g/L de Remazol. Os frascos A, B e C, D representam os controles, os frascos C, D e H, I representam os inoculados. Esse padrão se repetirá para as outras fotos.

Figura 3: Remazol Vermelho e Remazol Amarelo Ouro em concentração 0,1 g/L



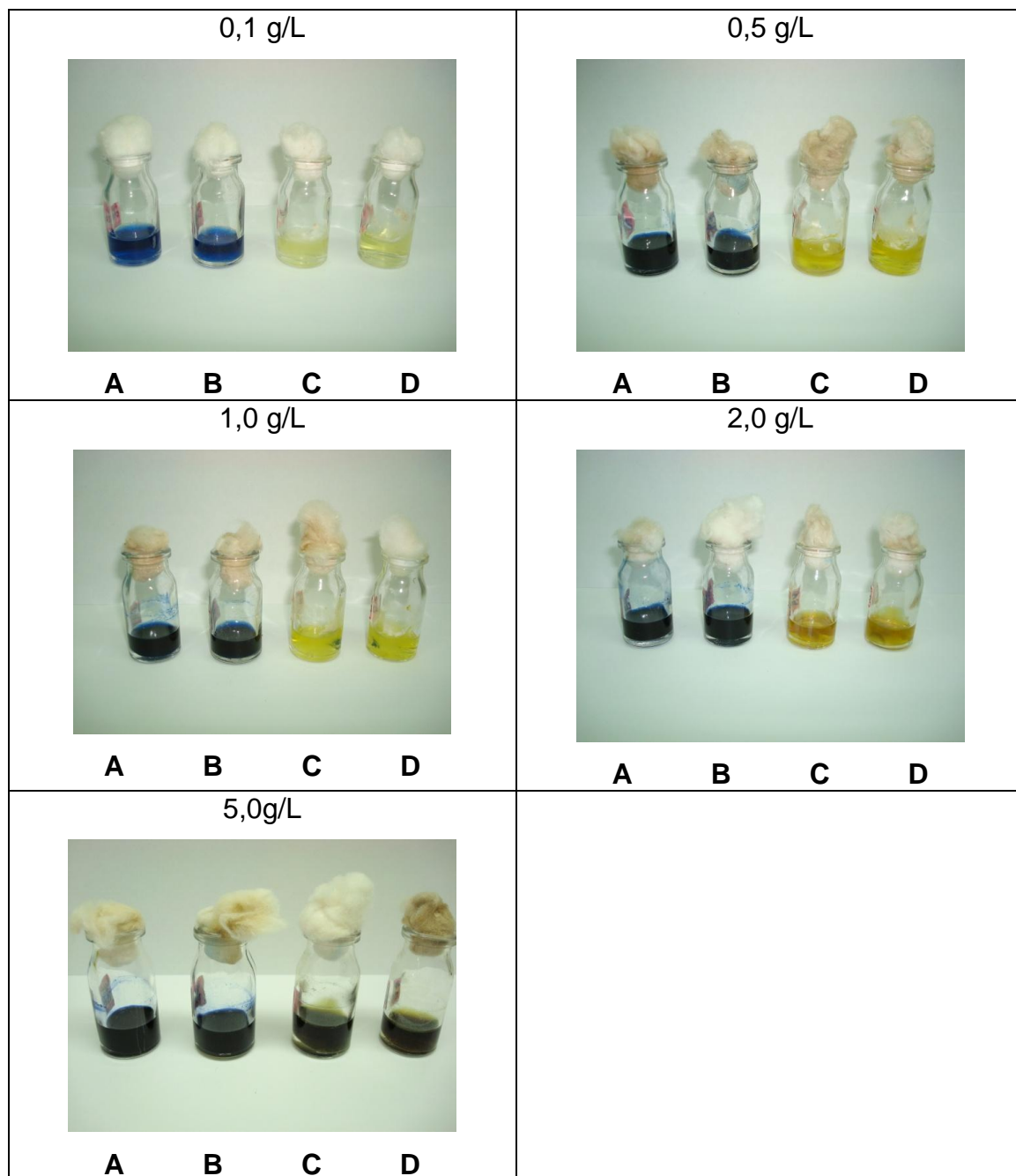
Fonte: A autora

Nota: *Heteroporus biennis* em meio mínimo líquido com 0,1g/L de corante, após 30 dias de incubação a 28°C. Em cada fotografia, os frascos A, B, F e G representam os controles, os frascos C, D e H, I representam os inoculados.

O Remazol Azul Brilhante foi bastante descolorido pelo *H. biennis*. Essa diferença de resultados, em comparação ao Remazol Vermelho e o Amarelo Ouro, se deve ao fato de que os Remazois possuem diferentes estruturas químicas.

Os resultados satisfatórios do Remazol Azul Brilhante, com as diferentes concentrações de corante podem ser observados na Figura 4.

Figura 4: *H. biennis* em meio mínimo líquido com diferentes concentrações de Remazol Azul Brilhante, após 30 dias a 28°C.

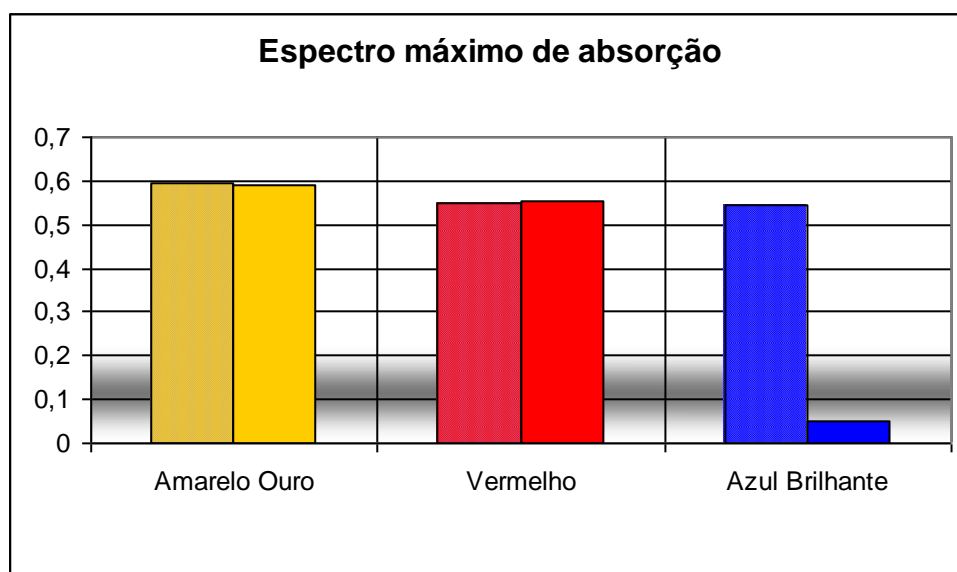


Fonte: A autora

Nota: Em cada fotografia, os frascos A, B representam os controles, os frascos C, D e representam os inoculados.

O sobrenadante de experimento que avaliava o crescimento do fungo em diferentes concentrações foi coletado para dosagem de proteínas e espectrofotometria. As amostras com Remazol Vermelho e Amarelo foram lidas apenas na concentração 1,0g/L para efeito de leitura, pois não apresentaram resultados satisfatórios (Gráfico 1). Analisando-se os dados do espectrofotômetro observa-se que o corante amarelo não foi significativamente degradado, assim como o vermelho. Já o corante Remazol Azul Brilhante foi bastante degradado pelo *H. biennis*.

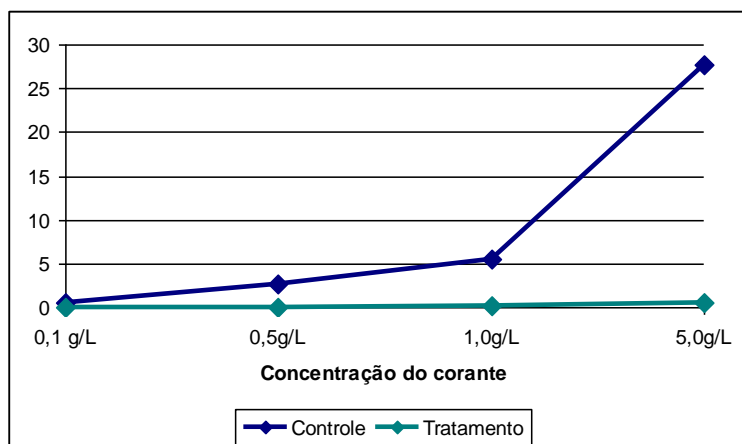
Gráfico 1: *Heteroporus biennis* em concentração 0,1g/L de corante.



Nota: A concentração avaliada foi a 0,1 g/L. Cada coluna da esquerda se refere aos controles e a da direita das amostras.

As amostras de Remazol Azul Brilhante foram lidas em todas as concentrações no espectrofotômetro como pode apresentado no Gráfico 2.

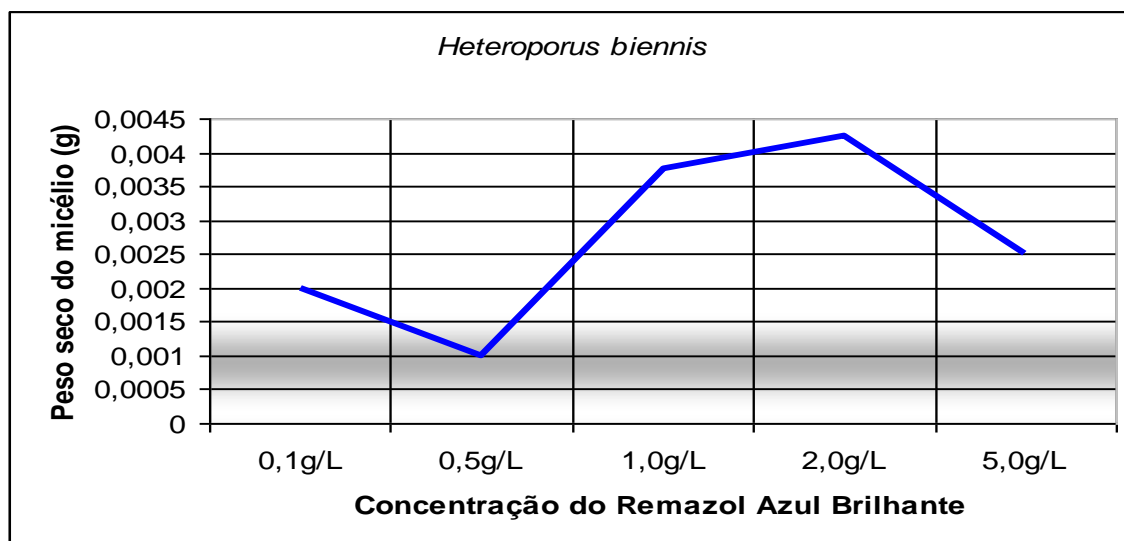
Gráfico 2: Amostras de Remazol Azul Brilhante lidas nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 g/L em espectrofotômetro, no controle e no tratamento.



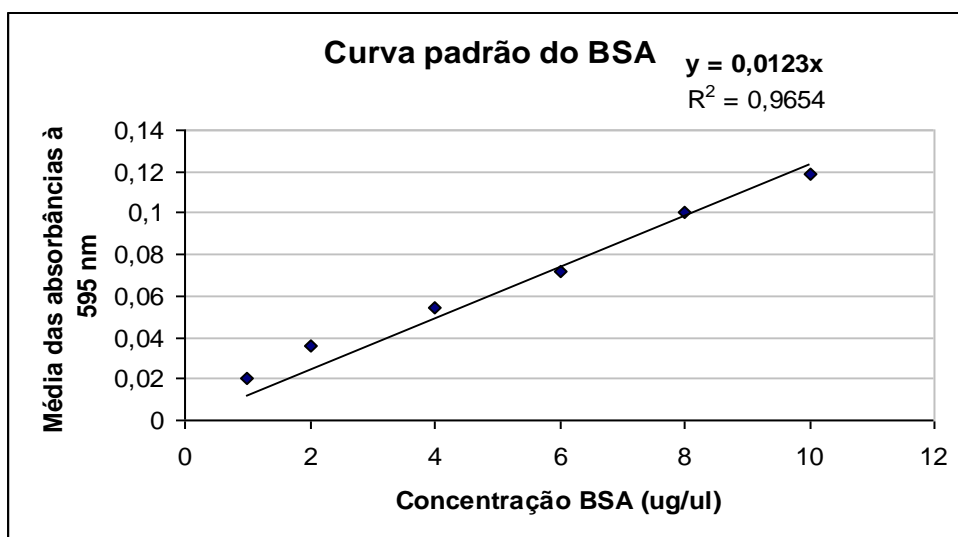
De acordo com o Gráfico 2 a absorvância aumentou pouco quando analisadas as amostras do tratamento. Isso se deve ao fato de que o microrganismo provavelmente degradou o corante, portanto a absorvância é baixa. Assim com a espectrofotometria foi possível avaliar, comparando com os controles, o quanto o corante foi descolorido pelo fungo.

Os micélios do ensaio, que continham diferentes concentrações de Remazol Azul Brilhante, foram coletados e secos para avaliar, com o auxílio da espectrofotometria, a hipótese de que o aumento da concentração de corante no meio inibe o crescimento do fungo. Com a análise das amostras pode se observar que com o aumento da concentração de corante o crescimento do fungo aumenta. Assim provavelmente o corante estimula o crescimento do *H. biennis*. Nas concentrações 0,5 g/L e 2,0 g/L de corante o fungo teve um decréscimo no crescimento. Este experimento precisa ser repetido para que seja feita uma análise estatística e confirmação ou não da hipótese. Estes dados podem ser conferidos no Gráfico 3.

Gráfico 3: Crescimento do fungo em função do aumento da concentração de Remazol.



Um outro ensaio foi realizado para avaliar se o fungo utiliza o corante como fonte de carbono e nitrogênio. Para avaliar os resultados foi feita uma curva padrão (Gráfico 4) utilizando padrões de soro albumina bovino (BSA) como parâmetro de avaliação de quantidade de proteína. Tradicionalmente, a proteína BSA é utilizada como padrão para a quantificação protéica resultante do metabolismo celular (Lowry *et al.*, 1995). Para obtenção da curva padrão para proteína, foram feitas seis medidas de absorvâncias, a 595nm, para diferentes diluições. Pelo resultado obtido, pode-se observar uma correlação linear ($R^2= 0.0123$). Com a equação da reta obtida, foi possível determinar a concentração de proteínas (g/L) provenientes do micélio seco, medindo a absorvância da amostra no comprimento de onda ótimo: 595nm.

Gráfico 4: Curva padrão do BSA

Tomando como base os valores da curva padrão foi possível calcular, através da equação da reta: $y = 0,0123x$, sendo y a leitura feita com base no BSA e x a quantidade de proteína existente na amostra. A quantidade de proteína existente nas réplicas inoculadas em meio saís com Remazol Vermelho, com Remazol Amarelo Ouro, Remazol Azul Brilhante, meio mínimo sem corante e meio saís são mostradas na Tabela 4. O meio mínimo e o meio saís sem corantes foram os parâmetros para avaliar como o fungo cresce nesses meios sem a presença do corante.

Tabela 4: Quantidade de proteína e micélio seco das réplicas

Amostras	Peso seco do micélio (g)	Quantidade de proteínas em ug/ uL
Corante Vermelho 1	0,003	3,98374
Corante Vermelho 2	0,002	4,796748
Corante Vermelho 3	0,002	2,764228
Corante Vermelho 4	0,001	3,495935
Corante amarelo Ouro 1	0,001	4.959.349
Corante Amarelo Ouro 2	0,001	2,439024
Corante Amarelo Ouro 3	0,001	3,08943
Corante Amarelo Ouro 4	0,002	2,439024
Corante Azul Brilhante 1	0,004	3,14634
Corante Azul Brilhante 2	0,001	2,764227

Corante Azul Brilhante 3	0,003	1,463414
Corante Azul Brilhante 4	0,001	4,715447
Meio mínimo sem corante 1	0,005	5,853658
Meio mínimo sem corante 2	0,002	5,528455
Meio mínimo sem corante 3	0,001	6,341463
Meio mínimo sem corante 4	0,005	5,934959
Meio sais sem corante 1	0,001	3,333333
Meio sais sem corante 2	0,001	2,357723
Meio sais sem corante 3	0,002	2,03252
Meio sais sem corante 4	0,002	5,121951

Com base nos dados obtidos pela leitura feita no espectrofotômetro, após a leitura com BSA, pode-se observar que em meio mínimo o fungo apresentou maior quantidade de proteínas, pois a fonte de carbono e nitrogênio está mais acessível ao microrganismo. Quanto aos dados obtidos com as amostras retiradas de meio mínimo com sais sem corante e o meio mínimo sais com corante há uma indicação de que o fungo utiliza o corante como fonte de carbono e nitrogênio, mas precisaria de repetições do experimento e uma análise estatística para que fosse possível confirmar esta hipótese.

6 CONCLUSÕES

- Todos os fungos avaliados demonstraram capacidade de crescimento em meios com os corantes do tipo Remazol vermelho, amarelo ouro e azul brilhante, mesmo na ausência de outras fontes de carbono e nitrogênio.
- Foram selecionados os fungos *Heteroporus biennis* (isolado do ambiente) e *Pestalotiopsis vismae* (isolado endofítico) como promissores na degradação de corantes, principalmente o azul brilhante.
- O isolado utilizado do fungo *H biennis* não sofreu inibição do crescimento com o aumento da concentração do corante azul brilhante, ao contrário, parece ocorrer um aumento da massa micelial, porém novas análises deverão ser feitas para confirmar esta hipótese.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2004/textil/efluentes.htm

Acessado 18/10/07

<http://www.ida.org.br/>

Acessado 22/11/07

<http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/resource/download/41746>.

Acessado 22/11/07.

AL-DEGS, Y.; KHRAISHEH, M.A.M.; ALLEN, S.J.; AHMAD, M.N.; Effect of carbon surface chemistry on the removal of reactive dyes from textile effluent, *Wat. Res.*, v 34, n.3, p. 927-935, 2000.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C, **Eletoforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, 1991. 242p. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMIS, C.W. **Introductory Mycology**. 4th ed. John Wiley & Sons INC, USA, 1996.

ANJANEYULU, Y.; CHARY, N. S.; RAJ, D.; SAMUEL S. Decolourization of industrial effluents -- available methods and emerging technologies – a review. **Review in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 4, p. 245-273, 2005

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

[ARNOLD, A.E.](#); [MEJIA, L.C.](#); [KYLLO, D.](#); [ROJAS, E.I.](#); [MAYNARD, Z.](#); [ROBBINS, N.](#); [HERRE, E.A.](#) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. [Proceedings of the National Academy of Sciences - USA](#), Washington, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 2003.

ARSLAN, I.; BALCIOGLU, I.A.; TUHKANEN, T.; Advanced Oxidation of Synthetic Dyehouse Effluent by O₃, H₂O₂/O₃ and H₂O₂/UV Processes **Environment Technology**. V. 20, p. 921-931, 1999

BACON, C.W.; White, J.F.; An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In **Microbial endophytes**. Edited by C.W.. p. 3-29. 2000.

BAKER, R.E.D. Studies in the pathogenicity of tropical fungi. II. The occurrence of latent infections in developing fruits. **Annals of Botany**, London, v.2, p. 919-931, 1938.

BETTUCCI, L*; MALVAREZ, I; DUPONT, J; BURY, E; ROQUEBERT, M. Paraná river delta wetlands soil microfungi. **Pedobiologia** **46**, p. 606–623, 2002.

BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 411-451, 1986.

BOLAND, G.J. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 14, p. 10-17, 1992.

CARROLL, G.C.; CARROLL, F. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 5, p. 3034-3043, 1978.

CHU, Y.M.; JEON, J.J.; YEA, S.J.; KIM, Y.H.; YUN, S.H. LEE, Y.W.; KIM, K.H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2529-2534, 2002.

DAVIS, S., BURNS, R. G. **Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases**. Appl. Microbiol. Biotechnol. V.32, p.721-726, 1990.

DELLAMATRICE, P. M. & MONTEIRO, R. T. R., Toxicidade de resíduos têxteis tratados por microorganismos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, v.1, p. 63-66, 2006.

DEVECI, T.; UNYAYARA, A.; MAZMANCI, M.A. Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC200800. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.30, p. 25-32, 2004.

ESPLUGAS, S., *Curso técnico*, 8-10 de novembro, 1995, LRR-Universidad de Concepcion-Chile

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: **Edusc**, 510p, 2004.

FERREIRA, O.P. **Desenvolvimento de materiais porosos bidimensionais, à base de Al³⁺ e M²⁺ (Zn, Mg), para uso na remediação de efluentes de indústrias têxteis**. 132 p. Dissertação (Mestrado) – Laboratório de Química do Estado Sólido – LQES, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

FERREIRA V. S., MAGALHÃES D. B., KLING S.H, DA SILVA J. G., BON E. P. S., **N-demethylation of methylene Blue by Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium***. Applied Biochemical Biotechnology, v.84, p. 255, 2000.

GUARATINI, C. C. I; ZANONI, M. V. B. **Corantes Têxteis**. Departamento de Química Analítica – Instituto de Química – UNESP – Araraquara – SP, 1999.

GUIMARÃES, V. C. **Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro *Paulinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart) Ducke e análise da variabilidade genética, detectada por marcadores RAPD, no endófito *Glomerella cingulata***. 115p. Dissertação de Mestrado, UFSCar/UFAM. Manaus, Amazonas, 1998.

GUO, L.D, HYDE, K.D, LIEW, E.C.Y., Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences *New Phytologist* v.147, p.617-630, 2000.

HANLIN, R.T.; MENEZES, M.. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPe. Recife-PE. 274p, 1996.

HAMMEL, K. E. Oxidation of aromatic pollutants by lignin degrading fungi and their extracellular peroxidases. **Metal Ions Biology System**, v. 28, p. 41-60, 1992

HOFFMANN, M.; MARTIN, S.T.; CHOI, W; BAHNEMANN, W.; **Chem. Rev.**, v. 95, p. 69, 1995.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in apressorium function. **Experimental Mycology**, Orlando, v.13, p. 403-418, 1989.

GALINDO, C.; JACQUES, P.; KALT, A.; *J. Photochem. Photobiol. A*, v.130,p. 35, 2000.

GUARATINI, C.C.I., ZANONI, M. V. B. **Química Nova** v.23(1), p. 71, 2000.

IMMICH, A. P. S; Remoção de corantes de efluentes têxteis utilizando olhas de *Azadirachta indica* como adsorvente, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 25, p. 378–392, 2002.

KAMIDA, H.M.K; SOARES,H.P.; SANTOS, I. S.; UTENABARO, A. **Biodegradação de Efluentes Têxteis por Fungos Basidiomicetos Produtores de Enzimas Lignolíticas**. *Sitientibus*. Série ciências Biológicas, v.7, p.143-149, 2007.

KUBO, Y.; TAKAMO, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA,S.; FURUSAWA, I. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4340-4344, 1996.

KUNZ, A. **Remediação de efluente têxtil: combinação entre processo químico (Ozônio) e Biológico (*P. chrysosporium*)**. 130 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

KUNZ, A.; MANSILLA, H. FREER, J. BAEZA, J.; DURAN, N.; *Proc. 5th Braz. Symp. on the Chem. Lignins Wood Compon.*, p. 92, 1997.

KUNZ, A.; FREIRE, R.S.; ROWEDLER, J.J.R.; MANSILLA, H.; RODRIGUEZ, J.; DURAN, N.; **Química Nova** 22, 425, 1999.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMOTRA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de Efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p.78-82, jan. /fev, 2002.

KUNZ, A.; REYES, J.; DURÁN, N.; *Proc. Int. Conf. Dif. Poll.*, , 16-20 may. Perth-WA-Australia, 1999.

LANGLAIS, B.; LEGUBE, B.; BEUFFE, H.; DORÉ, M.; *Wat. Sci. Technol.* **1992**, 25,135

LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOSKY, E.; CLARDY, J. C. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61. p. 3232-3233, 1996.

LEGRINI, A.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M.; *Chem. Rev.*, v.93, p. 671, **1993**.

LIN, S.H.; YEH, K.L.; *Chem. Eng.* **1993**, May, 112.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas - RAPP**, [S.I.], v. 9, p. 291-338, 2001.

Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, R. L.; Randall, R. J.; (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent". **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265–275.

MASTEN, S.T.; DAVIES, S.H.R.; *Environ. Sci. Technol.*, v.28, p.181A, **1994**.

MEDEIROS-GALVÃO, R.S. **Variabilidade Genética detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais freqüentes, isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos/ Universidade do Amazonas, São Carlos, São Paulo, p.151, 1998.

MOMOHARA, I.; MATSUMOTO, Y.; IUZU, A. Involvement of veratryl alcohol and active oxygen species in degradation of a quinone compound by lignin peroxidase. *FEBS Letters*, v. 273, p. 159-162, 1990.

MORAIS, S. G. **Processo fotocatalítico combinado com sistemas biológicos no tratamento de efluentes têxteis**. 141 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

MOREIRA, P. R.; ALMEIDA-VARA, E.; SENA-MARTINS, G.; POLÓNIA, I.; MALCATA, F. X.; DUARTE, J.C. Decolourisation of Remazol Brilliant Blue R via novel *Bjerkandera* sp strain. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 107-111, 2001

NICOLET, L.; ROTT, U.; *Wat. Sci Technol.*, v.40, p.191, **1999**

PASTI, M. B.; CROWFORD, D. L. Relationships between the abilities of *Streptomyces* to decolorize three anthron-type dyes and to degrade ligninocellulose. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 902-907, 1991.

PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M. B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D. L.; CRAWFORD, R. L.; *Enzyme Microb. Technol.*, v.13, p. 378, **1991**.

PERALTA-ZAMORA, P.; KUNZ, A.; MORAES, S.G.; PELEGRINI, R.; MOLEIRO, P.C.; REYES, J.; DURÁN, N.; *Chemosphere*, v.38, p.835, **1999**

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O., **Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report**. *Mycologia*, 85: 362-364, 1993.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**, Springer Verlag, p. 179-197 , 1991.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of arial plant tissues. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J.VAN DEN (Ed). *Microbiology of the Phyllosphere*. **Cambridge University Press**, p. 175-87, 1986.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MaC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 5, p. 141.

PUIGJANER, L., ESPUÑA, A., ALMATÓ, M., **A Software Tool for Helping in Decision-Making About Water Management in Batch Process Industries**. *Waste Management*, V. 20, p.645-649, 2000.

RAJESH J,a; EDWARD C.Y. LIEW,b ;J A. SIMPSON,c; I. JOHN HODGKISS,d and KEVIN D. Hyded. **Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species**. V. 27, p. 372-383, 2002.

REID, I. D.; McDONALD, J. C. Anthracenediethanol inhibits lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium* by competing for oxidation by lignin peroxidase, and not by trapping single oxygen. **Biodegradation**, v. 2, p. 61-69, 1991.

RODRIGUES, K. F.; Samuels, G. J.. **Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm.** *Mycological Research*, v.94, p. 827-830, 1990.

SASAKI, A.; ONOUE, M.; KANEMATSU, S.; SUZAKI, K.; MIYANISHI, M.; SUZUKI, N.; NUSS, D.L.; YOSHIDA, K. Extending chestnut blight hypovirus host range within Diaporthales by biolistic delivery of viral cDNA. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n. 8, p. 780-789, 2002.

SINCLAIR, J.B. & CERKAUSKAS, R.F.. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In: **Endophytic Fungi in Grasses and Wood Plants-Systematics, Ecology and Evolution**, Redlin, S.C. & Carris, L.M. (eds.), St. Paul, p.67-86, 1996.

SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V.; *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, p.2397, **1992**.

STONE, J.K. **Foliar Endophytes of *Pseudotsuga mensiesii* (Mirb.) franco-cytology and physiology of the host-endophyte relationship.** University of Oregon, Eugene, (Ph D. Thesi), 124p.

STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E. J.; SIDHU, R. S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Microbiology**, v.17, p.417-423, 1996.

STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E. J.; SIDHU, R. S.; SUMMERELL, B. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol producing endophyte of the *Wollemi Pine*, *Wollemia nobilis*. **Australian Journal Botanic**. v.45, p.1073-1082, 1997.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Review Biotechnologic**, v. 22, p. 315–333, 2002.

SUTTON, B. C. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. **Kew: Commonwealth Mycological Institute**, 960p, 1980.

SUTTON, B.C.. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J. A, Jeger, M. J. (Eds). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford, U.K.: CAB International, p.1-26, 1992

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. Effects of Mn²⁺ e NH₄⁺ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decolorization by *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 391-396, 1999.

TIAGO, P.V. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Paecilomyces fumosoroseus*.** Londrina, 2001. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina.

TROQUEST, J.; LARROCHE, C.; DUSSAP, C.G “Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bioremediation by solid-state fermentation” **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p,103-112, 2003.

VANDEVIVERE, P.V.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.72, p.289, 1998.

VINODGOPAL, K; WYNKOOP, D.E.; KAMAT, P.V.; *Environ. Sci. Technol.*, v.30, p.1660, 1996.

VYAS, B. R. M.; MOLITORIS, H. P. Involvement of an extracellular H₂O₂ - dependent ligninolytic activity of the white fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3919-3927, 1995.

WANG, Y.Z.; *Wat. Res.*, v.34, p.990, 2000.

WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, Lawrence, v.77, p. 323-327, 1985.

ZHU, C.M.; WANG, L.Y.; KONG L.R.; YANG, X.; WANG, L.S.; ZHENG, S.J.; CHEN, F.L.; FENG M.Z; ZONG, H.; **Chemosphere**, v.41, p.303, 2000.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.; TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1529-1530, 2000.