

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZ FERNANDO DA SILVEIRA GHISI

**DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TEXTÉIS POR LINHAGENS
SELVAGENS E MUTANTES DE FUNGOS FILAMENTOSOS**

CURITIBA

2018

LUIZ FERNANDO DA SILVEIRA GHISI

**DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TEXTÉIS POR LINHAGENS
SELVAGENS E MUTANTES DE FUNGOS FILAMENTOSOS**

Monografia apresentada como requisito parcial
à obtenção do título de Bacharel, Curso de
Graduação em Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

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

Coorientador: Mestrando Felipe Gomes.

CURITIBA

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, principal incentivadora de minha educação e formação neste curso.

Aos meus familiares pelo apoio sempre presente e pela compreensão na ausência em diversas oportunidades.

À professora Vanessa Kava, minha orientadora nesse trabalho, por todas as conversas, orientações, alinhamentos do projeto, ajuda e principalmente pela paciência no período das pesquisas desse estudo.

Ao LabGeM pelo apoio, disponibilidade de recursos e materiais para a realização dos experimentos necessários.

Ao meu companheiro de projeto, co-orientador e colega Felipe Gomes, pela disponibilidade nos auxílios dos experimentos, disponibilidade e cortesia nos momentos de ajuda necessária.

À todos os colegas de laboratório que me auxiliaram com dicas, correções e orientações em todas as etapas desse trabalho.

Aos meus amigos sempre presentes na vida acadêmica e também fora dela.

E também agradeço à todos que alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

As principais linhas de pesquisa em biotecnologia utilizam microrganismos, como fungos filamentosos, pois estes são responsáveis por produtos e processos importantes em diversas áreas como medicina, agropecuária e na indústria. No ramo industrial, uma das possíveis atuações de microrganismos é na remediação de corantes da indústria têxtil, considerando que os efluentes gerados são um grande problema ambiental, sendo categorizados como um dos mais poluentes entre os setores industriais. Tais corantes possuem baixa taxa de degradação natural e seu tratamento é de alto custo. Os fungos são capazes de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários que podem ser eficientes na degradação destes corantes. Algumas enzimas produzidas apresentam baixa especificidade e são capazes de agir em diversas substâncias, como os corantes. Alguns estudos apontam também a ação descolorante pela adsorção dos corantes por micélio fúngico. Neste trabalho, isolados fungos filamentosos da coleção do LabGeM, Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR, foram avaliados quanto ao seu potencial na descoloração de corantes têxteis da família Remazol. Para uma seleção inicial, sete isolados endofíticos do gênero *Curvularia*, fungo de micélio escuro, melanizado, foram cultivados em meio mínimo semi-sólido adicionado com os corantes azul (RB220), amarelo (RY107) ou vermelho (RR198) e a avaliação da capacidade de descoloração foi feita por inspeção visual, pela formação de halo descolorado ao redor da colônia. O isolado mais promissor, *Curvularia lunata* LGMF996, foi selecionado e utilizado em testes em meio líquido, para averiguar o seu potencial de descoloração, com base na absorbância analisada, conseguindo mais de 87% de descoloração do meio de cultura com o corante azul (RB220). Este isolado foi exposto à luz ultravioleta para a obtenção de possíveis mutantes com maior potencial na atividade descolorante. Um mutante que apresentava o micélio menos melanizado foi selecionado, porém não apresentou resultado melhor do fungo selvagem. No decorrer do trabalho foi obtido um novo isolado fúngico que apresentou resultados promissores na descoloração do corante azul, 87%, e também do corante vermelho, com cerca de 90% do meio de cultura descolorido. Novos estudos estão sendo conduzidos com esta linhagem, bem como análises morfológicas e sequenciamento de DNA para a sua identificação.

Palavras-chave: Biotecnologia. Microrganismos. Fungos. Corantes Têxteis. Descoloração. Luz Ultravioleta. Mutação. Micélio. Melanina.

ABSTRACT

The main lines of research in biotechnology use microorganisms, such as filamentous fungi, in medicine, farming and industry. In industry, a possible use of microorganisms is in remediation of textile dyes, considering generated effluents are a huge environmental concern, can be ranked as a top polluting in industrial sectors. These dyes have a low rate of natural degradation and their treatment is expensive. Fungus are capable to produce a wide range of secondary metabolites, been efficient in degradation of these dyes. Some fungal enzymes shows a low specificity and are able to act in most diverse substances, such as textile dyes. Previous studies also indicates the decolorizing action is due to adsorption of dyes by fungal mycelium. In this research, isolates of filamentous fungi from collection of LabGeM, Laboratory of Microorganisms Genetics of UFPR, were analyzed for their potential in the discoloration of Remazol family textile dyes. For an initial selection, seven endophytic isolates of *Curvularia* genus, dark mycelium fungus, melanized, were cultivated in minimum semi-solid medium, added with the blue (RB220), yellow (RY107) OR red (RR198) dyes and the evaluation of the discoloration capacity was done by visual inspection, by the formation of discolored halo around the colony. The most promising isolate, *Curvularia lunata* LGMF996 were selected and used in tests on liquid medium to determine their potential for discoloration, based on the absorbance analyzed, achieving more than 87% discoloration of the culture medium with the blue dye (RB220). This isolate was exposed to ultraviolet light to obtain possible mutants with higher potential in the decolorizing activity. A mutant that had the least melanized mycelium was selected, but did not present a better result of the wild fungus. During the work, a new fungal isolate was obtained, which showed promising results in the discoloration of the blue dye, 87%, and also of the red dye, with about 90% of the discolored culture medium. New study studies are being conducted with this lineage, as well as morphological analyzes and DNA sequencing for their identification.

Key-words: Biotechnology. Discoloration. Fungi. Melanin. Microorganisms. Mutation. Mycelium. Textile Dyes. Ultraviolet Light.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo Geral	7
2.2 Objetivos Específicos.....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1 Corantes Têxteis	8
3.2 Efluentes Industriais.....	8
3.3 Potencial Biotecnológico de Fungos	9
3.4 Gênero <i>Curvularia</i>	10
3.5 Melhoramento Genético por U.V.	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Material Biológico.....	12
4.2 Corantes.....	12
4.3 Meios de Cultura	13
4.3.1 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)	13
4.3.2 Meio Mínimo (MM)	13
4.3.3 Meio Mínimo com Corante (MM+Cor).....	14
4.4 Soluções.....	14
4.4.1 Solução Salina	14
4.4.2 Solução de “Tween 80”	14
4.5 Preparo de Materiais.....	14
4.5.1 Esterilização.....	14
4.5.2 Incubação	14
4.6 Indução de Mutação por Exposição à UV	15
4.7 Análise de Descoloração em Cultura	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1 Seleção de linhagem mutante de <i>C. lunata</i> LGMF996	17
5.2 Medição do Halo de Descoloração em Meio Sólido	19
5.3 Análise da Atividade Descolorante em Meio Líquido.....	21
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

Corantes estão presentes no cotidiano de todos, estejam eles nos alimentos, roupas, na construção civil e em produtos de consumo. A indústria têxtil possui grande relevância no cenário industrial e por isso eliminam uma grande quantidade de esgoto, que pode ser classificado como um dos mais poluentes dentre os setores industriais, devido ao seu grande volume e composição complexa dos corantes em mistura, pois podem ser tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, além de afetar diretamente no ciclo de oxigênio de corpos de águas naturais (PEIXOTO, 2013).

Estima-se que, em meados dos anos 2000, eram produzidas cerca de 70 mil toneladas de corantes sintéticos por ano, sendo que entre 10 e 20% dessa quantia é liberada como resíduo nos corpos hídricos, gerando vários problemas ambientais e até de saúde, devido a sua toxicidade (COUTO, 2009).

Os resíduos dos corantes rejeitados geralmente são tratados por processos físico-químicos, como coagulação, floculação, adsorção, filtração por membranas e irradiação, mas esses tratamentos possuem um alto custo, geralmente realizados por empresas especializadas e que ainda assim produzem lodo ativado como resíduo final cujo destino é incineração ou descarte em aterros sanitários (NIEBISCH, 2010).

Desse modo, tratamentos biológicos, como a degradação dos corantes por meio de enzimas, vêm sendo utilizados como alternativa aos métodos tradicionais. Uma ampla gama de microrganismos, como bactérias, fungos e algas, é capaz de produzir metabólitos secundários com a capacidade de degradar poluentes industriais, entre eles, os corantes da indústria têxtil (PEIXOTO, 2013; NIEBISCH, 2010).

Os fungos representam um grupo diverso, tendo desde representantes unicelulares, formadores de colônias e até grupos mais complexos com corpo de frutificação macroscópico. A grande maioria das plantas que ocorrem na natureza apresentam alguma forma de interação com fungos, sejam eles micorrízicos ou endófitos (RODRIGUEZ, 2009), que colonizam tecidos ou órgãos das plantas, sem causar danos e até mesmo podendo conferir vantagens ao vegetal (SOUZA, 2004).

Fungos apresentam grande capacidade biotecnológica, principalmente pela sua produção de metabólitos secundários com grande diversidade de composição e possibilidade de usos (ADRIO & DEMAIN, 2003). Um exemplo disso é a produção de enzimas extracelulares utilizadas na degradação de componentes das células vegetais da planta hospedeira, por fungos endofíticos (PETRINI, 1991). Fenol oxidases e peroxidases participam na degradação de lignina, possibilitando ao fungo a utilização da celulose como fonte de carbono, mas por possuírem uma relativa baixa especificidade para com seus substratos, essas enzimas são capazes de degradar diversos poluentes oriundos da ação humana, principalmente nas indústrias (NIEBISCH, 2010).

Com a finalidade de otimizar e aumentar a obtenção de produtos metabólicos de interesse, é possível induzir mutações às linhagens conhecidas (DU, 2015). Mutações no DNA podem ocorrer espontaneamente, por erros na replicação da fita de DNA, ou então por exposição a agentes mutagênicos externos, sejam eles físicos ou químicos. A exposição à luz ultravioleta (UV) é um processo mutagênico físico, não ionizante, que induz troca de pares de base do DNA (GARDNER & SNUSTAD, 1986).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo analisar o potencial biotecnológico de linhagens de fungos filamentosos, pela ação de descoloração de corantes sintéticos utilizados pela indústria têxtil.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade descorante da linhagem isolada LGMF996 do fungo endofítico *Curvularia lunata*, obtido da planta *Zea mays* (milho), em meios de cultura com corantes sintéticos.
- Obter linhagens melhoradas por isolamento de mutantes obtidos por exposição a luz U.V.
- Comparar a atividade de descoloração entre as linhagens mutante e selvagem.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Corantes Têxteis

Corantes são compostos orgânicos utilizados amplamente em diversos setores industriais, como na produção de alimentos, medicamentos, roupas, plásticos, tintas e em diversos outros produtos de consumo (POPLI & PATEL, 2014).

Corantes têxteis são substâncias capazes de tingir tecidos e que não são removidos por lavagem simples ou fricção. Podem ser classificados conforme a sua estrutura química ou então pela forma em que ele se fixa à fibra têxtil (GUARATINI & ZANONI, 2000; POPLI & PATEL, 2014).

Em sua estrutura química, apresentam um agrupamento de átomos responsável pela sua cor, chamado de cromóforo, e também um outro agrupamento que pode doar ou receber elétrons, intensificando a coloração dos cromóforos, chamado de auxocromo (GUARATINI & ZANONI, 2000; POPLI & PATEL, 2014).

Os azocorantes são os corantes mais bem representados dentre os demais da indústria têxtil, e possuem como característica a presença de pelo menos um grupamento cromóforo azo ($-N=N-$) ligado a anéis aromáticos (KUNZ et al., 2002; POPLI; PATEL, 2014). Esses corantes são solúveis em água e podem apresentar uma grande variedade de cores e estruturas, geralmente resistem a biodegradação aeróbica (HUSAIN, 2006).

3.2 Efluentes Industriais

No final do processo de tingimento das fibras de tecidos é realizada uma fase de lavagem para remover o excesso de corante não fixado, essa, gerando efluentes coloridos e contaminados (GUARATINI & ZANONI, 2000).

Os efluentes coloridos das indústrias têxteis apresentam composição complexa devido aos corantes em mistura, e podem ser tóxicos à vida aquática e apresentam potencial mutagênico até mesmo para humanos, além de interferir diretamente na incidência da luz solar, no ciclo de nutrientes e na demanda de oxigênio local. Tudo isso somado ao grande volume de efluentes gerados,

classifica o esgoto têxtil como um dos mais poluentes dentre os setores industriais. (PEIXOTO, 2013).

Os efluentes com corantes eliminados são geralmente tratados por processos físico-químicos, porém só são tratamentos eficientes se o volume for pequeno, o que não é a realidade da indústria têxtil, e até mesmo em estudos de escala laboratorial um fator limitante é o alto custo desses processos. E mesmo após esses tratamentos ainda há a produção de um lodo ativado, altamente tóxico, que tem como destino o descarte em aterros sanitários ou a sua eliminação por incineração (NIEBISCH, 2010; ROBINSON, 2001).

Como alternativa tem sido utilizado tratamentos biológicos, principalmente com microrganismos, seja por ação de seus metabólitos secretados, capazes de agir diretamente na degradação dos corantes ou então pela adsorção realizada pela biomassa desses organismos (ROBINSON, 2001).

3.3 Potencial Biotecnológico de Fungos

Fungos podem ser utilizados em inúmeros processos industriais, seja na produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, pigmentos, lipídeos e outros mais. Muitos desses produtos são potencialmente valiosos na biotecnologia. Metabólitos secundários fúngicos apresentam extrema importância para a saúde e nutrição humana, apresentando um alto impacto econômico (ADRIO & DEMAIN, 2003).

Muitos fungos apresentam atividade lignolítica, ou seja, são capazes de degradar lignina das plantas, secretando enzimas capazes de quebrar essa molécula, permitindo ao fungo utilizar a celulose como fonte de carbono (NIEBISCH, 2010).

Algumas dessas enzimas, como a lacase, a lignina peroxidase, e a manganês peroxidase ganham uma certa vantagem na degradação de compostos sintéticos, já que possuem uma baixa especificidade estrutural, podendo atuar em compostos com estruturas diversas, como hidrocarbonetos aromáticos, compostos clorados e também sobre corantes sintéticos. (JIN et al., 2007; SARATALE et al., 2011; CHENGALROYEN & DABBS, 2013).

Além de metabólitos secundários de suma importância os fungos ainda podem realizar adsorção de compostos pela sua biomassa micelial, esteja ela

viva ou morta, removendo em parte esses compostos tóxicos de efluentes, por exemplo (POPLI & PATEL, 2014).

3.4 Gênero *Curvularia*

Muitos estudos vêm sendo feitos a fim de isolar e selecionar os microrganismos com o maior potencial de descoloração e degradação de corantes sintéticos como alternativa no tratamento dos efluentes da indústria têxtil (ROBINSON et al, 2001). Entre eles, fungos endofíticos já vem sendo estudados e apresentando resultados interessantes, como no estudo de Marzall (2017), que utilizou espécies do gênero *Neopestalotiopsis* na descoloração de corantes têxteis.

O gênero *Curvularia* pertence ao filo Ascomycota, é geralmente classificado como endofítico de plantas, mas também pode ser encontrado no solo de regiões tropicais e temperadas. Apresenta mais de 40 espécies, sendo em sua maioria saprófitas, mas podem até causar doenças no ser humano, principalmente alérgicas (ALEX et al, 2013). Os fungos desse gênero apresentam seu micélio com pigmentação escura devido a produção de melanina na parede celular (FERREIRA, 2010).

3.5 Melhoramento Genético por U.V.

A exposição do DNA à radiação ultravioleta, é um processo mutagênico físico, não ionizante, que induz trocas de pares de bases na dupla fita. Os produtos mais frequentes obtidos são ligações covalentes entre pirimidinas adjacentes, formando estruturas de anéis, também chamados de dímeros de pirimidinas ciclobutano. Esses dímeros induzem um comportamento anormal de DNA/RNA polimerases durante os processos de replicação do DNA e transcrição de proteínas, podendo ser letal para a célula e até mesmo para o organismo. Os dímeros podem ser corrigidos através da ação da fotoliase, enzima que quebra as ligações entre as pirimidinas e é ativada diretamente pela presença de luz visível (GARDNER & SNUSTAD, 1986; FRIEDBERG, 1995).

Induzir e selecionar mutantes que tenham características genotípicas particulares, pode ser vantajoso, visando por exemplo uma maior produção de

metabólitos secundários ou então a otimização da atividade enzimática com propriedades catalíticas (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010; DU et al, 2015). Du e colaboradores (2015), com o propósito de induzir uma maior produção da enzima lacase, expôs o fungo *Shiraia sp.* à radiação ultravioleta, produzindo mutantes, e observou um aumento de 1,82 vezes de produção dessa enzima em relação as linhagens selvagens.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia aplicada nesse estudo teve como base os trabalhos de Bruscato (2008, 2011) e Marzall (2017).

4.1 Material Biológico

A linhagem de *Curvularia lunata* LGMF996 (FERREIRA, 2010), pertence à coleção de microorganismos do Laboratório de Genética de Microorganismos (LabGeM), Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Foi isolada a partir de *Zea Mays* L. pertencente à empresa “Semília Genética e Melhoramento LTDA.”, plantadas na região de Bateias, Campo Largo/PR.

Estudos anteriores realizados pela equipe do LabGeM apontaram que a linhagem LGMF996 dessa espécie possui potencial de descoloração de corantes da indústria têxtil (dados não publicados).

Também foi isolado e selecionado um fungo que cresceu, como contaminante, em uma das placas de meio de cultura com corante exposta ao ar, e mostrou um bom potencial de descoloração desse meio. Sua ação descolorante foi igualmente analisada e comparada com as linhagens de *Curvularia lunata*.

4.2 Corantes

Foram utilizadas amostras dos corantes têxteis, cedidos pela empresa “Dystar” (São Paulo, Brasil). Os corantes são: Remazol Azul Reativo 220 (RB220), Vermelho Reativo 198 (RR198) e Amarelo Reativo 107 (RY107). Os três corantes apresentam o grupamento cromóforo azo.

4.3 Meios de Cultura

4.3.1 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Batata descascada e cortada	200,0 g/L
Dextrose	20,0 g/L
Ágar bacteriológico	15,0 g/L
Água destilada	p/1000,0 mL

As batatas foram cozidas em 500 mL de água destilada durante 20 minutos, e em seguida, filtradas com gaze, foi adicionada a dextrose ao caldo, e completando-se o volume para 1000 mL com água destilada.

O pH foi ajustado para 5,8 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade.

Acrescentou-se o ágar bacteriológico.

4.3.2 Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO et al., 1953, modificado por BRUSCATO, 2008).

NaNO ₃	6,0 g/L
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
KCl	0,5 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/L
FeSO ₄	0,02 g/L
ZnSO ₄	0,02 g/L
Água destilada	p/1000,0 mL

O pH foi ajustado para 5,8 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade.

Para MM sólido será acrescentado 1,5% de ágar bacteriológico.

4.3.3 Meio Mínimo com Corante (MM+Cor)

Meio Mínimo adicionado de:

Corante (RB220/RY107/RR198) 0,1g/L

O pH foi ajustado para 5,8 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade.

Para MM+Cor sólido foi acrescentado 1,5% de Agar bacteriológico.

4.4 Soluções

4.4.1 Solução Salina

NaCl 0,85% (p/v) em H₂O destilada.

Alíquotas foram colocadas em frascos, autoclavadas e mantidas 4°C.

4.4.2 Solução de "Tween 80"

"Tween 80" 0,1% (v/v) em H₂O destilada.

Alíquotas de 2,5 mL foram armazenadas em tubos de ensaio, autoclavadas e mantidas a 4°C.

4.5 Preparo de Materiais

4.5.1 Esterilização

Os meios de cultura, soluções, palitos de transferência, ponteiras de micropipetadores, frascos vazios etc. foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera por 20 minutos.

Placas de Petri serão esterilizadas em forno Pasteur a 180°C por 4 horas.

4.5.2 Incubação

Placas foram incubadas a 28°C para o crescimento do fungo em estufa tipo BOD com luz ininterrupta por 8 dias. Em meio líquido, a incubação também ocorreu a 28°C, com rotação de acordo com o caso, por 15 dias.

4.6 Indução de Mutação por Exposição à UV

Para a obtenção de mutantes com uma possível melhora genética na descoloração dos corantes analisados, foram preparadas suspensões de esporos da linhagem do fungo *C. lunata* LGMF996 em solução *tween 80* 0,1%. A solução de Tween é um composto que se assemelha a um detergente, deixando os esporos separados entre si na solução.

Após a agitação da solução com esporos, foram realizadas diluições seriadas em solução salina para a obtenção de diferentes concentrações de esporos/ml (10^{-3} , 10^{-1} e 10^0 esporos/ml) utilizadas como ajuste aos diferentes tempos de exposição à UV.

As suspensões em diferentes concentrações de esporos foram expostas, em três diferentes tempos (1, 5 e 10 minutos), à luz UV (lâmpada germicida com emissão de 254 nm). As alíquotas foram incubadas em placas de Petri com meio de cultura B.D.A. em ausência de luz por 24h, para evitar a ação de fotorreativação enzimática induzida pela luz branca, e mantidas em estufa do tipo B.O.D a 28° C. Após 48h de incubação o número de colônias foi contado em cada placa, e considerando as diferentes concentrações foi calculado a porcentagem de sobrevivência, foi definido como 100% de sobreviventes a placa controle, que não foi exposta a luz ultravioleta, e a partir dela foram calculadas as sobrevivências das demais placas. É previsto que tempos de exposição que apresentem entre 1 e 5% de sobreviventes sejam uma boa indicação de mutantes, como descrito por BURNETT (1975).

O mutante foi selecionado com base nas diferenças morfológicas comparado a linhagem selvagem e também se baseando na curva de sobrevivência montada.

4.7 Análise de Descoloração em Cultura

Tanto as linhagens de *C. lunata*, selvagem e mutante, quanto o fungo obtido do ambiente foram incubadas em placas de Petri contendo Meio Mínimo Sólido com a adição de 0,1 g/L dos corantes e foi acompanhado o crescimento da hifa junto do halo de descoloração do meio por 7 dias e os dados plotados em uma tabela para comparação.

A partir de placas com 10 dias de incubação em meio mínimo sólido (MMS), dois discos de 5 mm de diâmetro com micélio foram transferidos para frascos contendo 5 mL de meio mínimo líquido (MML), com a adição de um corante reativo. As culturas foram, então, incubadas a 28 °C.

A fração líquida foi separada do micélio por filtração utilizando papel filtro Whatman nº 1 e analisada por espectrofotometria. Os picos de absorbância das ligações azo para os corantes são de 600 nm, 520 nm e 420 nm para os corantes RB220, RR198 e RY107, respectivamente (MARZALL-PEREIRA et al., 2017). A percentagem de descoloração foi calculada pela fórmula 1 (NIEBISCH et al., 2010):

$$1 \text{ DESCOLORAÇÃO (\%)} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{cultura}})/A_{\text{controle}}] \times 100$$

Onde A_{cultura} é a absorbância em determinado comprimento de onda da amostra contendo a fração líquida e A_{controle} é a amostra contendo apenas o corante. O micélio obtido será utilizado para determinação de massa seca, através de lavagem com 2 mL de MS e 24 horas em estufa a 50 °C em papéis filtros.

A unidade de descoloração (DAU), que relaciona a diminuição da absorbância do corante após incubação, por biomassa e tempo, sendo uma variável unitária, é calculada de acordo com a fórmula 2 (MARZALL-PEREIRA et al., 2017, no prelo):

$$2 \text{ DAU} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{cultura}})/0,001] / T \times M$$

Sendo T o tempo em horas e M a massa micelial seca em mg. Todas as condições foram testadas em triplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de linhagem mutante de *C. lunata* LGMF996

As placas expostas a UV tiveram suas colônias contadas e os resultados a partir das diluições realizadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Contagem do número de colônias e Taxa de Sobrevivência

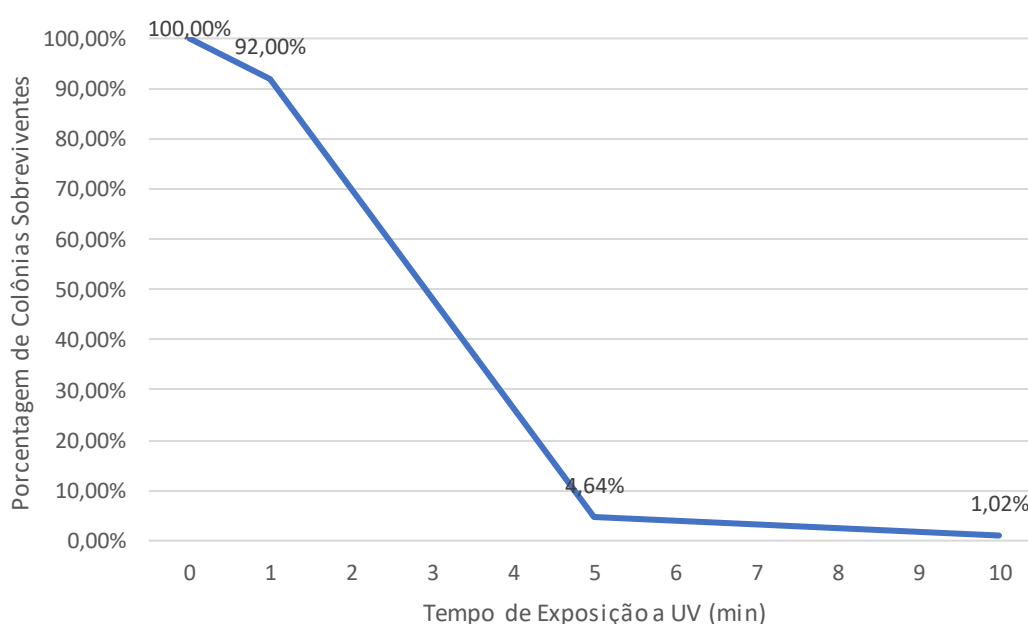
Tempo de Exposição UV (min)	Diluição	Colônias Observadas	Total de Colônias	Sobrevivência
0	10^{-3}	25	25000	100%
1	10^{-3}	23	23000	92%
5	10^{-1}	116	1160	4,64%
10	-	256	256	1,02%

Fonte: O autor (2018).

No Gráfico 1 encontram-se os dados da Tabela 1 plotados em uma curva de sobrevivência. Observou-se que a relação entre sobrevivência e tempo de exposição à radiação ultravioleta, as placas incubadas com alíquotas expostas à UV com os tempos de 5 e 10 minutos estão dentro da margem de 1 e 5% de sobrevivência das colônias previsto como melhor indicativo de mutantes (BURNETT, 1975).

Ao analisar aspectos morfológicos das colônias incubadas isoladamente, foi selecionada a colônia que mais se diferenciou das demais, tanto pelo tamanho quanto pela coloração levemente mais clara, como pode ser visualizado na Figura 1.

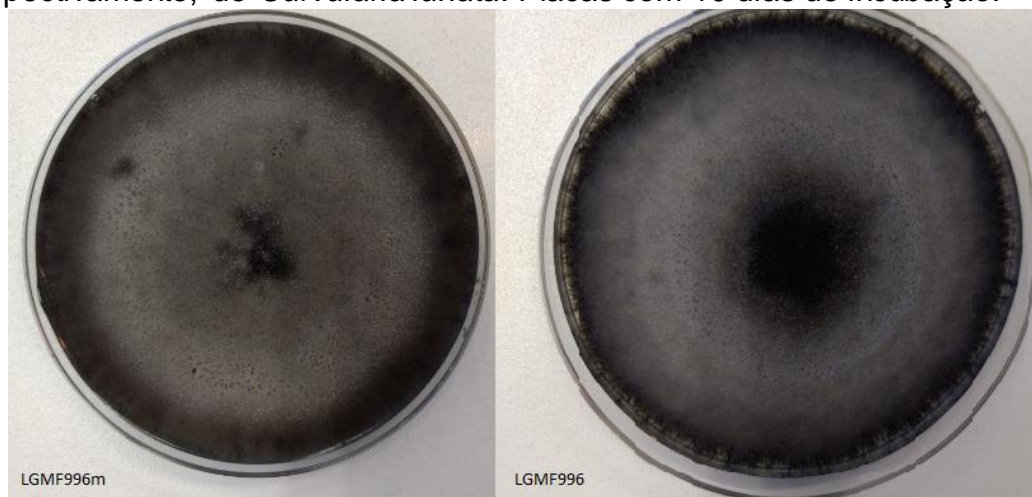
Gráfico 1. Curva de Sobrevivência das Colônias após exposição à UV



Fonte: O autor (2018).

O possível mutante selecionado foi uma das colônias isoladas expostas à UV durante 10 minutos, pois apresentou diferença morfológica visual significativa (Figura 1) e sua taxa de sobrevivência foi de 1,02%. O selecionado foi indicado nas demais análises como *C. lunata* LGMF996m.

Figura 1. Diferenças morfológicas entre as linhagens mutante e a selvagem, respectivamente, de *Curvularia lunata*. Placas com 10 dias de incubação.



Fonte: O autor (2018).

Não foram encontradas diferenças morfológicas visuais entre quase todas as colônias isoladas provavelmente pelo pouco tempo de exposição à luz ultravioleta. Fungos do gênero *Curvularia* apresentam um alto índice de melanização em sua parede celular (FERREIRA, 2010), o que pode ter protegido seus conídios da radiação UV, não produzindo mutantes viáveis para estudo.

Em uma das placas de incubação com meio de cultura e corante, foi observado um fungo contaminante, de morfologia completamente diferente (Figura 2) da linhagem estudada, e apresentou, visualmente, um bom potencial de descoloração do meio, por esta razão ele foi isolado e selecionado para as demais etapas de análises e referido como Isolado 1.

Figura 2. Isolado 1 com crescimento de 5 dias mostrando o micélio branco.

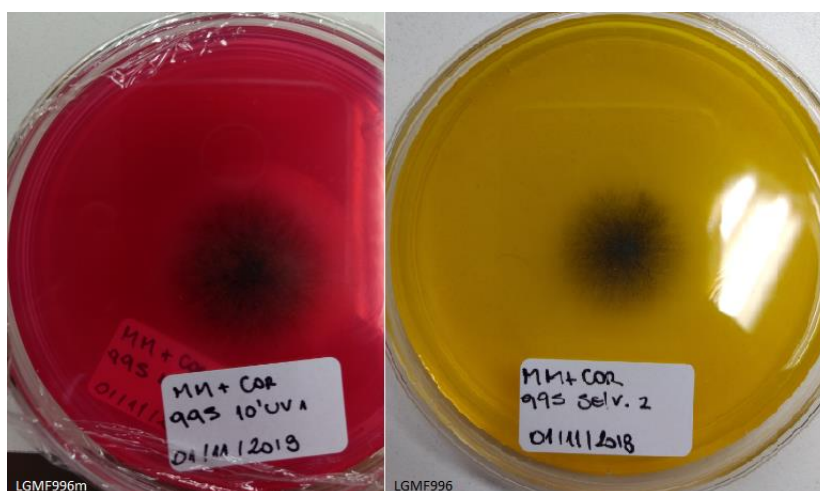


Fonte: O autor (2018).

5.2 Medição do Halo de Descoloração em Meio Sólido

Com 7 dias de incubação foi analisado o halo de descoloração do meio de cultura sólido com a adição de cada corante. Apesar de todas as linhagens estudadas conseguirem o crescimento normal de suas hifas nas placas com corantes, apenas nas placas contendo o corante Remazol Azul Reativo (RB220) foi observado descoloração do meio (Figura 3), e somente com ele foi possível realizar análises pertinentes. Na Tabela 2 encontram-se as medidas das duplicatas de cada linhagem analisada (Figura 4).

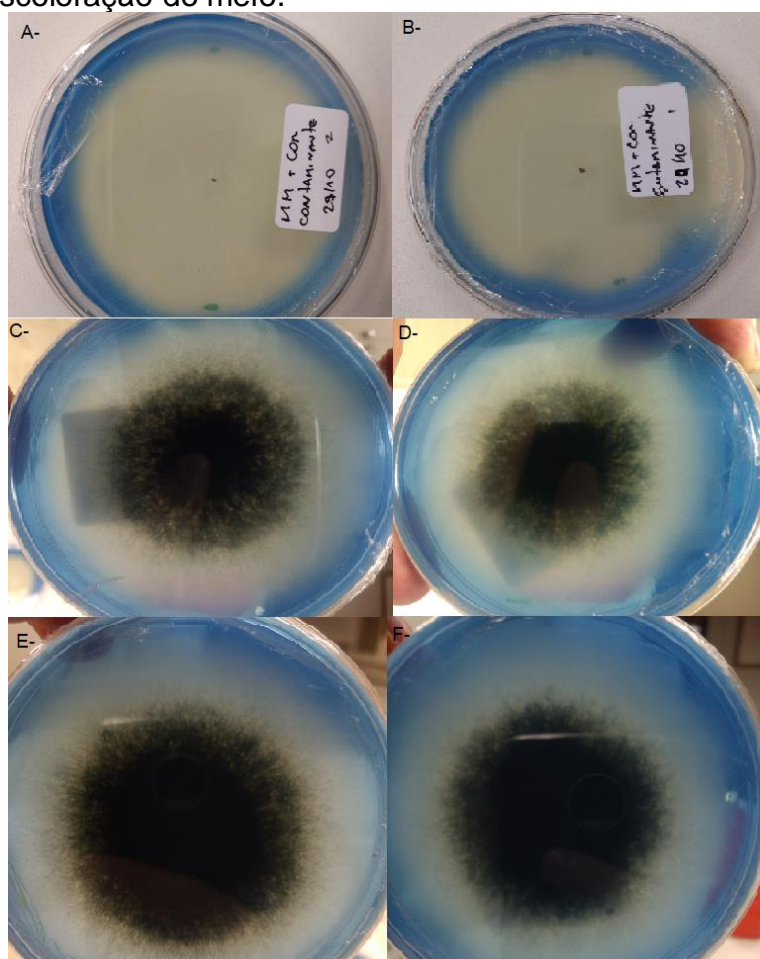
Figura 3. Placas com MM+Cor e fungo, mostrando crescimento micelial mas não apresentando halo de descoloração.



Corante vermelho (RR198) à esquerda e amarelo (RY107) à direita.

Fonte: O autor (2018).

Figura 4. Placas com MM+Cor (RB220) com sete dias de incubação, mostrando o halo de descoloração do meio.



A/B: Contaminante isolado; C/D: *C. lunata* LGMF996m; E/F: *C. lunata* LGMF996.
Fonte: O autor (2018).

Tabela 2. Medidas do halo de descoloração em MMS com o corante RB220 com 7 dias de incubação.

LINHAGEM	MEDIDA DE HALO PLACA 1 (cm)	MEDIDA DE HALO PLACA 2 (cm)	MÉDIAS (cm)	DESVIO PADRÃO
<i>C. lunata</i> LGMF996	7,1	7,2	7,15	0,05
<i>C. lunata</i> LGMF996m	6,8	7	6,9	0,1
Isolado 1	7,2	7,3	7,25	0,05

Fonte: O autor (2018).

Os dados de medição indicam que houve uma pequena diminuição no crescimento do halo de descoloração do meio na linhagem de *Curvularia* exposta à radiação UV, indicando um possível efeito negativo em seu potencial descorante, por outro lado também pode indicar apenas um menor crescimento de seu micélio em relação a linhagem selvagem. O fungo contaminante teve um halo de descoloração até maior que a linhagem selvagem de *C. lunata* para as

condições testadas, indicando possuir potencial para esse fim, podendo ser testado em estudos futuros.

O crescimento das colônias foi acompanhado e, morfologicamente, a linhagem exposta à UV teve uma menor taxa de mielinização que a linhagem selvagem, mostrando sua hifa com um centro escuro muito menor. Já a hifa do fungo filamentosso contaminante, se manteve com transparência durante todo o período de incubação, podendo indicar que a descoloração não foi apenas por adsorção pelo micélio, que é o principal método de ação de outros fungos estudados (MARZALL, 2017).

5.3 Análise da Atividade Descorante em Meio Líquido

Foram realizadas análises de absorbâncias das três linhagens estudadas, incubadas em meio líquido contendo os três corantes, e feito o cálculo de porcentagem de descoloração com base na absorbância obtida nos controles apenas contendo o meio e o corante (Tabela 3).

Também foram medidos os pesos de micélio seco em estufas das amostras e com esses dados foi calculado o DAU (Destaining Activity Unity) para cada uma das linhagens estudadas nos três distintos corantes (Tabela 4).

Tabela 3. Leitura de absorbância e porcentagem de descoloração pelos fungos estudados em meio líquido nos corantes analisados.

AMOSTRAS	Corante RB220		Corante RR198		Corante RY107	
	Média Absorbância	Descoloração (%)	Média Absorbância	Descoloração (%)	Média Absorbância	Descoloração (%)
Controle 1	0,739		1,742		1,713	
<i>Curvularia lunata</i> LGMF996	0,094	87,28010825	1,243	28,64523536	1,123	34,44249854
Controle 2	0,721		2,2905		2,4015	
<i>Curvularia lunata</i> LGMF996m	0,1263	82,48266297	1,979	13,59965073	1,725	28,16989382
Controle 3	0,721		2,2905		2,4015	
Isolado 1	0,0915	87,30929265	0,208	90,91901332	1,802	24,96356444

Fonte: O autor (2018).

Tabela 4. Medidas de peso do micélio seco das amostras e valor de DAU calculado com base no peso e na absorvância analisada.

AMOSTRAS	Corante RB220		Corante RR198		Corante RY107	
	MÉDIA PESO SECO (mg)	DAU	MÉDIA PESO SECO (mg)	DAU	MÉDIA PESO SECO (mg)	DAU
<i>Curvularia lunata</i> LGMF996	3	1,791666667	3,75	1,108888889	3,333	1,475147515
<i>Curvularia lunata</i> LGMF996m	4	1,032465278	3,67	0,589426279	4	1,174479167
Isolado 1	<1*	>4,371528**	<1*	>14,46181**	<1*	>4,163194**

*As amostras do contaminante não apresentaram peso possível de medição na balança de precisão disponível no laboratório.

**Valor de DAU calculado com base de peso de 1mg de micélio, os pesos do micélio do contaminante foi menor que 1mg, então o valor de DAU será maior que o apresentado.

Fonte: O autor (2018).

Os dados indicaram uma grande ação descolorante promovida pela linhagem LGMF996 de *C. lunata*, principalmente agindo sobre o corante azul (RB220), onde foi possível 87,28% de descoloração em apenas 5 dias de incubação em meio líquido, resultado mais expressivo que o obtido pela linhagem LGMF1504 de *Neopestalotiopsis brasiliensis*, que foi de cerca de 70% de descoloração com 15 dias de incubação, o triplo do presente estudo (MARZALL, 2017). Nos demais corantes a descoloração foi muito menor, sendo 28,65% para o corante vermelho, e 34,44% para o corante amarelo.

O mutante selecionado apresentou uma descoloração menor que a linhagem selvagem nos três diferentes corantes, descolorindo cerca de 82,48% do meio com o corante azul, 13,60% do vermelho, e 28,17% do meio com o corante amarelo. Apesar da menor descoloração em relação ao mutante, no corante azul ainda foi obtido a melhor porcentagem de descoloração, com um valor ainda bem considerável, com 82% de descoloração, indicando ser o corante em que as linhagens de *C. lunata* melhor descora.

O fungo contaminante teve um percentual de descoloração, em meio com corante azul, muito próximo ao resultado da linhagem selvagem de *C. lunata* LGMF996, 87,31 e 87,28% respectivamente. Mas foi no corante vermelho que o contaminante obteve sua maior porcentagem de descoloração do meio, chegando a 90,91%, superando a marca de 28,65% da linhagem LGMF996 de *Curvularia lunata*. Também seu percentual foi maior que os 65,5% de descoloração observada em *N. brasiliensis* nesse mesmo corante (MARZALL, 2017). Apesar desse percentual obtido em corante vermelho, no meio de cultura contendo o corante amarelo, o contaminante teve uma taxa de descoloração

muito inferior à obtida por *C. lunata*, seja em sua linhagem selvagem ou mutante de LGMF996, atingindo 24,96% contra 34,44 e 28,17% respectivamente.

O valor de DAU relaciona a descoloração obtida pelo valor de biomassa do fungo, e o valor obtido pela linhagem LGMF996, 1,79, indica um grande potencial descolorante por biomassa do fungo no corante RB220. Valores altos também foram observados nos demais corantes, 1,11 em RR198, e 1,48 em RY107. Esses valores podem indicar que a ação descolorante do fungo estudado se dá também pela ação de enzimas, e não somente pela adsorção do micélio, já que com uma biomassa menor foi possível um grande percentual de descoloração, principalmente no corante azul.

O mutante LGMF996m apresentou o valor de DAU menor que a linhagem selvagem, nos três corantes, respectivamente: 1,03 e 1,79 no corante RB220; 0,59 e 1,11 no corante RR198; 1,18 e 1,48 no corante RY107. Esses dados poderiam ser deduzidos, uma vez que a descoloração obtida pelo mutante foi menor que a obtida pela linhagem selvagem.

O fungo contaminante estudado não apresentou biomassa de seu micélio suficiente para ser medido em balança de precisão (Mín. 0,001g), não sendo possível o cálculo do valor exato de DAU. Porém pode-se concluir que mesmo apresentando uma massa micelial tão pequena, menos de 1mg, o fungo conseguiu obter um percentual de descoloração muito alto, principalmente nos corantes azul e vermelho, indicando que a fração responsável pela ação descolorante promovida por esse fungo, muito provavelmente não ocorre pela adsorção do micélio, e sim pela ação de seus metabólitos produzidos e liberados no meio de cultura com o corante analisado.

6. CONCLUSÃO

Observou-se que a exposição à radiação ultravioleta gera uma curva de letalidade alta mesmo considerando a proteção das paredes celulares melanizadas de *Curvularia lunata*. O mutante selecionado obteve menor índice de descoloração comparada a linhagem selvagem, ou seja, não ocorreu um melhoramento genético como proposto por esta pesquisa. A obtenção de mutantes com maior ação descolorante deve ser mais viável com tempos de exposição à UV maiores, já que o micélio do fungo estudado é escuro pela sua produção de melalina, protegendo seus esporos da radiação e evitando a geração de dímeros de pirimidinas.

A maior descoloração pelas linhagens de *C. lunata* estudadas se deu nos meios com o corante azul (RB220), pois deve apresentar uma estrutura química que permite ao fungo a obtenção de nutrientes através de sua degradação.

O fungo contaminante do ar selecionado e isolado apresentou ótimas taxas de descoloração, mas muito provavelmente seu mecanismo de ação descolorante é outro comparada às linhagens de *Curvularia lunata*, uma vez que o micélio seco pesou menos de 1mg, muito menor que as amostras de outros fungos estudados. Esse fungo deve ser identificado, através de um protocolo padrão à esse fim, e utilizado em mais testes com outras variáveis, de meio de cultura e corantes, além de determinar o seu componente responsável pelo processo de descoloração.

Os meios descoloridos pelos fungos estudados não necessariamente apresentam toxicidade menor que os meios com os corantes apenas, mas mesmo que a ação descolorante seja apenas pela adsorção do micélio, a retirada da coloração dos efluentes já é importante, pois melhora a incidência solar no corpo de água com o corante.

Os dados do trabalho foram obtidos em escala laboratorial, onde os corantes foram adicionados aos meios de cultura, necessários ao crescimento fúngico, com concentrações controladas, e sem mistura com outros corantes e demais contaminantes dos efluentes. Para escalas industriais de tratamento de dejetos têxteis a aplicação de fungos ainda é inviável e deve apresentar estudos profundos e principalmente, aceitação do setor industrial, seja pelo custo baixo ou velocidade e eficiência de degradação.

Testes de toxicidade do meio descorado devem ser realizados, apontando a possibilidade de despejo dos efluentes têxteis tratados no ambiente, não prejudicando a biota local e a saúde humana.

Mais estudos devem ser realizados, inclusive pelo autor, analisando a secreção dos metabólitos secundários envolvidos na descoloração, definindo a porção do fungo responsável pela ação descolorante, e também a utilização de outros corantes e microrganismos em pesquisas semelhantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. **Fungal biotechnology**. Int Microbiol 6: 191–199. 2003.
- 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. P. 137–140. 2013
- 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.
- BRUSCATO, E. C. **Avaliação do potencial de biodegradação de corantes reativos têxteis por fungos endofíticos**. 2008. 41 f. Monografia (Bacharelado). Departamento de Genética. Universidade Federal do Paraná. Paraná 2008.
- BURNETT, J.H. **Mycogenetics**. London: John Wiley & Sons, p. 375, 1975.
- CHENGALROYEN, M. D.; DABBS, E. R. **The microbial degradation of azo dyes: minireview**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 29, n. 3, p. 389-399. 2013.
- COUTO, S. R. **Dye removal by immobilised fungi**. Biotechnology Advances 27 (2009) 227–235.
- DU, W. et al. **IMPROVEMENT OF LACCASE PRODUCTION AND ITS CHARACTERIZATION BY MUTAGENESIS**. Journal of Food Biochemistry 39 (2015) 101–108.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L.; **Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**, 2a. ed., EDUCS: Caxias do Sul, 2010
- 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.
- FRIEDBERG, E.C.; G.C. WALKER; W. SIEDE. **DNA Repair and Mutagenesis**. American Society for Microbiology Press. Washington, D. C, 1995, 1 - 58.
- GARDNER, E.J.; SNUSTAD, D.P. **Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.9, P. 497. 1986.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, V. B. **Corantes Têxteis**. Química Nova, v. 23, n. 1, p. 71–78, 2000.
- HUSAIN, Q. **Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review**. Crit. Rev. Biotechnol. 26, 201–221, 2006.
- JIN, X. et al. **Decolourisation of a Dye Industry Effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6**. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 74, p. 239-243. 2007.
- KAVA-CORDEIRO V. et al. **SURVIVAL AND MUTANT PRODUCTION INDUCED BY MUTAGENIC AGENTS IN *Metarhizium anisopliae***. Sci. Agric., Piracicaba, 52(3): 548 - 554, 1995.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; DE MORAES, S. G.; DURÁN, N. **Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis**. Química Nova, v. 25, n. 1, p. 78–82, 2002.
- MARZALL, M. **DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TEXTÉIS POR NOVAS ESPÉCIES E LINHAGENS MUTANTES DE *Neopetalotiopsis* E SECREÇÃO PROTEICA DE**

***Neofusicoccum* sp.** 2017. 150 f. Tese (Mestrado). Departamento de Genética. Universidade Federal do Paraná. Paraná 2017.

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

PEIXOTO, F. et al. **CORANTES TÊXTEIS: UMA REVISÃO.** Holos, 2013, Vol. 5, 98-106.

PETRINI, Orlando. **Fungal Endophytes of Tree Leaves.** Microbial Ecology of Leaves. P. 179 – 198. 1991

POPLI, S.; PATEL, U. D. **Destruction of azo dyes by anaerobic–aerobic sequential biological treatment: a review.** International Journal of Environmental Science and Technology, n. 2, p. 405–420, 2014.

ROBINSON, T. et al. **Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative.** Bioresource Technology, n. 77, p. 247-255, 2001.

RODRIGUEZ R. J. et al. **Fungal endophytes: diversity and functional roles.** New Phytologist 182. P. 314–330. 2009

SARATALE, R.G. *et al.* **Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. v. 42, n. 1, p. 138–157. 2011.

SOUZA A. Q. L. *et al.* **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS TÓXICAS DA AMAZÔNIA: *Palicourea longiflora* (AUBL.) RICH E *Strychnoscogens* BENTHAM.** Acta Amazônica, VOL. 34(2). P. 185 – 195. 2004