

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUILHERME BURGEL

DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL REMAZOL AZUL REATIVO 220 PELO
FUNGO ENDOFÍTICO *Curvularia lunata*

CURITIBA

2017

GUILHERME BURGEL

DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL REMAZOL AZUL REATIVO 220 PELO
FUNGO ENDOFÍTICO *Curvularia lunata*

Monografia apresentada à disciplina BIO028 - Estágio Curricular em Biologia do curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a. Vanessa Kava

CURITIBA

2017

TERMO DE APROVAÇÃO

GUILHERME BURGEL

DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL REMAZOL AZUL REATIVO 220 PELO
FUNGO ENDOFÍTICO *Curvularia lunata*

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Vanessa Kava

Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra Lygia Vitória Galli-Terasawa

Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná

Dra. Lisandra Santos Ferreira- Maba

Membro externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família pelo carinho. Especialmente a minha mãe Raquel, pelo apoio em todas as fases da minha vida.

Agradeço a professora Vanessa Kava, por aceitar ser minha orientadora, pelo apoio, pelos conselhos e pelo carinho.

Agradeço a Lisandra Santos Ferreira-Maba pelos conselhos e por sempre ter me ajudado.

Agradeço à empresa Vertika Agropecuária, em especial ao Dr. Francisco Terasawa Junior e também a Professora Dra. Lygia Vitória Galli-Terasawa pela oportunidade em bioprospectar fungos endofíticos em linhagens parentais e híbridas de milho.

Ao Professor Jaime Paba por disponibilizar os corantes utilizados no trabalho e equipamentos de análise no departamento de Bioquímica.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, pelo tanto me ajudaram nos experimentos.

Aos meus amigos pelos bons momentos que passamos juntos.

Agradeço a Paloma G. Ribas, pelos conselhos, pela grande ajuda, pelo carinho e pela nossa grande amizade que cultivamos juntos.

Agradeço também ao Hiro Takeuchi, pelo apoio nos tempos difíceis.

Muito Obrigado.

RESUMO

O uso intenso de corantes têxteis têm resultado em uma descarga de efluentes altamente poluentes. No ecossistema, as tintas sintéticas provocam vários danos para a fauna, flora e microbiota local. As técnicas tradicionais para a remoção de corantes têxteis de efluentes possuem várias desvantagens, como o alto custo e a formação de produtos secundários tóxicos. Dessa forma, a procura por novas alternativas mais eficientes é crescente. Uma delas é utilizar microrganismos para degradar os corantes, sendo que os fungos têm apresentado os melhores resultados para a descoloração de corantes. O gênero *Curvularia* é frequentemente descrito como fungo endofítico de plantas, espécies deste gênero são filamentosos e de rápido crescimento. A espécie *Curvularia lunata* possui atividade descorante relatada na literatura e apesar de na coleção de fungos endofíticos do LabGeM existirem vários isolados deste gênero, estes ainda não haviam sido avaliados quanto a este potencial. Portanto, este trabalho teve como objetivo selecionar os melhores isolados de *C. lunata* para a descoloração de corantes têxteis, verificar a origem da degradação e avaliar diferentes condições de cultivo. A metodologia aplicada envolveu o crescimento dos isolados dos fungos em meio mínimo líquido com a adição do corante Remazol azul 220 (RB220) e a verificação da descoloração por espectrofotometria. Dos seis isolados investigados inicialmente, os melhores resultados foram observados com os isolados LGMF996 e LGMF1008, com valores de descoloração de 97,8% e 96% respectivamente. A atividade descorante desses fungos está principalmente ligada ao seu micélio, entretanto, existe a liberação de enzimas no sobrenadante. Das diferentes fontes de carbono testadas, a adição de glicose (10 gL^{-1}) no meio de cultura com corante foi a que proporcionou os melhores resultados.

Palavras chave: Corantes Têxteis, Fungos Endofíticos, Remazol Azul 220.

ABSTRACT

The intensive use of textile dyes is resulting in a discharge of highly polluted effluents. These dyes on the ecosystem cause several damages to the local fauna, flora and microorganisms. Traditional techniques for the dye removal from wastewater have several disadvantages, such as high cost and dangerous secondary product formations. Therefore, the search for new low cost alternatives are expanding. One of them is using microorganisms to remove dyes and among them, fungi are the group with best results. The genus *Curvularia* is frequently described as an endophytic fungus, species of this genus are filamentous and fast growing. Decolorant activity of the specie *Curvularia lunata* has been reported. Although LabGeM's fungal collection owns strains of *C. lunata*, they have not yet been tested for dye removal. This project aims to select the best strains of *C. lunata* for discoloration, verify the origin of discoloration and evaluate different culture conditions. The applied methodology involves the growth of fungal strains in minimal liquid medium with the addition of textile dye reactive blue 220 (RB220) and spectrophotometric discoloration verification. From the six strains initially investigated, the best results were observed in the strains LGMF996 and LGMF1008, with discoloration values of 97.8% and 96%, respectively. The decolorizing activity of these fungi is mainly related with their mycelium, however, there are enzymes in the supernatant able to decolorize RB220. The best results with different carbon sources, added to the medium with RB220, was achieved with glucose, 10 gL⁻¹.

Keywords: textile dye, endophytic fungi, dye reactive blue 220

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1.1 GÊNERO <i>Curvularia</i>	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	11
3.2 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DOS ISOLADOS.....	11
3.3 ORIGEM DA ATIVIDADE DESCORANTE.....	12
3.4 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DOS ISOLADOS.....	14
4.2 ORIGEM DA ATIVIDADE DESCORANTE.....	15
4.3 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	18
4.3.1 Carboximetilcelulose (CMC).....	18
4.3.2 Glicose.....	19
5 CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS	24
APÊNDICE – DADOS DA DESCOLORAÇÃO	26

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A indústria têxtil desempenha um importante papel na economia de vários países, inclusive no Brasil. Esta atividade industrial utiliza corantes têxteis extensivamente, fazendo com que seja responsável pela liberação de um grande volume de resíduos no meio ambiente. (SOUZA; PERALTA-ZAMORA, 2005). O uso de corantes sintéticos tem crescido cada vez mais em comparação às tintas naturais, o que resultou em uma descarga de efluentes altamente poluídos. Aproximadamente 70.000 toneladas de corantes e 10.000 tipos diferentes de tintas e pigmentos são produzidos anualmente no mundo todo, sendo que cerca de 10-20% deste valor se transforma em resíduo, muitas vezes liberado nos corpos hídricos, tornando-se um grande problema ambiental (COUTO, 2009).

No meio ambiente os corantes interferem na absorção de luz solar da água, retarda a fotossíntese, prejudica o crescimento da biota aquática e na solubilidade de gases pela água. Além disso, acredita-se que esses compostos são tóxicos e podem ser metabolizados por microrganismos presentes no meio, assim, produzindo outros agentes cancerígenos. Em vista disso, a remoção desses pigmentos dos efluentes se torna necessário (COUTO, 2009).

Por se tratarem de moléculas complexas, a sua degradação se torna difícil. As técnicas para a remoção de corantes têxteis de efluentes possuem várias desvantagens, como o alto custo, formação de produtos secundários tóxicos, produção de lodo ou uso intenso de energia elétrica. Testes para o tratamento destes efluentes usando bactérias mostraram que geralmente elas produzem compostos mais tóxicos que os próprios corantes, e ademais, possuem pouca adaptabilidade e aplicação limitada. Consequentemente, a procura de novas alternativas de baixo custo é crescente (DALLAGO; SMANIOTTO; OLIVEIRA, 2005; COUTO, 2009).

Acredita-se que o grupo de microrganismos com mais eficiência para degradar pigmentos sintéticos seja o dos fungos ligninolíticos, principalmente os fungos da podridão branca (White RotFungi). Fungos que degradam lignina sintetizam enzimas como a manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e lacase (lac). Estas enzimas possuem atividade lignolítica, entretanto, com baixa especificidade, permitindo que estas consigam degradar vários componentes,

incluindo corantes. A produção e secreção dessas enzimas pode ser induzida em resposta a falta de fontes de carbono, nitrogênio e/ou enxofre (BARR; AUST, 1994; COUTO, 2009; SEN et al., 2016)

Estudos demonstram que a maioria das plantas possuem bactérias ou fungos que habitam o seu interior e estes são chamados de microrganismos endofíticos. Eles podem habitar diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro sem causar dano aparente. Endófitos possuem alta síntese de enzimas, incluindo celulasas e ligninases, também produzem uma ampla gama de compostos biologicamente ativos como fatores de crescimento e antibióticos (AZEVEDO, 1998). O interesse da indústria nos microrganismos endofíticos vem crescendo nos últimos anos devido ao seu potencial de produção de substâncias de interesse econômico (SANTOS; VARAVALLO, 2011).

A biomassa de algas, leveduras, fungos filamentosos e bactéria tem sido usadas para remoção de tintas por adsorção. A capacidade de um microrganismo adsorver pode ser atribuída aos polissacarídeos e lipídeos que compõe sua parede celular, que contém diferentes grupos químicos funcionais, causando alta força atrativa do corante com a parede celular. Em *Aspergillus foetidusa* a melhor taxa de adsorção é obtida pelo fungo em estado de crescimento exponencial. Em outros, a capacidade da biomassa em adsorver corantes aumenta quando ela é submetida a altas temperaturas que causam a ruptura das células, aumentando a superfície de contato. Além disso, tratamentos ácidos, ou com formaldeído, NaOH, NaHCO₃ ou CaCl₂, que mudam a superfície do organismo e podem aumentar ou diminuir a capacidade dos sítios de ligação também são utilizados. Vale ressaltar que a efetividade da adsorção depende, também, de condições como: pH, temperatura, tempo de contato, concentração de tinta, estrutura molecular da tinta e o tipo de organismo (SOLÍS et al., 2012; SEN et al., 2016).

1.1 GÊNERO *Curvularia*

O gênero *Curvularia* é frequentemente descrito como fungo endofítico de plantas, mas também pode ser encontrado no solo de regiões tropicais e temperadas. Este gênero engloba mais de 40 espécies incluindo em sua maioria espécies saprófitas e também fitopatogênicos de gramíneas. Os 40 táxons se distinguem por diferenças muitas vezes evidentes na morfologia dos conídios,

número de septos e morfologia da colônia. São fungos filamentosos, de rápido crescimento, sendo que algumas espécies podem também causar doenças em animais, incluindo os seres humanos (ALEX; LI; CALDERONE; PETERS, 2013). É caracterizado por possuir hifas e conídios de coloração escura, por efeito da presença de melanina na parede celular, caracterizando-o como um fungo dematiáceo. A parede celular desses fungos podem conter vários componentes como carboidratos, proteínas e glicoproteínas. A atividade antifúngica, antiviral e antioxidante já foi estudada em *Curvularia*, indicando potencial biotecnológico do gênero (FERREIRA, 2010).

A atividade descorante do fungo *Curvularia lunata* já foi relatada. Sendo que *C. lunata* é um dos fungos endofíticos que possui maior potencial para biodegradar corantes têxteis de efluentes, provavelmente devido à alta atividade enzimática de lacase, além de seu fácil cultivo e rápido crescimento. Em um experimento recente, estirpes de *C. lunata* foram testadas em uma amostra de efluente contaminada com corante anil. Após um período de 10 dias, *C. lunata* foi capaz de descolorir 98% da tinta presente no efluente em condições aeradas. Já para condições não-aeradas, a descoloração foi de 95% (MIRANDA et al., 2012, 2013).

Miranda et al. (2013) também identificou atividade enzimática no sobrenadante de *C. lunata*. Demonstrou que Manganês peroxidase, lignina peroxidase e principalmente lacase foram as enzimas liberadas pelo fungo, as quais atuam na biodegradação do corante no meio. Além disso, a composição do meio de cultura como a fonte de carbono, o substrato e outros componentes aromáticos influenciam na expressão dessas proteínas pelos fungos e podem causar diferentes taxas de descoloração dos corantes (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial de isolados do fungo *Curvularia lunata*, pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM), na descoloração de corantes da indústria têxtil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar seis isolados de *C. lunata* obtidos de isolados puros e híbridos de milho (*Zea mays*) em relação à capacidade de descolorir o corante Remazol Azul Reativo 220.
- Avaliar a origem da atividade descorante dos isolados que apresentaram potencial biotecnológico promissor.
- Verificar se diferentes fontes de carbono no cultivo alteram a atividade descorante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os seis isolados de *C. lunata* são provenientes da coleção de microrganismo do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM). O isolamento dos fungos endofíticos foi feito a partir de isolados puros e híbridos de milho, *Zea mays*, em experimento conduzido em solo pela empresa Vertika Agropecuária, na cidade de Campo Largo – PR. Os isolados são: LGMF991, LGMF996, LGMF997, LGMF1007, LGMF1008 e LGMF1009.

Estes isolados foram mantidos em Meio Completo com pH 5,8 em estufa do tipo B.O.D. a 28°C sem fotoperíodo. A metodologia para a avaliação da atividade descorante foi baseada no trabalho de Marzall (2017).

3.2 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DOS ISOLADOS

Para avaliar a atividade descorante dos isolados em um primeiro momento, os fungos foram crescidos em placas de Petri com meio mínimo sólido (MMS) pH 5,8 com a adição do corante têxtil Remazol Azul Reativo 220 (RB220) na concentração de 0,1 gL⁻¹ por 25 dias a 28°C, sem fotoperíodo, para observar se ocorria descoloração nesse tipo de meio.

RB220 é um corante do tipo azo. A mesma concentração de 0,1 gL⁻¹ é estabelecida e utilizada por Niebisch et al. (2010) para o fungo *Lentinus crinitus* remover a tinta eficientemente e totalmente.

Após essa etapa, todos os isolados foram submetidos a um teste de descoloração em meio de cultura líquido. Os fungos foram repicados em meio mínimo sólido pH 5,8 e incubados por 10 dias a 28°C, sem fotoperíodo em placas de Petri. Em seguida, foram retirados de cada placa dois discos de 3 mm do micélio e colocados em frascos com 5 mL de Meio Mínimo Líquido (MML) com o corante RB220 na concentração de 0,1 gL⁻¹ por um período de 10 dias a 28°C sem fotoperíodo. Após esse período, o micélio foi separado da fração líquida por filtração em papel *Whatman* nº 1. A fração líquida foi analisada em um espectrofotômetro de luz com comprimento de onda de 600 nm. Os isolados com as melhores

porcentagens de descoloração foram selecionadas. Sendo que a porcentagem de descoloração foi calculada pela seguinte fórmula 1:

$$1 - \text{Descoloração}(\%) = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}} \times 100$$

Onde *A controle* se refere a absorbância da solução anterior a inoculação e *A amostra* para a absorbância da solução após cultivo.

3.3 ORIGEM DA ATIVIDADE DESCORANTE

Para determinar se a atividade descorante é proveniente da adsorção do micélio ou pela ação enzimática, foram realizados testes com o micélio e o sobrenadante, separadamente. Primeiramente os isolados foram cultivados em meio MMS com pH 5,8 por um período de 10 dias a 28°C sem fotoperíodo. Após o período de encubação, 2 discos de micélio de 5 mm de diâmetro retirados desse cultivo foram introduzidos em frascos contendo 5 mL de MML pH 5,8 sem corante. Esses cultivos foram incubados por 10 dias a 28 °C sem fotoperíodo.

Posteriormente, o sobrenadante e o micélio foram separados por papel *Whatman* nº 1. Deste, parte do micélio foi autoclavado, e a outra parte foi mantida fresca. Os micélios frescos e micélios autoclavados foram inseridos em frascos com 1,1 mL de meio de sais pH 5,8 com 0,1gL⁻¹ de corante RB220, sendo que em parte dos frascos com micélio fresco foi também adicionada azida sódica numa concentração de 20 mMol/L. Para o sobrenadante, uma amostra de 0,1 mL foi adicionada em um frasco contendo 1,0mL de meio de sais pH 5,8 com 0,1gL⁻¹ de corante RB220. Todos os frascos com o micélio fresco, micélio autoclavado, micélio com azida sódica e sobrenadante foram analisados após 90 minutos e 24 horas ao início do experimento num espectrofotômetro de luz.

3.4 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO

A avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono nos isolados de *C. lunata* foi feita através da substituição da fonte original de carbono do meio mínimo líquido (glicose 10 gL^{-1}) por carboximetilcelulose (CMC) e glicose. As concentrações utilizadas foram 1, 5 e 10 gL^{-1} para CMC e 1, 5 e 20 gL^{-1} para glicose.

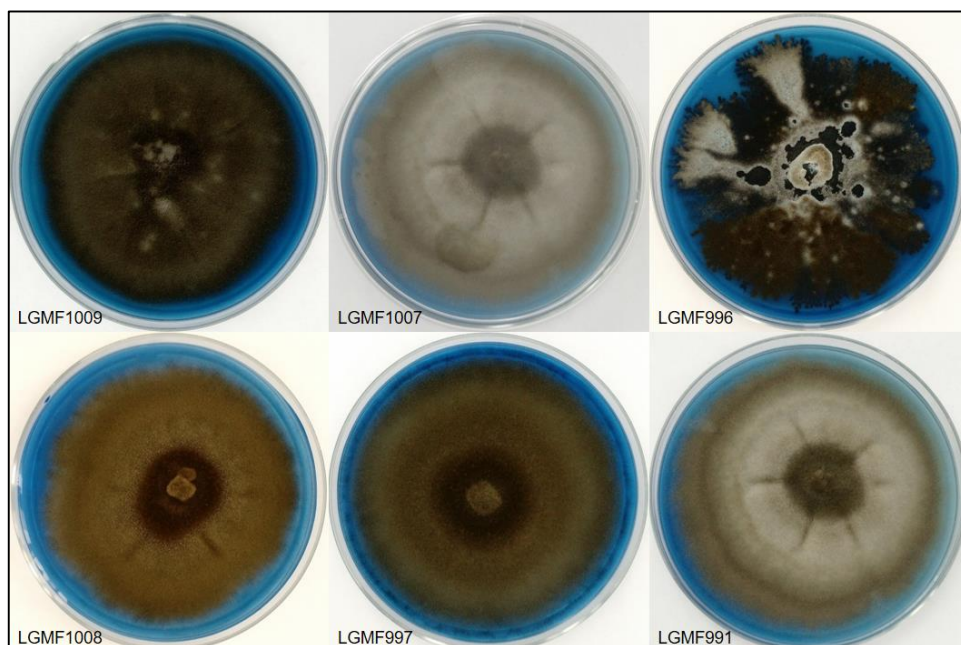
Primeiramente todas os isolados foram cultivadas em meio MMS com pH 5,8 por um período de 10 dias a 28°C sem fotoperíodo. Posteriormente, 2 discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados desse cultivo e introduzidos em frascos contendo 5 mL de meio MML em pH 5,8 sem corante. Cada frasco contendo a fonte de carbono e sua concentração foi estabelecida anteriormente. Estes frascos foram mantidos no escuro por 10 dias a 28°C . Após este período, o micélio foi separado do sobrenadante por papel *Whatman* nº 1. O micélio foi inserido em outro frasco com 1,1 mL de meio de sais pH 5,8 com $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de corante RB220, enquanto que do sobrenadante foi coletada uma amostra de 0,1 mL e adicionada em 1,0 mL de meio de sais com pH 5,8 e corante RB220 ($0,1 \text{ gL}^{-1}$). A análise foi realizada coletando parte da solução para a leitura em espectrofotômetro de luz (600 nm).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DOS ISOLADOS

Para os isolados crescidos em meio MMS pH 5,8 com corante RB220 ($0,1\text{gL}^{-1}$) por 25 dias em 28°C , as fotos estão representadas na FIGURA 1.

FIGURA 1 – ISOLADOS DE *Curvularia lunata* EM MEIO MÍNIMO SÓLIDO COM CORANTE REMAZOL AZUL REATIVO 220 APÓS 25 DIAS DE INCUBAÇÃO.

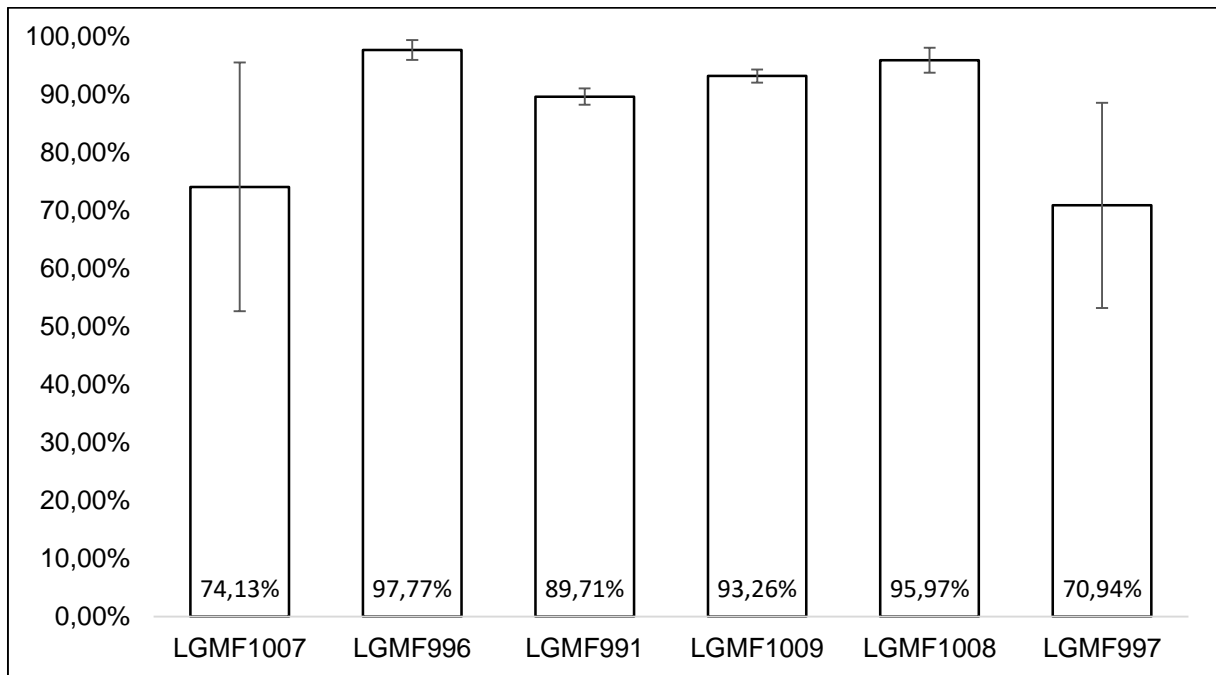


FONTE: O Autor, 2017

Por inspeção visual, foi possível concluir que os isolados com melhor resultado de biodescoloração foram as LGMF1007, LGMF991 e LGMF1008. Entretanto, o meio MMS não fornece condições ideais para a descoloração do meio devido a solidificação do mesmo, além de delimitar a sua análise somente para a observação do alo de descoloração. Assim, para uma análise mais precisa seria necessário o crescimento em MML, além de realizar a medição dos resultados através da absorbância.

Quando crescidos em meio MML pH 5,8 e com corante RB220 ($0,1\text{gL}^{-1}$) por 10 dias em 28°C os resultados obtidos são mostrados na FIGURA 2.

FIGURA 2 – BIODESCOLORAÇÃO DOS ISOLADOS DE *C. lunata* CRESCENDO EM MEIO MÍNIMO LÍQUIDO pH 5,8 COM A ADIÇÃO DE REMAZOL AZUL REATIVO 220 (0,1gL⁻¹) POR 10 DIAS.



FONTE: O Autor, 2017

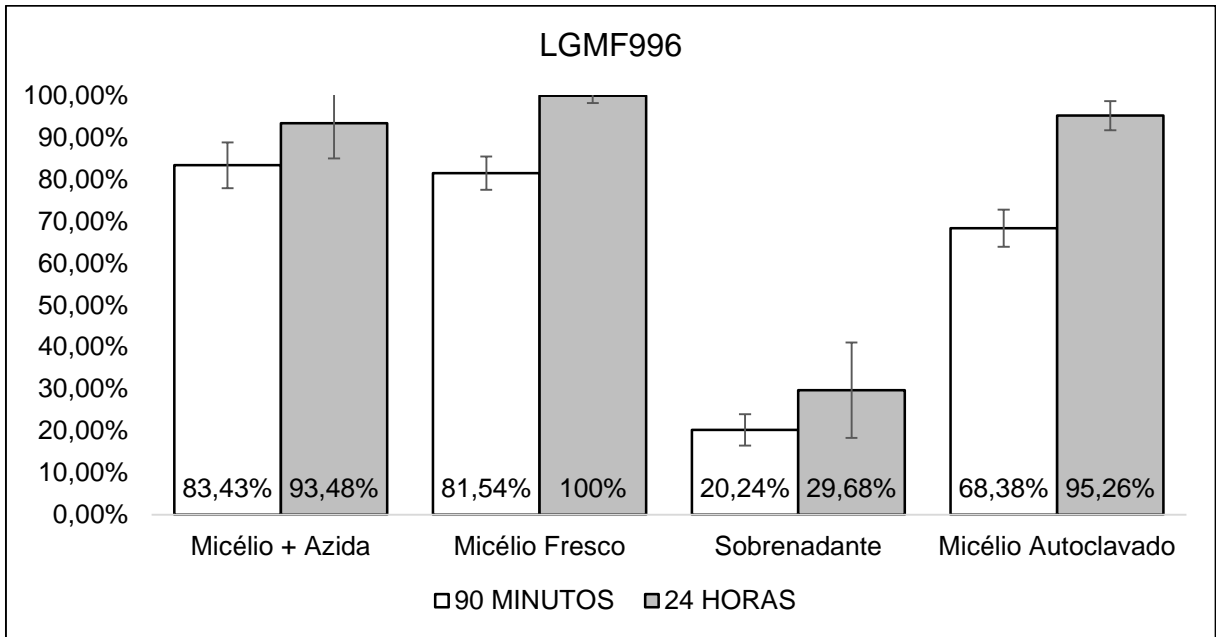
Todos os isolados mostraram resultados positivos para atividade decolorante, com todas as médias acima de 70% de descoloração, em especial os isolados LGMF996 e LGMF1008 que alcançaram resultados próximos a 100% e com baixo desvio padrão. Portanto, estes foram os isolados escolhidos para a realização dos experimentos seguintes.

4.2 ORIGEM DA ATIVIDADE DESCORANTE

Para ambos os isolados o micélio fresco obteve resultados com até 100% de descoloração para o isolado LGMF996. O sobrenadante obteve valores de 29,68% e 63,46% para os isolados LGMF996 e LGMF1008 respectivamente após 24 horas.

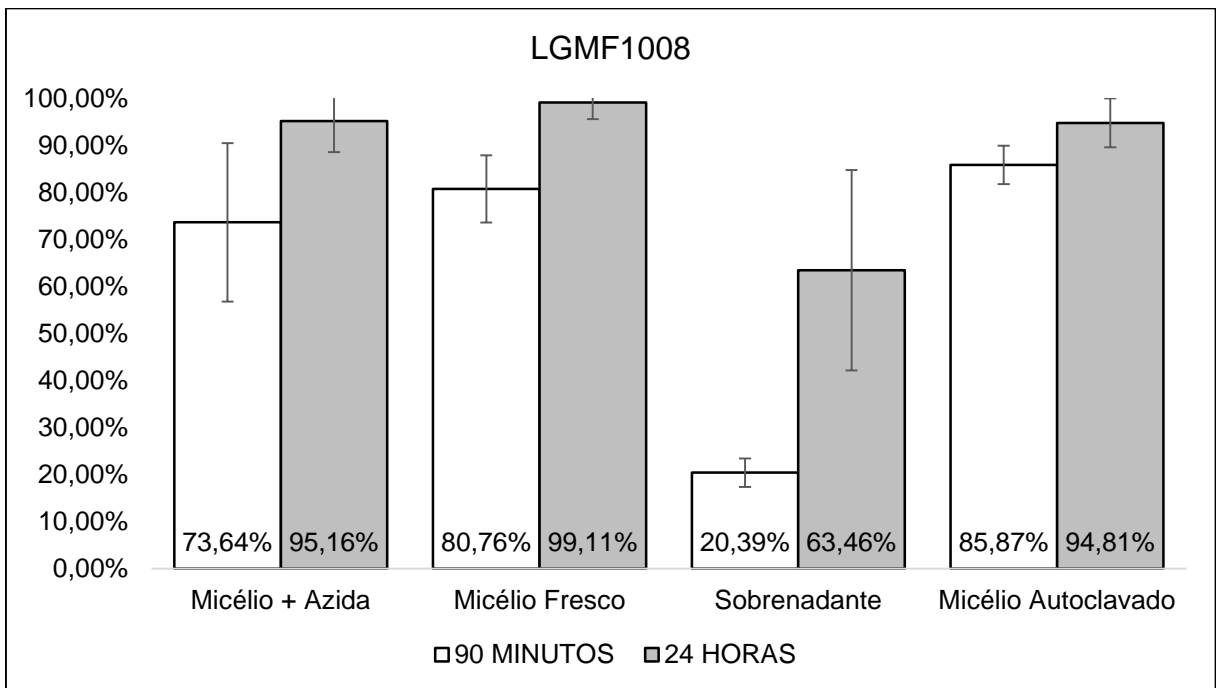
Os resultados obtidos para o teste da origem decolorante estão representados na FIGURA 3, para a LGMF996, e na FIGURA 4, para a LGMF1008.

FIGURA 3 – DESCOLORAÇÃO EM % DO ISOLADO LGMF996 NAS SEGUINTE CONDIÇÕES: MICÉLIO COM AZIDA, MICÉLIO FRESCO, SOBRENADANTE E MICÉLIO AUTOCLAVADO.



FONTE: O Autor, 2017

FIGURA 4 – DESCOLORAÇÃO EM % DO ISOLADO LGMF1008 NAS SEGUINTE CONDIÇÕES: MICÉLIO COM AZIDA, MICÉLIO FRESCO, SOBRENADANTE E MICÉLIO AUTOCLAVADO.



FONTE: O Autor, 2017

Ambos os isolados LGMF996 e LGMF1008 obtiveram as melhores taxas de descoloração com o micélio fresco, com valores de praticamente 100% de descoloração após 24 horas. Nota-se também que no período relativamente curto de 90 minutos a remoção do corante já foi obtida de forma considerável.

Solís et al. (2012) e Sen et al. (2016) em suas revisões, indicaram que a adsorção do micélio pode ser de grande importância para a descoloração do meio, sendo que sua eficiência pode aumentar ou diminuir dependendo das condições do meio. A adsorção ocorre devido a interação dos corantes com sítios de ligação presentes na parede celular do microrganismo. Os autores relatam que quando a massa de micélio é submetida a alta pressão ou altas temperaturas como em uma autoclave, a superfície de contato do micélio aumenta devido a ruptura da sua estrutura e, assim, possibilita maior adsorção. Quando em contato com o corante, a temperatura aumenta a adsorção devido ao aumento da energia cinética entre as moléculas e os sítios de ligação. Entretanto, temperaturas muito altas podem comprometer a adsorção visto que as regiões de ligação presentes na parede celular podem desnaturar.

Solís et al. (2012) também descreve que células mortas tem melhor absorção que células vivas. Entretanto, os valores de descoloração para o micélio autoclavado são inferiores para ambos os isolados quando comparados com o micélio fresco. Podendo indicar que não somente o fungo adsorve o corante como também produz enzimas capazes de degrada-lo.

No micélio fresco com a adição de azida (inibidor de lacase), ambos os isolados continuaram descolorindo consideravelmente, podendo indicar que a atividade descorante não está somente relacionada com a ação da lacase. Miranda et al. (2013) analisou a atividade de enzimas manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e lacase (lac) em *C. lunata*. Segundo a autora, a enzima lac foi a que apresentou o maior protagonismo na descoloração devido à grande quantidade desta enzima que foi sintetizada.

O sobrenadante em ambos os isolados também apresentou atividade descorante, com 63,46% de descoloração para o isolado LGMF1008 após 24 Horas e 29,68% para a LGMF996. Indicando que a atividade enzimática no isolado LGMF1008 é superior.

4.3 EFEITO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

O tipo de meio de cultura e a fonte de carbono utilizada pode influenciar na descoloração de corantes pelo microrganismo (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009). Assim, a determinação da fonte de carbono ideal para *C. lunata* foram utilizados meios de cultura contendo uma fonte de carbono simples (glicose) e outra complexa (CMC).

4.3.1 Carboximetilcelulose (CMC)

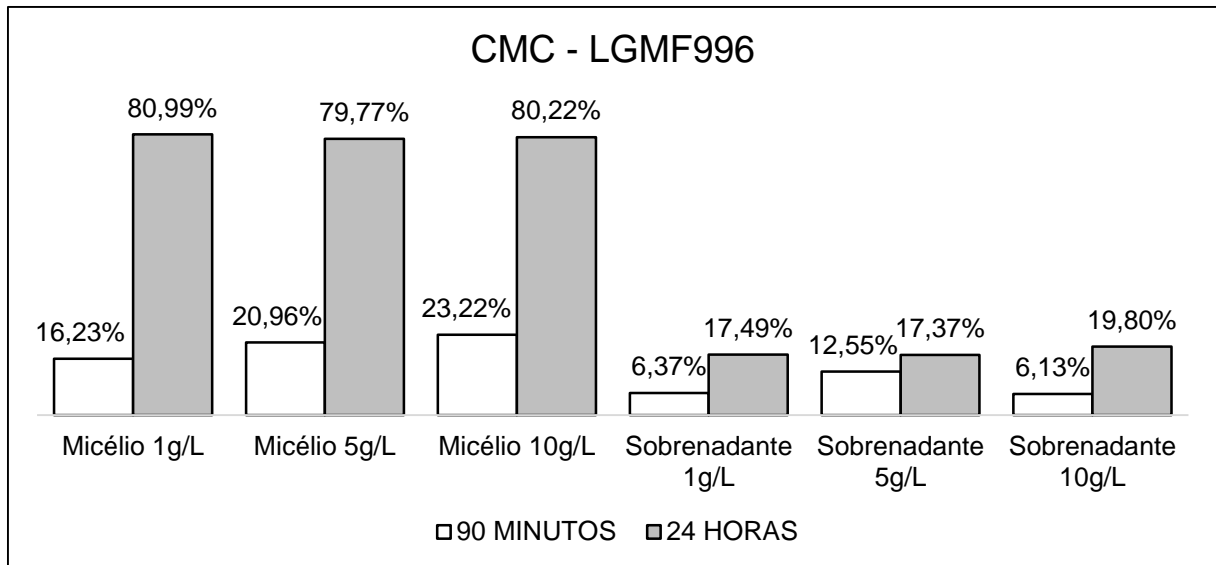
Sendo o CMC um dos constituinte de efluentes têxteis (POPLI; PATEL, 2014), desta forma é interessante que o fungo consiga degradar esta substância.

A descoloração dos isolados LGMF996 e LGMF1008 quando crescidos em CMC indicou atividade descorante inferior aos resultados obtidos anteriormente para ambos os isolados. Entretanto, para o isolado LGMF996 a cultura com CMC pareceu mais vantajosa comparada com a LGMF1008. Enquanto o melhor valor de descoloração para o isolado LGMF1008 foi de 61,56%, para o LGMF996 o valor foi de 80,99%, ambas provenientes do micélio de uma cultura com 0,1 gL⁻¹ de CMC (FIGURA 5 e 6).

Os resultados para o sobrenadante foram contrastantes com os obtidos anteriormente, onde o LGMF1008 obteve os melhores resultados. Neste caso, o sobrenadante de LGMF996 obteve os melhores resultados, chegando a uma descoloração de até 19,80%, enquanto que para LGMF1008 não foi observada atividade descorante pelo sobrenadante.

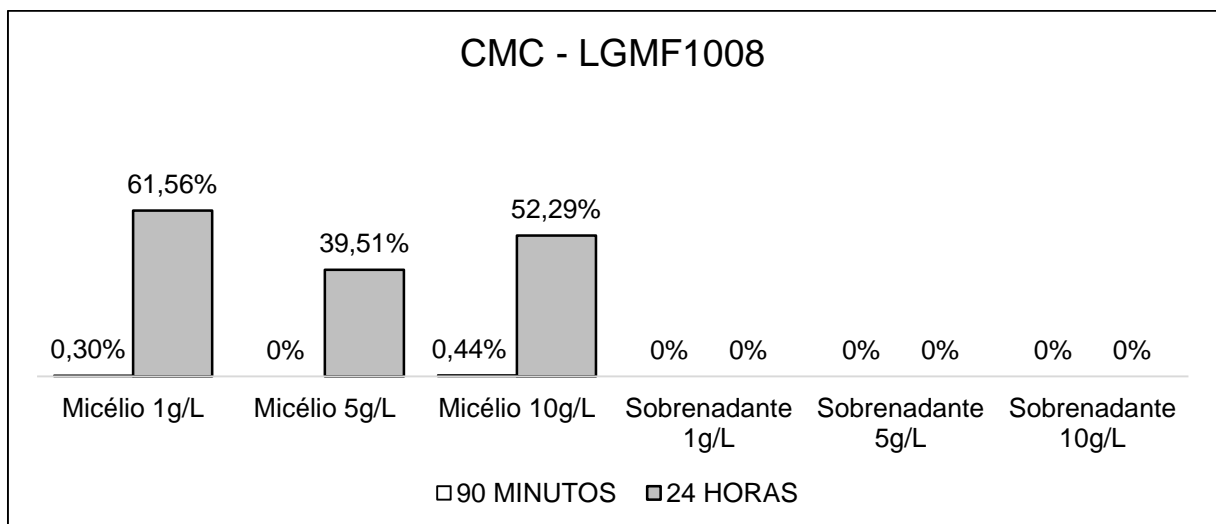
Nota-se que para ambos os isolados a concentração de CMC no meio parece não influenciar na descoloração. A diferença de descoloração do micélio fresco de 90 minutos para 24 horas foi superior ao encontrado no teste com a fonte de carbono original (glicose 10 gL⁻¹), podendo indicar menor velocidade de descoloração. Ainda, foi observado menor crescimento do micélio durante a incubação, sugerindo que *C. lunata* não é capaz de utilizar fontes de carbonos complexas eficientemente.

FIGURA 5 – DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO E SOBRENADANTE EM % DO ISOLADO LGMF996 QUANDO CRESCIDO EM MEIO COM FONTE DE CARBONO DO TIPO CARBOXIMETILCELULOSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.



FONTE: O Autor, 2017

FIGURA 6 – DESCOLORAÇÃO PELO MICÉLIO E SOBRENADANTE EM % DO ISOLADO LGMF1008 QUANDO CRESCIDO EM MEIO COM FONTE DE CARBONO DO TIPO CARBOXIMETILCELULOSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.



FONTE: O Autor, 2017

4.3.2 Glicose

Em relação a presença de glicose em diferentes concentrações, para o isolado LGMF996 o melhor resultado para o micélio fresco foi de 96,81% de

descoloração em 5 gL⁻¹ de glicose. Para o sobrenadante, o melhor resultado ocorreu com 1 gL⁻¹, resultando numa descoloração de 14,52% após 24 horas na solução (FIGURA 7).

Para o isolado LGMF1008 a melhor descoloração ocorreu a 20 gL⁻¹ após 24 horas com o micélio fresco. Já para o sobrenadante, a melhor taxa de remoção foi de 47,95% com 1 gL⁻¹. Enquanto para o micélio o aumento da concentração de glicose parece aumentar a descoloração, para o sobrenadante observa-se a diminuição da taxa de remoção (FIGURA 8).

ZEN et al. (2016) observou que a descoloração de tintas por *P. chrysosporium* ocorre pelo metabolismo secundário, e enzimas lignolíticas são liberadas pelos fungos em situações onde carbono e nitrogênio estão limitados. O sobrenadante do isolado LGMF1008 foi o que apresentou maior atividade descorante, em contraste com o teste de CMC que não ocorreu nenhuma descoloração.

FIGURA 7 – DESCOLORAÇÃO DO MICÉLIO E SOBRENADANTE EM % DO ISOLADO LGMF996 QUANDO CRESCIDO EM MEIO COM FONTE DE CARBONO DO TIPO GLICOSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

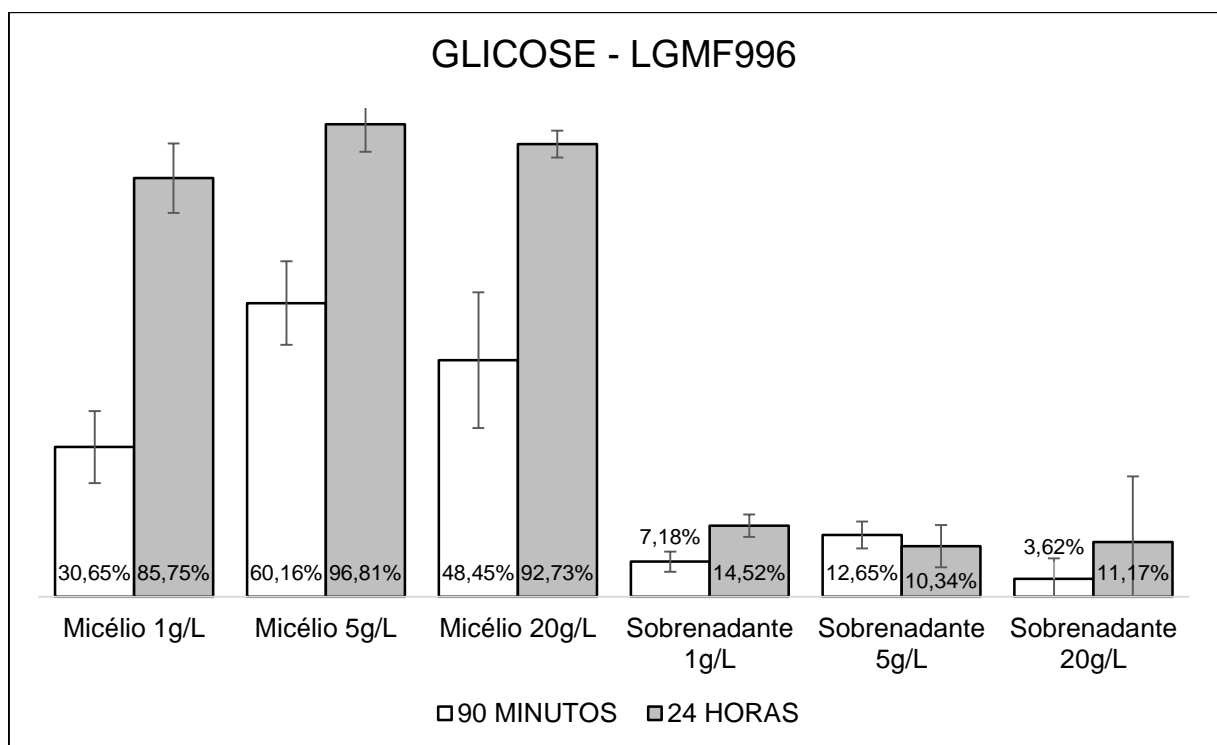
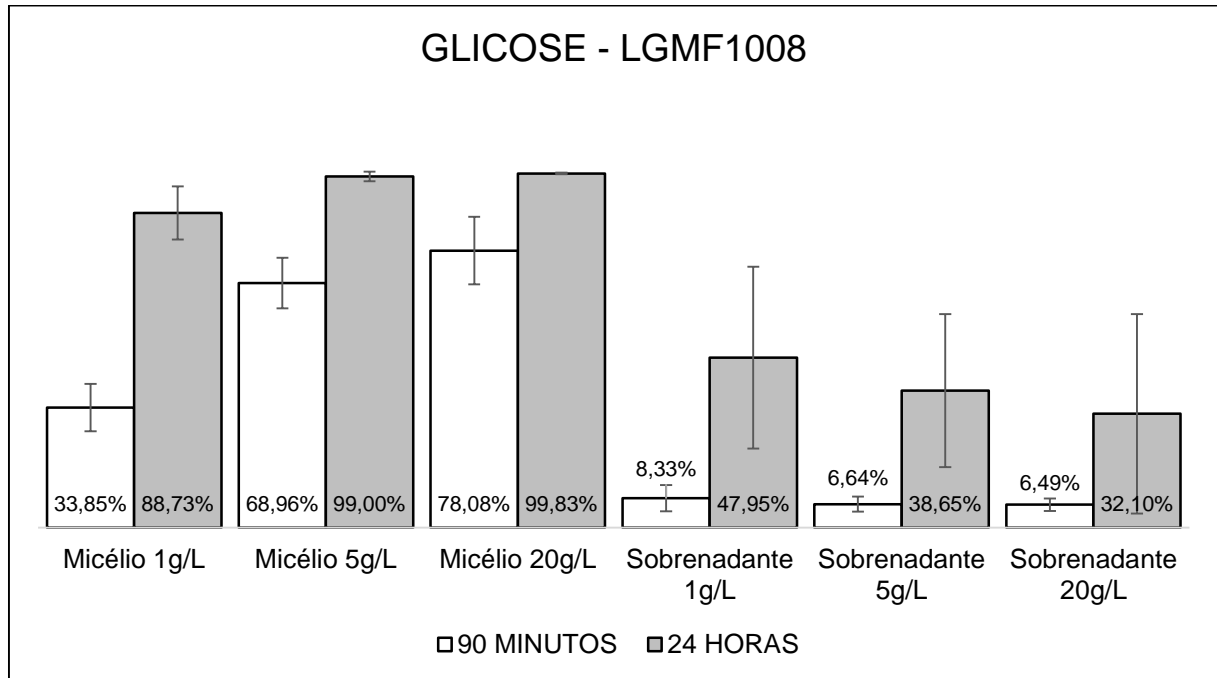


FIGURA 8 – DESCOLORAÇÃO DO MICÉLIO E SOBRENADANTE EM % DO ISOLADO LGMF1008 QUANDO CRESCIDO EM MEIO COM FONTE DE CARBONO DO TIPO GLICOSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.



FONTE: O Autor, 2017

No QUADRO 1 foi compilado todos os valores de descoloração das diferentes concentrações utilizadas para glicose com a concentração de glicose original (10g/L) do meio MML.

QUADRO 1: COMPARATIVO DA DESCOLORAÇÃO COM TODAS AS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE UTILIZADAS PARA OS ISOLADOS LGMF996 E LGMF1008.

	L2G4							
	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 10g/L	Micélio 20g/L	Sobrenadante 1g/L	Sobrenadante 5g/L	Sobrenadante 10g/L	Sobrenadante 20g/L
90 Minutos	30,65%	60,16%	81,53%	48,45%	7,18%	12,65%	20,24%	3,62%
24 Horas	85,75%	96,81%	100%	92,73%	14,52%	10,34%	29,68%	11,17%
	L4G5P1B							
	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 10g/L	Micélio 20g/L	Sobrenadante 1g/L	Sobrenadante 5g/L	Sobrenadante 10g/L	Sobrenadante 20g/L
90 Minutos	33,85%	68,96%	80,76%	78,08%	8,33%	6,64%	20,38%	6,49%
24 Horas	88,73%	99,00%	99,11%	99,83%	47,95%	38,65%	63,46%	32,10%

FONTE: O Autor, 2017.

A concentração inicial de glicose do MML ainda foi a que obteve melhores resultados para o micélio fresco e o sobrenadante de LGMF996 e para o sobrenadante de LGMF1008. Indicando que no geral a concentração original ainda se mostra mais eficaz que as outras. Niebisch et al. (2010) também obteve melhores resultados de remoção de RB220 em glicose (10 g/L) para *L. crinitus*.

Como Elisashvili e Kachlishvili (2009) mostraram, a relação da escolha da fonte de carbono e de sua concentração estão muito relacionadas com a eficácia da descoloração do fungo. No caso das linhagens utilizadas neste trabalho, a fonte de carbono em sua concentração original de 10 g/L manteve os melhores resultados diante de todos os testados.

5 CONCLUSÕES

- Todos os isolados do fungo endofítico *Curvularia lunata* avaliados apresentaram capacidade de descoloração do corante Remazol azul RB220.
- Os isolados de *C. lunata* LGMF996 e LGMF1008 apresentaram resultados superiores, sendo capazes de descolorir até 100% do corante Remazol azul RB220 em experimento utilizando micélio fresco.
- A principal atividade descorante dos isolados LGMF996 e LGMF1008 está relacionada ao micélio, porém enzimas com atividade descorante secretadas no sobrenadante da cultura evidenciam a atuação de dois mecanismos descorantes concomitantemente.
- Diferentes fontes de carbono, com diferentes concentrações adicionadas ao meio com corante Remazol azul RB220 alteram a capacidade descorante, sendo que os melhores resultados foram obtidos com glicose na concentração de 10 gL⁻¹.

REFERÊNCIAS

- ALEX, D.; LI, D.; CALDERONE, R.; PETERS, S. M. Identification of *Curvularia lunata* by polymerase chain reaction in a case of fungal endophthalmitis. **Medical Mycology Case Reports** 2 (2013) 137–140.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de, *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna - SP: **Embrapa Meio Ambiente**, 1998. p. 118-137.
- BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants. **Environmental Science & Technology**. Vol 28, No 2, 1994.
- BRUSCATO, E. C. Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos na Descoloração de Corantes da Indústria Têxtil. 2011. 126 f. Tese (Mestrado). Departamento de Genética. **Universidade Federal do Paraná**. Paraná 2011.
- CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklym, v.69, p. 2-9, 1988.
- COUTO, S. R. Dye removal by immobilised fungi. **Biotechnology Advances** 27 (2009) 227–235.
- DALLAGO, R. M.; SMANIOTTO, A.; OLIVEIRA, L. C. A.; Resíduos Sólidos de Curtumes como Adsorventes para a Remoção de Corantes em Meio Aquoso. **Química Nova**, Vol. 28, No. 3, 433-437, 2005.
- ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Biotechnology**. y 144 (2009) 37–42.
- FERREIRA, S. L. Caracterização de Isolados de *Curvularia spp.* Endofíticos de Milho (*Zea mays* L.) por Parâmetros Morfológicos e Moleculares. 2010. 118 f. Tese (Mestrado). Departamento de Genética. **Universidade Federal do Paraná**. Paraná 2010.
- MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by Lignolytic Enzymatic Complex Produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology** (2006) 37:468-473.
- MARZALL, M. DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TEXTÉIS POR NOVAS ESPÉCIES E LINHAGENS MUTANTES DE *Neopestalotiopsis* E SECREÇÃO PROTEICA DE *Neofusicoccum sp.* 2017. 150 f. Tese (Mestrado). Departamento de Genética. **Universidade Federal do Paraná**. Paraná 2017.

MIRANDA, R. C. M.; GOMES, E. B.; GOUVEIA, E. R.; MACHADO, K. M. G.; GUSMÃO, N. B. Decolorization of laundry effluent by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology** Vol. 11(18), pp. 4216-4224, 1 March, 2012.

MIRANDA, R. C. M.; GOMES, E. B.; PEREIRA JR, N.; MARIN-MORALES, M. A.; MACHADO, K. M. G.; GUSMÃO, N. B. Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaetechrysosporium* URM 6181. **Bioresource Technology**. 142 (2013) 361–367.

NIEBISCH, C. H.; MALINOWSKI, A. K.; SCHADECK, R.; MITCHELL, D. A.; KAVACORDEIRO, V.; PABA, J. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials** 180 (2010) 316–322.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, jul./dez. 2011.

SEN, S. K.; RAUT, S.; BANDYOPADHYAY, P.; RAUT, S. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. **Fungal Biology Reviews** 30 (2016) 112 e133.

SOLÍS, M.; SOLÍS, A.; PÉREZ, H. I.; MANJARREZ, N.; FLORES, M. Microbial decolouration of azo dyes: A review. **Process Biochemistry** 47 (2012) 1723–1748.

SOUZA, C. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação de Corantes Reativos Pelo Sistema Ferro Metálico/Peróxido de Hidrogênio. **Química Nova**, Vol. 28, No. 2, 226-228, 2005.

POPLI, S.; PATEL, U. D. Destruction of azo dyes by anaerobic–aerobic sequential biological treatment: a review. **Int. J. Environ. Sci. Technol.** (2015) 12:405–420.

APÊNDICE 1 – DADOS DA DESCOLORAÇÃO

DESCOLORAÇÃO DOS ISOLADOS LGMF996 E LGMF1008 EM % DE CADA REPLICATA

Replicata	Descoloração em % dos isolados LGMF996 e LGMF1008 após 90 minutos										
	LGMF996					LGMF1008					
	Micélio + Azida	Micélio Fresco	Sobrenadante	Micélio Autoclavado	Micélio + Azida	Micélio Fresco	Sobrenadante	Micélio Autoclavado	Micélio + Azida	Micélio Fresco	Micélio Autoclavado
I	76,56516443	84,84774665	22,24116931	69,25700365	87,5274056	82,41169306	18,0998782	86,30937881			
II	86,79668952	77,78319123	16,39464068	63,65408039	71,44945189	81,68087698	22,24116931	78,75761267			
III	83,38611449	78,27040195	17,85627284	70,23142509	71,44945189	70,71863581	21,51035323	88,7454324			
IV	79,97563946	86,55298417	25,65164434	64,38489647	89,9634592	78,51400731	16,39464068	87,77101096			
V	90,45066991	80,21924482	19,07429963	74,3727162	47,81973203	90,45066991	23,70280146	87,77101096			
Média	83,43483557	81,53471376	20,24360536	68,38002436	73,64190012	80,75517661	20,38976857	85,87088916			

Replicata	Descoloração em % dos isolados LGMF996 e LGMF1008 após 24 Horas										
	LGMF996					LGMF1008					
	Micélio + Azida	Micélio Fresco	Sobrenadante	Micélio Autoclavado	Micélio + Azida	Micélio Fresco	Sobrenadante	Micélio Autoclavado	Micélio + Azida	Micélio Fresco	Micélio Autoclavado
I	89,33333333	100,1975309	36,74074074	90,07407407	89,08641975	93,03703704	33,5308642	98,96296296			
II	95,75308642	101,4320988	38,4691358	95,25925926	87,11111111	99,45679012	62,66666667	92,79012346			
III	100,4444444	97,2345679	38,71604938	99,7037037	101,1851852	100,9382716	79,20987654	96,98765432			
IV	100,9382716	99,95061728	16,98765432	96,49382716	98,71604938	100,1975309	54,27160494	86,61728395			
V	80,9382716	101,6790123	17,48148148	94,7654321	99,7037037	101,9259259	87,60493827	98,71604938			
Média	93,48148148	100,0987654	29,67901235	95,25925926	95,16049383	99,11111111	63,45679012	94,81481481			

DESCOLORAÇÃO DOS ISOLADOS LGMF996 E LGMF1008 EM % DE CADA REPLICATA NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE.

Descoloração em % dos isolados LGMF996 e LGMF1008 em diferentes concentrações de glicose após 90 minutos													
LGMF996													
Replicata	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 20g/L	Sob. 1g/L	Sob. 5g/L	Sob. 20g/L	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 20g/L	Sob. 1g/L	Sob. 5g/L	Sob. 20g/L	Sob. 20g/L
I	30,84358524	72,49560633	46,92442882	10,28119508	14,23550088	9,226713533	35,5887522	61,95079086	83,83128295	8,699472759	6,326889279	7,908611599	
II	22,93497364	57,996448506	38,22495606	6,063268893	10,54481547	-0,263620387	42,44288225	71,44112478	61,68717047	14,49912127	5,799648506	3,9543058	
III	40,59753954	64,85061511	41,65202109	6,326889279	9,490333919	4,481546573	36,64323374	79,87697715	79,61335677	6,063268893	8,435852373	7,644991213	
IV	28,20738137	53,77855888	42,70650264	6,063268893	12,65377856	1,054481547	25,30755712	68,01405975	79,87697715	7,117750439	8,963093146	5,272407733	
V	*	51,66959578	72,75922671	*	16,34446397	*	29,26186292	63,53251318	85,41300527	5,272407733	3,690685413	7,644991213	
LGMF1008													
Replicata	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 20g/L	Sob. 1g/L	Sob. 5g/L	Sob. 20g/L	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 20g/L	Sob. 1g/L	Sob. 5g/L	Sob. 20g/L	Sob. 20g/L
I	85,2987013	99,84415584	97,50649351	13,87012987	2,961038961	-2,753246753	75,68831169	100	100	47,8961039	56,72727273	13,35064935	
II	95,94805195	97,50649351	91,01298701	11,53246753	13,09090909	8,675324675	92,31168831	97,24675325	99,58441558	66,85714286	12,31168831	16,72727273	
III	80,1038961	100	91,27272727	16,46753247	12,05194805	13,87012987	89,45454545	100	100	33,35064935	62,96103896	80,62337662	
IV	81,66233766	99,84415584	91,01298701	16,20779221	10,23376623	3,480519481	92,05194805	97,76623377	99,58441558	77,76623377	38,28571429	17,50649351	
V	*	86,85714286	92,83116883	*	13,35064935	32,57142857	94,12987013	100	100	13,87012987	22,96103896	32,31168831	
LGMF1008													
Descoloração em % dos isolados LGMF996 e LGMF1008 em diferentes concentrações de glicose após 24 horas													
LGMF996													
Replicata	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 20g/L	Sob. 1g/L	Sob. 5g/L	Sob. 20g/L	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 20g/L	Sob. 1g/L	Sob. 5g/L	Sob. 20g/L	Sob. 20g/L
I	85,2987013	99,84415584	97,50649351	13,87012987	2,961038961	-2,753246753	75,68831169	100	100	47,8961039	56,72727273	13,35064935	
II	95,94805195	97,50649351	91,01298701	11,53246753	13,09090909	8,675324675	92,31168831	97,24675325	99,58441558	66,85714286	12,31168831	16,72727273	
III	80,1038961	100	91,27272727	16,46753247	12,05194805	13,87012987	89,45454545	100	100	33,35064935	62,96103896	80,62337662	
IV	81,66233766	99,84415584	91,01298701	16,20779221	10,23376623	3,480519481	92,05194805	97,76623377	99,58441558	77,76623377	38,28571429	17,50649351	
V	*	86,85714286	92,83116883	*	13,35064935	32,57142857	94,12987013	100	100	13,87012987	22,96103896	32,31168831	

Obs.: O símbolo (*) indica um dado inutilizável

DESCOLORAÇÃO DOS ISOLADOS LGMF996 E LGMF1008 EM % DE CADA REPLICATA NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CMC.

Descoloração em % dos isolados LGMF996 e LGMF1008 em diferentes concentrações de CMC após 90 minutos													
LGMF996													
Replicata	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 10g/L	Sob. 1g/L	Sob. 5g/L	Sob. 10g/L	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 10g/L	Sob. 1g/L	Sob. 5g/L	Sob. 10g/L	Sob. 10g/L
I	12,66716196	16,53046062	17,27340267	2,563150074	9,249628529	8,060921248	3,361056332	-2,760867701	-2,040641344	-11,763697716	-1,500471577	-1,500471577	-1,320414988
II	19,35364042	27,82317979	33,17236256	7,615156018	21,28528975	2,860326895	-2,400754523	-5,101603361	-11,22352739	-19,86624368	-4,561433593	-6,542056075	
III	14,45022288	22,0282318	23,21693908	8,506686478	14,45022288	9,249628529	0,840264083	6,06190517	-1,500471577	-10,14318786	-6,181942896	-3,301037469	
IV	14,15304606	19,20505201	18,16493314	6,426448737	7,763744428	4,346210996	-0,600188631	1,200377261	5,341678813	*	-3,12098088	-9,422961502	
V	20,5423477	19,20505201	24,25705795	6,723625557	9,992570579	*	*	*	11,64365944	*	*	*	-9,242904913

Descoloração em % dos isolados LGMF996 e LGMF1008 em diferentes concentrações de CMC após 24 horas													
LGMF996													
Replicata	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 10g/L	Sob. 1g/L	Sob. 5g/L	Sob. 10g/L	Micélio 1g/L	Micélio 5g/L	Micélio 10g/L	Sob. 1g/L	Sob. 5g/L	Sob. 10g/L	Sob. 10g/L
I	83,26484871	77,28800897	79,97758685	9,899140829	11,69219275	16,17482256	63,31990054	41,53305325	37,57180828	-15,36482895	-1,500471577	-1,500471577	1,920603618
II	85,05790064	78,33395592	81,92005977	16,77250654	9,749719836	19,61150542	43,51367573	65,48057961	78,62471062	-6,361999486	-2,040641344	-4,741490183	
III	76,69032499	80,42584983	72,50653717	22,00224131	20,35861038	23,34703026	59,71876876	23,70745091	39,73248735	1,380433851	-7,982508788	-1,320414988	
IV	76,540904	86,40268958	87,89688951	13,0369817	12,14045573	20,0597684	79,70505016	27,3085827	53,23673154	*	-7,622395561	-0,420132041	
V	83,4142697	76,391483	78,7822189	25,73776616	32,90997385	*	*	*	*	*	*	*	1,200377261

Obs.: O símbolo (*) indica um dado inutilizável

DESCOLORAÇÃO DOS ISOLADOS EM % REFERENTES A CADA REPLICATA FEITA.

Replicata	Descoloração em % dos isolados					
	LGMF1007	LGMF996	LGMF991	LGMF1009	LGMF1008	LGMF997
I	92,11911566	98,43585502	90,01353587	92,72070988	97,23266657	51,51150549
II	96,93186945	98,73665213	91,21672432	93,32230411	97,23266657	83,99759362
III	45,79636035	94,82628967	87,60715897	93,02150699	92,41991277	59,33223041
IV	75,57527448	97,83426079	90,61513009	92,11911566	95,42788389	65,64896977
V	60,23462175	99,03744924	89,11114453	95,12708678	97,53346368	94,22469544
Média	74,13	97,77	89,71	93,26	95,97	70,94