



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
MULTICAMPI APUCARANA E LONDRINA

FAUSTO RODRIGUES CARDOSO

ESTUDO DOS PROCESSOS DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERMELHO
REATIVO 239 PELO FUNGO DE PODRIDÃO BRANCA *Trametes cingulata*
JUMAD075

LONDRINA
2023

FAUSTO RODRIGUES CARDOSO

**ESTUDO DOS PROCESSOS DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE
VERMELHO REATIVO 239 PELO FUNGO DE PODRIDÃO BRANCA
Trametes cingulata JUMAD075**

**STUDY OF DECOLORIZATION PROCESSES OF REACTIVE RED DYE 239
BY WHITE ROT FUNGUS *Trametes cingulata* JUMAD075**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental / multicampi Apucarana e Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental. Área de Concentração: Engenharia Ambiental. Orientadora: Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel. Coorientador: Dr. Orlando de Carvalho Junior.

LONDRINA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina**



FAUSTO RODRIGUES CARDOSO

DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERMELHO REATIVO 239 PELO NOVO ISOLADO FÚNGICO TRAMETES CINGULATA JUMAD075: ESTUDO DOS PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO E ADSORÇÃO

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Ambiental.

Data de aprovação: 27 de Fevereiro de 2023

Dra. Juliana Feijo De Souza Daniel, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Maria Ines Rezende, Doutorado - Universidade Estadual de Londrina (Uel)

Mario Antonio Alves Da Cunha, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 28/02/2023.

Dedico este trabalho a meus filhos Francisco e Iara
e a minha companheira Letícia, bem como a todos
os meus antepassados.

AGRADECIMENTOS

Ao Excelentíssimo Reitor Marcos Flávio de Oliveira Schiefler Filho e aos administradores do Campus de Londrina da UTFPR e do PPGEA, pela excelente administração universitária eu sou grato.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel e ao meu coorientador Prof. Dr. Orlando de Carvalho Junior, pela sabedoria e profissionalismo ao me guiar neste projeto.

Todos os professores da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Profa. Dra. Maria Inês Rezende, Profa. Dra. Karina Benassi Angilelli e Prof. Dr. Alexandre Urbano, da UTFPR, Profa. Dra. Luciana Maia, Prof. Dr. Ricardo Nagamine Costanzi, Profa. Dra. Patrícia Carneiro Lobo Faria, e da Universidade estadual de Campinas (Unicamp), que apoiaram a esta pesquisa com protocolos, conselhos e materiais.

Agradeço a todos os técnicos que ajudaram na realização de análises, Thalita, Jaqueline, Carlos, Fernanda, Erika, Thiago, Juliano e Roberta da UTFPR e Daniel e Nelson da UEL.

Aos meus colegas de laboratório que ao longo de dois anos foram muito prestativos e atenciosos no auxílio das tarefas, Carol, Jessica, Gabriel, Gabriela, Denise e Laís. Aos servidores terceirizados da limpeza, da segurança, do restaurante universitário e da manutenção, sempre animados ao atender os chamados de ajuda e cumprimentos diários de “bom dia” e “até amanhã”.

Sobretudo, gostaria de agradecer a minha família, a querida companheira que me apoia nos projetos certos, Letícia, ao meu amado filho sempre forte e concentrado, Francisco e minha menina calma e consciente, Iara. Vocês são minha motivação maior para realizar minhas vontades, evoluir e adquirir sabedoria. Ao meu pai Amauri, meu grande sonhador e incentivador e a minha mãe Fátima, clara e lúcida como sempre, sou grato pelos princípios que formaram meu caráter. Aos meus amados irmãos, cunhados, primos e tios, avós e todos que são desta grande família.

A todos os amigos que sempre me apoiam e trocam ideias, Paulo, Jeff, Kauana, João, Achilles e Ângela, Marcelo e Ellen, Karina e vizinhos.

Por fim, agradeço a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Andando por cima da terra, conquistando o seu
próprio espaço, é onde você pode estar agora.”
(Francisco de Assis França).

CARDOSO, Fausto Rodrigues. ESTUDO DOS PROCESSOS DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERMELHO REATIVO 239 PELO FUNGO DE PODRIDÃO BRANCA *Trametes cingulata* JUMAD075. 92 páginas. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2023.

RESUMO

O processo de tingimento industrial têxtil gera águas residuais contendo moléculas tóxicas prejudiciais aos ecossistemas. Os corantes azo encontrados em efluentes de têxteis são muito perigosos para saúde dos seres humanos, pois possuem o grupo azo (N = N), reativo com ácidos nucleicos da estrutura do DNA. Estes efluentes podem ser tratados por métodos físico-químicos e/ou biológicos. No tratamento biológico destes efluentes podem ser utilizados os fungos de podridão branca com o enfoque em duas vias: a produção de enzimas ligninolíticas (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) para degradação de moléculas de corantes, e/ou pela adsorção destas moléculas à biomassa micelial dos fungos. Neste sentido, o alvo desta pesquisa foi a realização de estudos *in vivo* para seleção de novos fungos capazes de realizar a biodegradação de corantes azo. O fungo *Trametes cingulata* JUMAD075 foi selecionado dentre quatro outros, realizada caracterização molecular e levado à aprofundamento dos estudos e otimização de condições de cultivo para biodegradação. O fungo apresentou atividade de lacase de 10,69 U/mL e 40% de descoloração do corante azo Vermelho Reativo 239 (0,2 g/L) em 12 dias. A otimização de condições de cultivo do fungo foi realizada através de um delineamento experimental multifatorial, para maiores respostas de atividade enzimática e descoloração do corante azo. Foi identificada a suplementação ideal de sulfato de cobre (2,5 g/L), extrato de levedura (8,5 g/L) e tempo de cultivo (12 dias), com produção de 10,290 U/mL de lacase, de 0,016 U/mL de lignina peroxidase, 0,003 U/mL de manganês peroxidase e descoloração de 64% (m/v) nas condições otimizadas. Foi realizado experimento para análise da eficiência na descoloração com pool de enzimas 1% (m/v) (atividade de lacase de 7,332 U/mL) extraídas de cultivo otimizado, com diminuição de em média 34% da cor do corante. A biomassa do fungo foi analisada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, sendo identificada uma possível adsorção de grupos funcionais do corante ao micélio fúngico. Em análises de microscopia eletrônica de varredura, foram obtidas imagens que permitem diferenciar aspectos que sugerem a via de adsorção. Foi possível concluir que o microrganismo *T. cingulata* JUMAD075 possui capacidade de realizar o tratamento de efluentes contendo corantes azo, sendo capaz de atuar, por duas vias, a biossorção ao micélio fúngico e a biodegradação enzimática.

Palavras-chave: Corante azo; Biodegradação; Lacase; Biossorção; Otimização

CARDOSO, Fausto Rodrigues. STUDY OF THE DECOLORIZATION PROCESSES OF THE REACTIVE RED DYE 239 BY THE WHITE ROT FUNGUS *Trametes cingulata* JUMAD075. 92 pages. Master's Dissertation in Environmental Engineering – Federal Technological University of Paraná, Londrina, 2023.

ABSTRACT

The industrial textile dyeing process generates wastewater containing toxic molecules that are harmful to ecosystems. The azo dyes found in textile effluents are very dangerous for the health of human beings, as they have the azo group (N = N), reactive with nucleic acids of the DNA structure. These effluents can be treated by physical-chemical and/or biological methods. In the biological treatment of these effluents, white rot fungi can be used with a focus on two ways: the production of ligninolytic enzymes (laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase) for the degradation of dye molecules, and/or the adsorption of these molecules to the biomass fungal mycelium. In this sense, the aim of this research was to carry out *in vivo* studies for the selection of new fungi capable of performing the biodegradation of azo dyes. The fungus *Trametes cingulata* JUMAD075 was selected among four others, molecular characterization was carried out and led to further studies and optimization of cultivation conditions for biodegradation. The fungus showed laccase activity of 10.69 U/mL and 40% decolorization of the azo dye Reactive Red 239 (0.2 g/L) in 12 days. Optimization of fungus cultivation conditions was carried out through a multifactorial experimental design, for greater responses of enzymatic activity and azo dye decolorization. The ideal supplementation of copper sulfate (2.5 g/L), yeast extract (8.5 g/L) and cultivation time (12 days) was identified, with a production of 10.290 U/mL of laccase, of 0.016 U/mL of lignin peroxidase, 0.003 U/mL of manganese peroxidase and 64% decolorization (w/v) under optimized conditions. An experiment was carried out to analyze the efficiency in discoloration with a pool of 1% (w/v) enzymes (laccase activity of 7.332 U/mL) extracted from optimized cultivation, with a decrease of an average of 34% in the color of the dye. The fungal biomass was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy, identifying a possible adsorption of functional groups of the dye to the fungal mycelium. In scanning electron microscopy analyses, images were obtained that allow differentiating aspects that suggest the adsorption pathway. It was possible to conclude that the microorganism *T. cingulata* JUMAD075 has the capacity to perform the treatment of effluents containing azo dyes, being able to act, by two ways, the biosorption to the fungal mycelium and the enzymatic biodegradation.

Keywords: Azo dye; Biodegradation; Laccase; Biosorption; Optimization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura molecular do corante Azul Reativo 4 evidenciando seu grupo cromóforo (A), seu grupo reativo (B) e auxocromos (C) | 16 |
| Figura 2 – Fluxograma da utilização de corantes azo pela indústria têxtil | 19 |
| Figura 3 - Estrutura química de corantes monoazo, diazo e triazo | 20 |
| Figura 4 - Rota de degradação do corante Laranja de Metila por lacase fúngica proposta por Telke et al. (2010)..... | 23 |
| Figura 5 - Ciclo da catálise oxidativa da Lignina Peroxidase (LiP)..... | 25 |
| Figura 6 - Ciclo da catálise oxidativa da Manganês Peroxidase (MnP) | 26 |
| Figura 7 - Esquema estrutural da parede celular fúngica identificado em ressonância magnética nuclear (AS = solúveis alcalinos; AI = insolúveis alcalinos)..... | 27 |
| Figura 8. Micrografia de MEV da biomassa micelial do fungo <i>Trametes versicolor</i> antes (A) e após (B) a adsorção do corante azo Vermelho Congo ... | 28 |
| Figura 9 - Distribuição dos pontos experimentais no delineamento experimental Box-Behken para três fatores em três níveis..... | 44 |
| Figura 10 - Espectrômetro FT-IR Spectrum Two (Perkin-Elmer)..... | 46 |
| Figura 11 - Observação morfológica das características macroscópicas do isolado <i>T. cingulata</i> JUMAD075: Face superior basidiocarpo (A); Face inferior basidiocarpo (B); Inserção dos basidiocarpos no substrato de origem (C); Composição dos poros (D)..... | 49 |
| Figura 12 - Imagens de análise de microscopia óptica e identificação de hifas generativas (A), hifas esqueletais (B) e hifas ligadoras (C)..... | 50 |
| Figura 13 - Taxas médias de inibição do crescimento micelial pelo corante VR239 das cepas estudadas | 51 |
| Figura 14 - Porcentagem de descoloração e decaimento da concentração (g/L) de corante VR239 nos ensaios realizados ao longo de 12 dias | 54 |
| Figura 15 - Relação da atividade da de Lac e descoloração pela cepa <i>T. cingulata</i> JUMAD075 na presença do corante VR239 e controle sem corante em diferentes tempos de cultivo..... | 55 |
| Figura 16 - Descoloração em três diferentes tempos em relação a diferentes concentrações do corante VR239 | 57 |

Figura 17 - Gráfico de Pareto para a Atividade de Lac com valores representativos das interações lineares e quadráticas entre os fatores e Gráfico de Superfície de Resposta pela interação entre os dois fatores mais relevantes: A) Atividade de Lac (Y1), extrato de levedura/tempo (X1X3);..... Erro! Indicador não definido.

Figura 18 - Curvas de resposta as três variáveis analisadas, considerando os fatores tempo (X1), concentração de sulfato de cobre (X2) e concentração de extrato de levedura (X3).....64

Figura 19 - Cromatograma obtido por análise de CLAE do controle (corante + meio) e do tratamento por 8 dias com a cepa *T. cingulata* JUMAD07566

Figura 20 - Cromatograma obtido por análise de CLAE do controle (corante + meio) e do tratamento por 8 dias com a cepa *T. cingulata* JUMAD07566

Figura 21 - Gráfico das bandas de transmitância no infravermelho para a molécula do corante VR239 puro.....68

Figura 22. Espectro vibracional da biomassa do fungo *T. cingulata* JUMAD075 antes (linha cinza) e após 8 dias (ensaio nº3) de contato com corante VR239 e corante puro69

Figura 23 - Espectro vibracional da biomassa do fungo *T. cingulata* JUMAD075 antes (linha cinza) e após 16 dias (ensaio nº15) de contato com corante VR239 em comparação com corante puro.....70

Figura 24 - Espectro vibracional da biomassa do fungo *T. cingulata* JUMAD075 antes (linha cinza) e após 16 dias (ensaio nº15) de contato com corante VR239 em comparação com corante puro.....71

Figura 25 - Espectro vibracional da biomassa da cepa JUMAD075 antes (linha cinza) e após 8 dias (linha azul), após 16 dias (linha laranja) e 24 dias (linha verde) de contato com corante VR23972

Figura 26. Análises de MEV para biomassa antes do tratamento (A1, A2 e A3) e após o tratamento (B1, B2 e B3) em três diferentes escalas de aumento.....74

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Classificação dos corantes baseado no grupo cromóforo presente | 17 |
| Tabela 2. Características de dois corantes azo reativos | 21 |
| Tabela 3. Tratamento de corantes utilizando fungos de podridão branca..... | 31 |
| Tabela 4. Produtos do corante VR239 identificados por CLAE-EM | 29 |
| Tabela 5 - Sistema de incubação para determinação da atividade de Lac com ABTS | 38 |
| Tabela 6 - Sistema de incubação para determinação da atividade de MnP com sulfato de manganês..... | 39 |
| Tabela 7 - Sistema de incubação para determinação da atividade de LiP com álcool veratrílico..... | 39 |
| Tabela 8 - Delineamento experimental Box-Behken para três fatores em três níveis | 43 |
| Tabela 9 - Composição do sistema de descoloração com ELE | 47 |
| Tabela 10 - Composição do sistema para controle e comparação com ELE..... | 48 |
| Tabela 11 - Descoloração e concentração ao longo de 12 dias para os corantes VR239 com concentração inicial de 0,2 g/L | 54 |
| Tabela 12 - Média do pH dos meios de cultivo contendo corantes azo e controle abiótico ao longo de 12 dias | 56 |
| Tabela 13 - Delineamento experimental Box-Behken para três fatores em três níveis e respostas obtidas com respectivos desvios padrão | 58 |
| Tabela 14 - Comparação dos resultados obtidos para a atividade enzimática de Lac, LiP e MnP (U/mL) em condições otimizadas com outro trabalho | 65 |
| Tabela 15 - Porcentagens de matéria seca por ensaio em comparação com a porcentagem de descoloração respectiva..... | 67 |
| Tabela 16 - Posição da banda dos grupos funcionais antes da adsorção e após 8 dias (ensaio nº3) de contato com corante VR239 e controle corante puro..... | 69 |
| Tabela 17 - Posição da banda dos grupos funcionais antes da adsorção e após 16 dias (ensaio nº15) de contato com corante VR239 e controle corante puro . | 70 |
| Tabela 18 - Posição da banda dos grupos funcionais antes da adsorção e após 16 dias (ensaio nº4) de contato com corante VR239 e controle corante puro... | 71 |

Tabela 20 - Resultados em triplicata de porcentagem de descoloração do corante VR239 e atividade de Lac em meio contendo ELE 1 % (m/v), controle sem ELE (CA) e controle sem corante (CB)75

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| Lac | Enzima Lacase |
| LiP | Enzima Lignina Peroxidase |
| MnP | Enzima Manganês Peroxidase |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| FT-IR | Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Forier |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Performance |
| ELE | Extrato Livre de Enzimas |
| VR239 | Vermelho Reativo 239 |
| MS | Matéria Seca |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 2.1 | Corantes Sintéticos | 15 |
| 2.1.1 | Problemas ambientais e corantes sintéticos | 18 |
| 2.1.2 | Corantes azo | 20 |
| 2.1.2.1 | Corante Vermelho Reativo 239 | 21 |
| 2.2 | Fungos da Podridão Branca..... | 22 |
| 2.2.1 | Enzimas ligninolíticas | 22 |
| 2.2.1.1 | Lacase..... | 22 |
| 2.2.1.2 | Lignina Peroxidase | 24 |
| 2.2.1.3 | Manganês Peroxidase..... | 25 |
| 2.3 | Biossorção de Corantes por Fungos de Podridão Branca..... | 26 |
| 2.4 | Biodegradação de Corantes por Fungos de Podridão Branca | 29 |
| 2.5 | Tratamento Industrial de Efluentes de Tingimento (depois da biodegradação) | 30 |
| 2.5.1 | <i>Trametes cingulata</i> - potencial para biodegradação de corantes | 33 |
| 3 | OBJETIVOS | 34 |
| 3.1 | Objetivos Gerais | 34 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 34 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 | Corante sintético e reagentes utilizados..... | 35 |
| 4.2 | Obtenção das cepas fúngicas | 35 |
| 4.2.1 | Identificação do fungo <i>Trametes cingulata</i> JUMAD075..... | 36 |
| 4.3 | Métodos de determinação da atividade enzimática | 37 |
| 4.3.1 | Atividade de lacase (Lac) | 38 |
| 4.3.2 | Atividade de Manganês Peroxidase (MnP) | 38 |
| 4.3.3 | Atividade de Lignina Peroxidase (LiP)..... | 39 |
| 4.4 | Avaliação da descoloração dos corantes meio líquido | 39 |
| 4.5 | Seleção do microrganismo para estudo | 41 |
| 4.5.1 | Triagem em meio sólido | 41 |
| 4.5.2 | Ensaio em meio líquido para avaliação do potencial de descoloração do fungo | 41 |
| 4.6 | Otimização da atividade enzimática e descoloração – Delineamento Box-Behken e metodologia de superfície de resposta..... | 42 |
| 4.7 | Análises por CLAE | 44 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.8 | Análise da bioadsorção do corante ao micélio | 45 |
| 4.8.1 | Preparação da biomassa para FTIR..... | 45 |
| 4.8.2 | Caracterização dos grupos funcionais do corante e controles por FTIR | 45 |
| 4.8.3 | Análise micrográfica por microscopia eletrônica de varredura | 46 |
| 4.9 | Ensaio descoloração com concentrado de enzimas..... | 47 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 49 |
| 5.1 | Caracterização do isolado JUMAD075..... | 49 |
| 5.1.1 | Caracterização morfológica | 49 |
| 5.1.2 | Caracterização molecular | 50 |
| 5.2 | Seleção do microrganismo para estudo | 51 |
| 5.2.1 | Testes em meio sólido..... | 51 |
| 5.2.2 | Ensaio preliminares em meio líquido com o microrganismo selecionado <i>T. cingulata</i> JUMAD075 | 53 |
| 5.3 | Otimização das condições de cultivo para três fatores..... | 57 |
| 5.4 | Análise de possíveis produtos da biodegradação | 65 |
| 5.5 | Análise da bioadsorção do corante ao micélio | 67 |
| 5.5.1 | Análise da biomassa | 67 |
| 5.5.2 | Análise da biomassa por FT-IR | 68 |
| 5.5.3 | Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 73 |
| 5.6 | Análise da descoloração do corante por concentrado de enzimas produzidas pelo isolado <i>T. cingulata</i> JUMAD075..... | 75 |
| 6 | CONCLUSÃO | 76 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |

1 INTRODUÇÃO

As necessidades da atualidade para conservação dos recursos naturais são urgentes e todas as ações possíveis devem ser tomadas para minimizar os impactos das ações do homem ao ambiente (UNDP, 2020). As diversas fontes de poluentes originados da indústria são uma ameaça à saúde humana e ambiental, pois entram nas cadeias alimentares efeitos de biomagnificação, afetando diretamente a fisiologia dos organismos (ALI et al., 2019). Ainda que demandem responsabilidade de suas fontes geradoras, os poluentes industriais continuam sendo os principais responsáveis pela deterioração da qualidade dos solos, ar e água.

Os corantes têxteis utilizados no processo de tingimento de tecidos, são de especial importância dentre as fontes industriais de poluição, devido tanto ao grande volume produzido (cerca de 7×10^7 toneladas por ano), quanto ao descarte em fontes hídricas de cerca de 10-15% destes corantes presentes em águas residuais de tingimento (JAMEE & SIDDIQUE, 2019; KAUSHAL et al., 2021). Estas substâncias orgânicas coloridas ou fluorescentes, têm como finalidade transmitir cor a um determinado substrato por absorção seletiva de luz (ETAD, 2021).

Os corantes são classificados conforme suas estruturas moleculares e categorias, podendo ser corantes ácidos, corantes azo, corantes básicos, corantes dispersos, corantes sulfurados, pigmentos, etc (MENG et al., 2014; YUSUF, 2019). Na indústria têxtil, os corantes azo são os mais usados, representando cerca de 65% (m/v) do total consumido, e isso se justifica, por possuírem um custo-efetivo baixo e serem fáceis de manusear (COSSOLIN et al., 2019; BENKHAYA et al., 2020). Os corantes azo, são particularmente preocupantes devido a interação com os ácidos nucleicos do DNA, devido a presença de um ou mais grupos cromóforos azo ($N = N$) (LAWLEY, 1966; FARGHALY e ABDALLAH, 2008; ALI et al., 2019).

Estratégias de tratamento vêm sendo aplicadas às águas residuárias de tingimento, podendo ser usados processos físicos, químicos e/ou biológicos de forma associada ou não (PIASKOWSKI et al., 2018). Com o desenvolvimento da biotecnologia vem surgindo alternativas para degradação de corantes através da aplicação de microrganismos e seus derivados. A utilização de microrganismos para a biodegradação é bastante versátil devido as diversas dinâmicas metabólicas possíveis, como por exemplo, atividade do maquinário enzimático, que atua na

decomposição de maneira não-seletiva (JAMEE e SIDDIQUE, 2019). Deste modo, a abordagem biotecnológica é considerada não-perigosa, de baixo custo, mais limpa e ambientalmente correta para a redução da poluição ambiental de efluentes (GAVRILESCU e GIONFRIDDO, 2005; DORWARD e GILLER, 2022).

Dentre todos os microrganismos, os fungos de podridão branca são os mais eficientes na quebra de corantes sintéticos (PERIASAMY et al., 2019). Este diversificado grupo de fungos é compreendido principalmente por fungos do filo Basidiomycota, destacando-se dentro da ordem Poriporales, o gênero *Trametes* sp, em estudos de biodegradação de corantes (ERDEN et al., 2011; ZENG et al., 2012; LEMUS-GÓMEZ et al., 2018; DIORIO et al., 2021) devido ao mecanismo oxidativo de enzimas como as lacases, lignina peroxidases e as manganês peroxidases (SOSA-MARTÍNEZ et al., 2020). Frequentemente, o micélio fúngico também é utilizado como biosorvente de corantes, devido à sua excelente área superficial específica e alta afinidade de componentes da parede celular destes microrganismos com grupos funcionais orgânicos (NOURI et al., 2021).

Dentre os principais desafios, estão os estudos de identificação das condições do meio de cultivo que proporcionem maior eficiência na biodegradação. O efeito da expressão de enzimas oxiredutases pode ser relacionado a uma série de fatores, que vão desde variações nas concentrações da fonte de nitrogênio e carbono, até o tempo de cultivo, velocidade de agitação e concentração do corante (GALHAUP et al., 2002). Alguns trabalhos comprovam a capacidade de fungos em transcrever genes de oxiredutases em diferentes condições, através de diferentes rotas genéticas (EL-FAKHARANY et al., 2016; LEGERSKÁ et al., 2018; HUY et al., 2020).

Investigar as bases dos de tratamento de efluentes contendo corantes azo, buscar por novos microrganismos eficientes e a realizar estudos *in vivo* para identificação dos mecanismos envolvidos na descoloração (biodegradação ou biossorção), são formas de contribuir com o desenvolvimento de biotecnologias sustentáveis. Sendo levantada as atuais necessidades para o saneamento ambiental, o presente estudo pauta-se na identificação da capacidade de descoloração de um corante azo por um novo isolado fúngico, podendo gerar informações para o desenvolvimento de produtos comerciais a serem utilizados pela indústria têxtil no tratamento adequado desta fonte poluente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

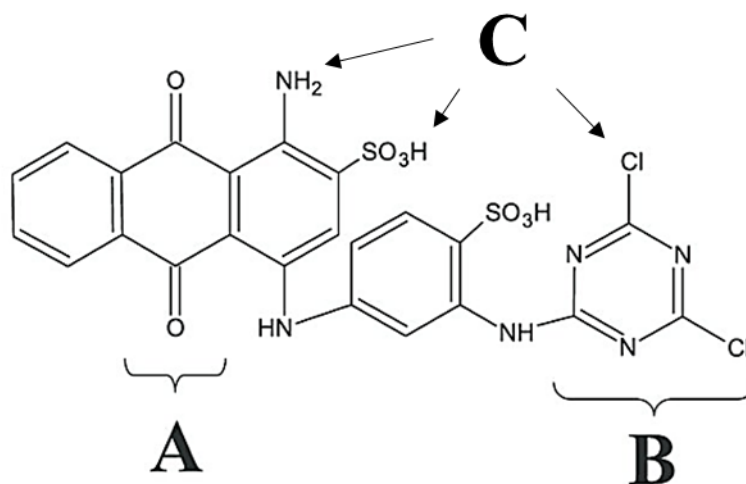
2.1 Corantes Sintéticos

Diferentemente da maioria dos outros animais, os humanos têm a capacidade de usar e interpretar cores onde não ocorrem naturalmente, imbuindo o aspecto colorido a diversos elementos, como vestuário e confecções, papel e impressão, arquitetura, fotografia, plástico, body art, veículos, embalagens, alimentos e outros (HURLBERT e LING, 2012). O olho identifica estímulos de cores de forma conjunta ao cérebro, que por sua vez processa e associa as informações que influenciam diretamente no comportamento humano de diferentes formas, como produtividade no local de trabalho, interesse por alimentos e até mesmo a escolha de parceiros (ROWLAND e BURRISS, 2017). Os diversos processos de tingimento industrial utilizados atualmente visam principalmente a publicidade, ou seja, aumentar a atratividade de produtos e influenciar diferentes públicos (THORSTENSON, 2018).

De modo geral, os corantes sintéticos são os responsáveis pela maior parte dos processos de tingimento industrial, sendo projetados para, quando aplicadas a um substrato, transmitirem determinada cor por um processo de fixação. Esta cor expressa pela molécula de corante, depende da capacidade de absorver luz na faixa visível de radiação eletromagnética (400-700 nm).

A estrutura majoritariamente responsável pela absorção de luz nas moléculas de corante são os grupos cromóforos, frequentemente carregando em suas estruturas heteroátomos como, N, O, e S. No entanto, segundo a lei de Witt, o que determina a expressão de cor pelo corante é a constituição de um grupo cromóforo e um grupo auxocromo. Sendo os cromóforos responsáveis por transmitir cor na região visível e os auxocromos por intensificar a cor (BAFANA et al., 2011). O grupamento reativo, responsável pela interação significativa, pode variar de acordo com o tipo de substrato (Figura 1). As classes de corantes baseando-se em seus grupos cromóforos presentes, é mostrada na Tabela 1. As técnicas de fixação de corantes em substratos, seja por adsorção, solubilização ou retenção mecânica, ocorre, de modo geral, pela destruição temporária de qualquer estrutura cristalina, o que impede ligações químicas iônicas ou covalentes externas e aumenta o tempo de ação colorimétrica do produto final (ETAD, 2021).

Figura 1 - Estrutura molecular do corante Azul Reativo 4 evidenciando seu grupo cromóforo (A), seu grupo reativo (B) e auxocromos (C)

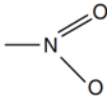
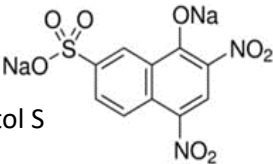
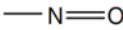
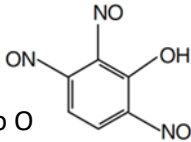
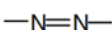
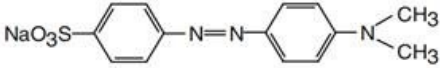
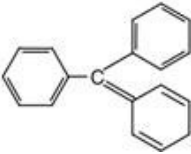
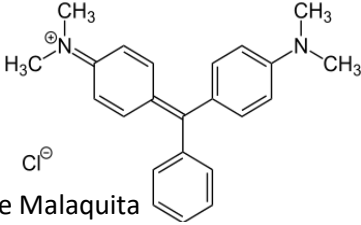
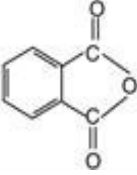
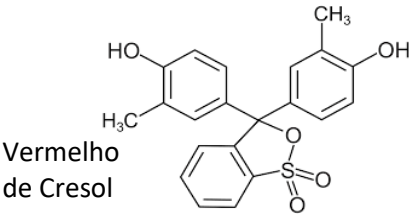
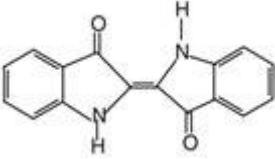
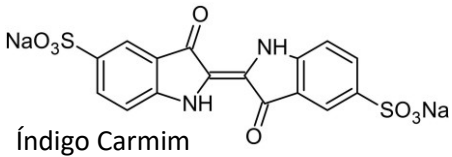
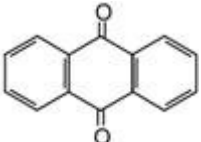
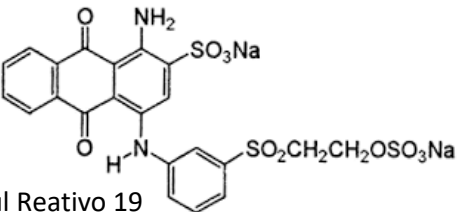


Fonte: Bergamini et al. (2005)

Os corantes sintéticos tomaram espaço importante no mercado e atualmente estima-se que existam mais de 100 mil espécies disponíveis comercialmente e que mais de 7 milhões de toneladas dessas substâncias são utilizadas por ano no mundo (BENKHAYA et al., 2020; TKACZYK et al. 2020). O uso de corantes é extensivo em diversos setores da indústria, incluindo têxteis, couro, farmacêutico, papel e celulose, impressão, tecnologia de alimentos e cosméticos. O setor têxtil é responsável pela maior parte do uso, sendo cerca de 65% do total (ARORA, 2014; YUSUF, 2019).

Estas substâncias solúveis podem ser facilmente adquiridas no Brasil e estão disponíveis em diferentes categorias de aplicação: ácido, básico, disperso, direto e pigmentos (DE ROSSO e MERCADANTE, 2009; MENG et al., 2014).

Tabela 1 - Classificação dos corantes baseado no grupo cromóforo presente

| Classe | Cromóforo | Exemplo |
|-------------------------|---|--|
| Corantes nitro |  | Amarelo Naftol S  |
| Corantes nitrosos |  | Verde Rápido O  |
| Corantes azo |  | Laranja de Metila  |
| Corantes trifenilmetano |  | Verde de Malaquita  |
| Corantes Ftaleína |  | Vermelho de Cresol  |
| Corantes índigo |  | Índigo Carmim  |
| Corantes antraquinona |  | Azul Reativo 19  |

Fonte: Ali (2010)

Os corantes têxteis também podem ser classificados de acordo com sua constituição química ou sua aplicação a fibras têxteis e outras aplicações de coloração (WALTERS e JOHNSTON, 2005). Os corantes são classificados por seus (i) grupos cromóforos em suas estruturas químicas como corantes azo, corantes de antraquinona e corantes de ftalocianina, etc. e (ii) seus uso ou métodos de aplicação

como, por exemplo, corantes dispersos para poliéster e corantes reativos para algodão (SINGH et al., 2012). Azo (monoazo, diazo, triazo e poliazo), antraquinona, os corantes triarilmetano e ftalocinina são os grupos de corantes mais utilizados por esse setor da indústria.

Corantes Reativos, Corantes de Cuba e Corantes Azo são utilizados geralmente para o tingimento e impressão em fibras de algodão. Já os corantes dispersos constituem o maior mercado com cerca de 21% de participação, seguido pelos corantes diretos e reativos com 16% e 11%, respectivamente (SINGH et al., 2012).

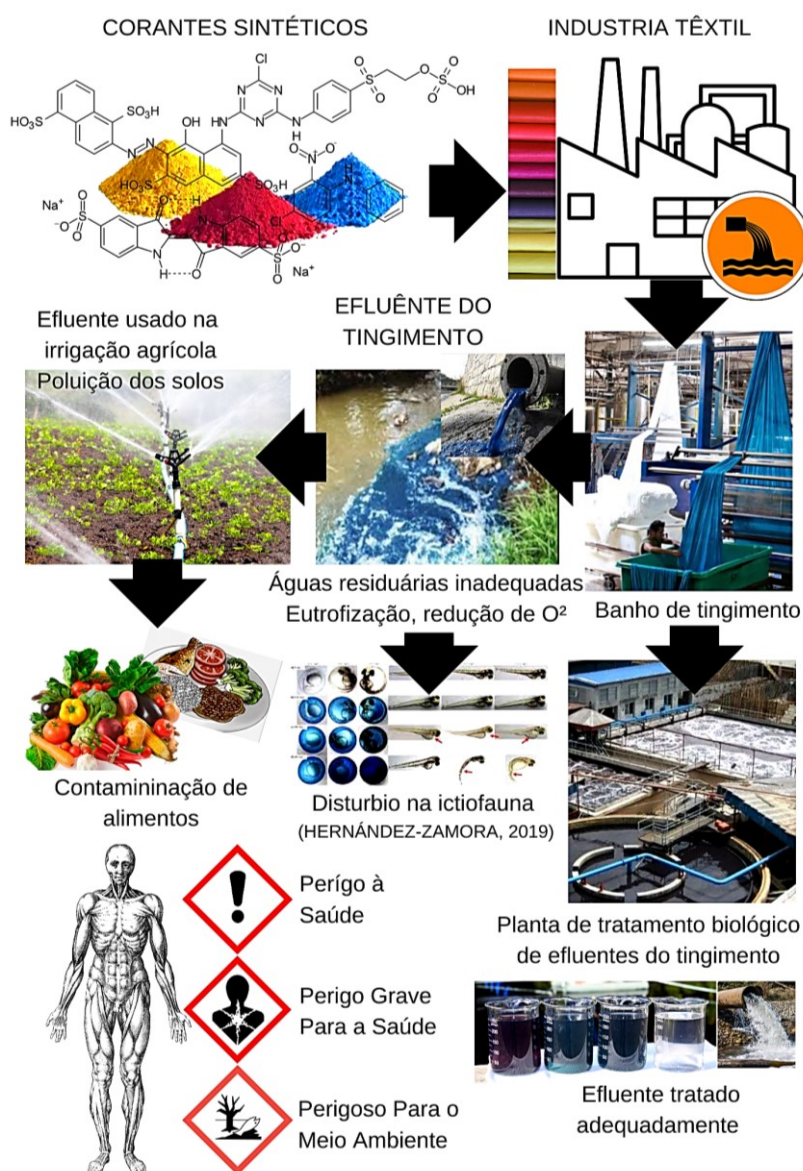
2.1.1 Problemas ambientais e corantes sintéticos

A diversidade de espécies de corantes, segue em expansão sendo constantemente criados para diversos fins e este fato gera muitas incertezas sobre os possíveis efeitos destas moléculas nos ecossistemas e no metabolismo de organismos vivos. Muitas destas moléculas representam um risco ambiental grave, tanto pelo grande volume disperso no ambiente, quanto por muitos apresentarem propriedades recalcitrantes, xenobióticas e mutagênicas (ALI, 2010; TKACZYK et al. 2020). Além, de comprovada contribuição para a eutrofização de ambientes aquáticos através da redução da fotossíntese e da concentração de O₂ em corpos receptores, diminuindo a sobrevivência de embriões da ictiofauna (JUNGTANASOMBUT et al., 2014; ABE et al., 2017).

A contaminação dos seres humanos com corantes já foi registrada através de pesquisas de análise de sangue e tecidos, sendo encontrados corantes e seus subprodutos metabólicos. Estes eventos podem ser oriundos, tanto do consumo direto (ingestão da água), quanto indireto através da irrigação agrícola com as águas de rios, afluentes e mananciais (ABE et al., 2017; HASSAAN, EL NEMR e HASSAAN, 2017). A ação carcinogênica de corantes já foi comprovada em pesquisas, onde, por exemplo a banda -N=N- de corantes azo, são responsáveis pela interação direta com o sítio ativo de proteínas (FARGHALY e ABDALLAH, 2008; MATHUR et al., 2012). Degawa e colaboradores (1978), já relatavam importante reatividade eletrofílica de estruturas aromáticas de corantes, e apontavam seu risco aos organismos.

Além dos problemas a nível individual, os corantes sintéticos afetam a ecofisiologia de biomas, através da deposição de águas residuais em cursos d'água (Figura 2). Este processo que se dá por lixiviação, leva conseqüentemente, a contaminação dos mares e regiões costeiras, estuários de suma importância ecológica para a vida no planeta (ZHOU, 2001). Isto se dá por consequência da eutrofização gerada pelo impedimento da entrada de luz solar, ou turvação das águas, o que gera diminuição da biodiversidade e mudanças na ecologia dos sistemas hídricos (ABE et al., 2017; LEGERSKÁ et al., 2018).

Figura 2 – Fluxograma da utilização de corantes azo pela indústria têxtil

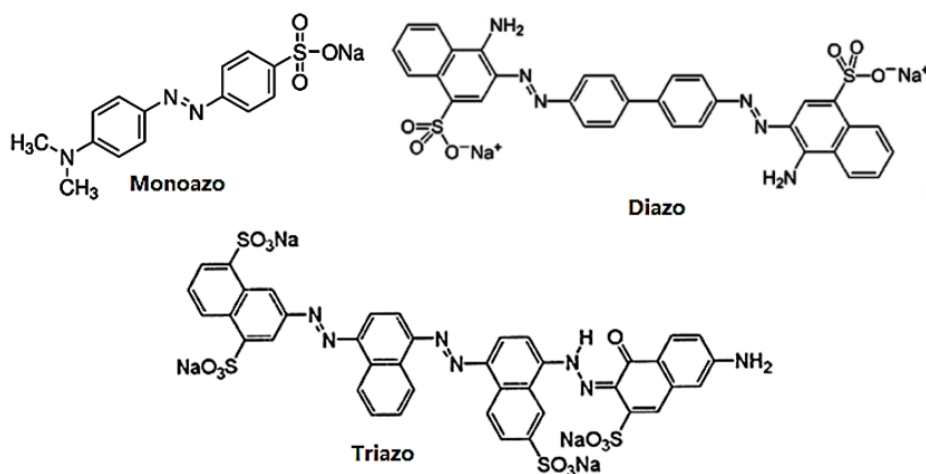


Fonte: Próprio autor

2.1.2 Corantes azo

Os corantes classificados como azo, caracterizam-se pela presença de um ou mais pares de aminas diazotizadas, acopladas geralmente por uma amina ou um fenol ao grupo reativo da molécula (BENKHAYA et al., 2020) Estes corantes geralmente são utilizados para o tingimento e impressão em fibras de algodão e são os mais utilizados pela indústria têxtil (COSSOLIN et al., 2019). Os corantes azo absorvem luz na região visível porquê de sua estrutura química, que é caracterizada por um ou mais ligações azo (-N = N-) (Figura 3) (Chang et al., 2001).

Figura 3 - Estrutura química de corantes monoazo, diazo e triazo



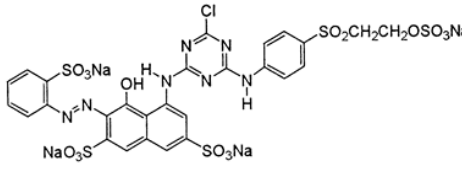
Fonte: Próprio autor

Este tipo específico de corantes é bastante reativo com organismos vivos e seu DNA e possuem difícil degradação (SINGH, IYENGAR, PANDEY, 2012). A quebra das ligações azo dos corantes em processos biológicos anaeróbicos, pode gerar produtos ainda mais tóxicos, como as aminas aromáticas, já citadas, e os ácidos benzenosulfônicos e seus derivados (GREIM et al., 1994; CHENGALROYEN e DABBS, 2013). Esses produtos são apontados como os principais responsáveis pela atividade mutagênica e carcinogênica das moléculas de corantes sintéticos (CHUNG, 2000). Estudos com o corante Vermelho Congo (diazo), por exemplo, já demonstraram que os metabólitos de sua biodegradação, como a benzidina (bifenil-4,4'-diamina), são extremamente tóxicos para seres vivos, sendo associada com desenvolvimento de câncer de bexiga (VICTOR et al., 2020)

2.1.2.1 Corante Vermelho Reativo 239

Os corantes Vermelho Reativo 239 (VR239) (Tabela 2) possui apenas um grupo cromóforo azo (monoazo), com presença do grupo reativo monoclorotriazínico (derivado da atrazina). O corante VR239 é utilizado industrialmente pelo setor têxtil para tingimento de fibras de algodão e poliéster (BROSILLON et al., 2008). Este corante possui duas fontes reativas com grupamentos hidroxila presentes nestes tipos de materiais, essa reação se dá, seja por adição nucleofílica a uma ligação dupla ativada (grupo sulfatoetilsulfona), ou, seja por substituição nucleofílica do átomo de cloro reativo (grupo monoclorotriazina) (GÜL, ÖZCAN e ERBATUR, 2008).

Tabela 2. Características de dois corantes azo reativos

| Nome | Massa Molar | Colour Index® | Fórmula Molecular | Abs. Máx. | Estrutura Molecular |
|------------------------------|--------------|----------------------|----------------------------------|-----------|---|
| Vermelho Reativo 239 (VR239) | 1136,3 g/mol | C.I.RR239 Monoazo | $C_{31}H_{19}ClN_7Na_5O_{19}S_6$ | 542 nm |  <p>BERGAMINI et al., 2009</p> |

Fonte: Bergamini et al. (2009)

Apesar das qualidades industriais destes corantes, não se deve negligenciar seus riscos a vida humana e aquática (GHALY et al., 2014). Jungtanasombut et al. (2014) verificaram a toxicidade e efeitos do corante VR239 no desenvolvimento de peixe-zebra (*Danio rerio*). A CL_{50} para estes organismos foi de 1500 mg/L, o que classifica uma baixa toxicidade para organismos aquáticos. No entanto, deformações morfológicas nos embriões foram notadas a partir de concentrações de 500 mg/L, e pode reduzir a capacidade de sobrevivência de peixes.

Este corante possui elevado consumo em países em desenvolvimento (consumo de mais de 500 toneladas por ano na Índia) (PATIL e SHUKLA, 2015), sendo, que existem poucas pesquisas sobre o tratamento biológico de VR239 (*Shewanella xiamenensis* G5-03) (COSSOLIN et al., 2019), porém sem pesquisas realizadas utilizando microrganismos fúngicos para esse corante.

2.2 Fungos da Podridão Branca

Os fungos da podridão branca são um grupo heterogêneo de fungos que pertencem ao filo dos basidiomicetos (Basidiomycota). Mais de 90% de todos os basidiomicetos que apodrecem a madeira são do tipo podridão branca (FARACO et al., 2009; SEN et al., 2016). Os fungos de podridão branca são mais comumente encontrados colonizando angiospermas do que espécies de árvores gimnospermas na natureza, e podem causar apodrecimento não seletivo ou simultâneo, enquanto alguns WRF degradam a lignina nas paredes celulares de plantas lenhosas em maior extensão do que a celulose, e são chamados de fungos de podridão branca seletivos (SEN et al., 2016).

O complexo ligninolítico produzido por estes basidiomicetos vem sendo amplamente estudado, e os resultados mostram que muitas destas espécies são capazes de degradar a lignina e suas fortes ligações, bem como a biodegradação de corantes (Tabela 3) (LEIDIG et al., 1999 RENGANATHAN et al., 2006; ISROI et al., 2011;; ANASTASI et al., 2011). As enzimas conhecidas como oxireductases são amplamente estudadas pela bioquímica de microrganismos, sendo as Lacases, Lignina Peroxidases e Manganes Peroxidases, o principal foco. As enzimas produzidas por fungos podem ser caracterizadas como indutivas, isto é, quando são induzidas na análise por algum agente indutor (álcool veratrílico, fosfato de cobre, etc.), ou constitutivas, quando não há qualquer indutor (LACERDA, 2015). Karimiaae-Hamedani et al. (2007), estudaram os mecanismos de ação de algumas enzimas sobre substratos e constatou a atividade dentro de uma ampla faixa de pH, sendo resistentes a vários ciclos de catalise oxidativa.

2.2.1 Enzimas ligninolíticas

2.2.1.1 Lacase

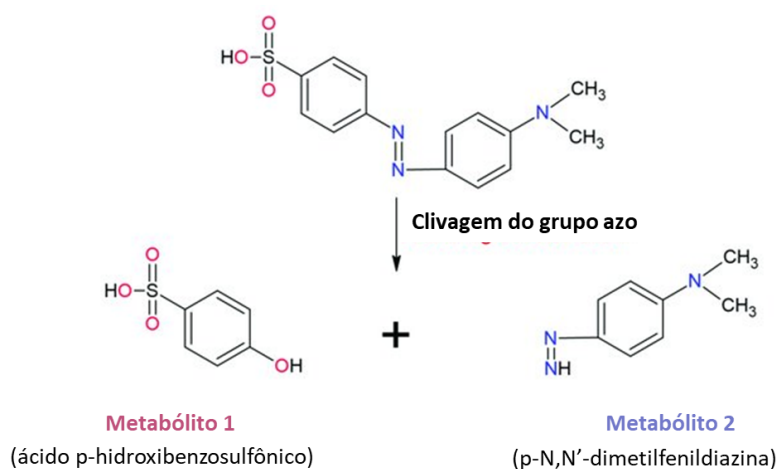
As lacases (p-difenol: oxidoreductases de dioxigênio, EC 1.10.3.2) são multi-cobre oxidases azuis, capazes de catalisar a redução de até quatro elétrons de O₂ em meio líquido, além da oxidação simultânea de substratos e fibras orgânicas (KWIATOS et al., 2015). Estas enzimas, são aplicadas em diversas áreas da indústria incluindo deslignificação, indústrias de papel, branqueamento de corantes têxteis e de corantes, biorremediação e desintoxicação de poluentes aromáticos,

produção de etanol de biomassa, tratamento de águas residuais e síntese de compostos químicos (KWIATOS et al., 2015; HAUTPHENNE et al., 2016; ARREGUI et al., 2019). É amplamente encontrada em plantas superiores, fungos, bactérias e insetos, porém, os fungos dos filos Basidiomycota e Ascomycota destacam-se como os principais produtores de lacases dentre todos os organismos produtores (POLLEGIONI et al., 2015).

As lacases foram identificadas pela primeira vez em 1896 por Bertrand e Laborde, estudando fungos saprófitos (THURSTON, 1994). Desde então, a maior parte das lacases identificadas e isoladas são de origem fúngica, dos filos Ascomycota, Deuteromycota e Basidiomycota, como *Phlebia radiata* (SALOHEIMO et al., 1991), *Trametes versicolor* (COLLINS e DOBSON, 1997), *Pleurotus ostreatus* (PALMIERI et al., 2000). Algumas espécies de *Trichoderma* sp. também são reportadas como excelentes fontes produtoras de lacases como *T. harzianum* (RANIMOL et al., 2018), *T. atroviride* (CHAKROUN et al., 2010), e *T. reesei* (KIISKINEN et al., 2004). A utilização de cultivos consorciados de *Trichoderma* sp. pode favorecer interações interespecíficas que aumentam a produção de lacases em espécies como *P. ostreatus* (VELÁZQUEZ-CEDEÑO et al., 2007).

A rota de degradação de do corante Laranja de Metila pela enzima lacase foi estudada por Telke et al. (2010), podendo ser observado na Figura 4 a clivagem do grupo azo da molécula e a formação de metabólitos intermediários da biodegradação.

Figura 4 - Rota de degradação do corante Laranja de Metila por lacase fúngica



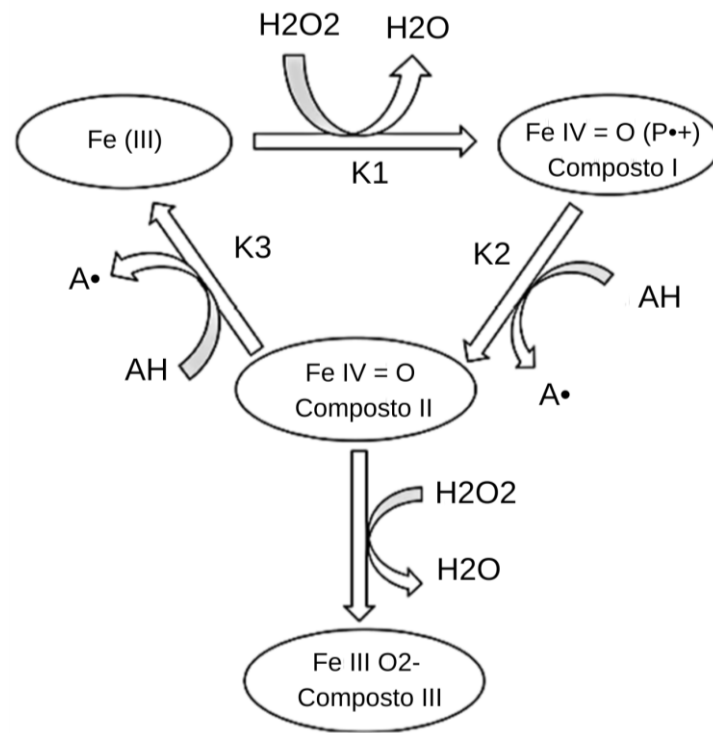
Fonte: Ardila-Leal et al. 2021.

2.2.1.2 Lignina Peroxidase

Esta glicoproteína hémica é produzida principalmente por fungos de podridão branca e podridão parda. Acredita-se que a lignina peroxidase (LiP) pode ter sido formada durante a evolução dos fungos degradadores de lignina, promovendo reações de desaminação de produtos de ácidos aminoaromáticos e posteriormente o mecanismo extracelular, com a presença da LiP possibilitou a degradação da lignina (MOREIRA NETO, 2006). O interesse sobre esta enzima tem aumentado recentemente devido a sua capacidade de catalisar uma ampla variedade de compostos fenólicos e não fenólicos (ĐURĐIĆ et al., 2021).

As LiPs são propícias a oxidação da lignina com a geração de radicais livres concomitantemente a oxidação de vários metabólitos secretados, como por exemplo o álcool veratrílico. Sendo o álcool veratrílico o estimulante mais efetivo para produção de LiPs, sendo este um importante componente na catalise oxidativa gerada neste processo metabólico (Figura 5). A LiP é oxidada por H_2O_2 para formar dois intermediadores de elétrons, composto I, que oxida substratos por um elétron formando outro componente intermediário ainda mais reduzido, o composto II. O composto II pode oxidar substratos por um elétron, retornando a enzima ao estado férrico. Entretanto, o composto II é muito reativo com H_2O_2 , o que na presença de um substrato pobre e em excesso de H_2O_2 , é convertido na forma inativa da enzima, o composto III. Álcool veratrílico, quando presente, é um substrato mais favorável para o composto II e tem a função de manter a enzima mais resistente aos radicais H_2O_2 formados, auxiliando no ciclo catalítico (VASINA et al., 2017).

Figura 5 - Ciclo da catálise oxidativa da Lignina Peroxidase (LiP)



Fonte: Vasina et al. (2017).

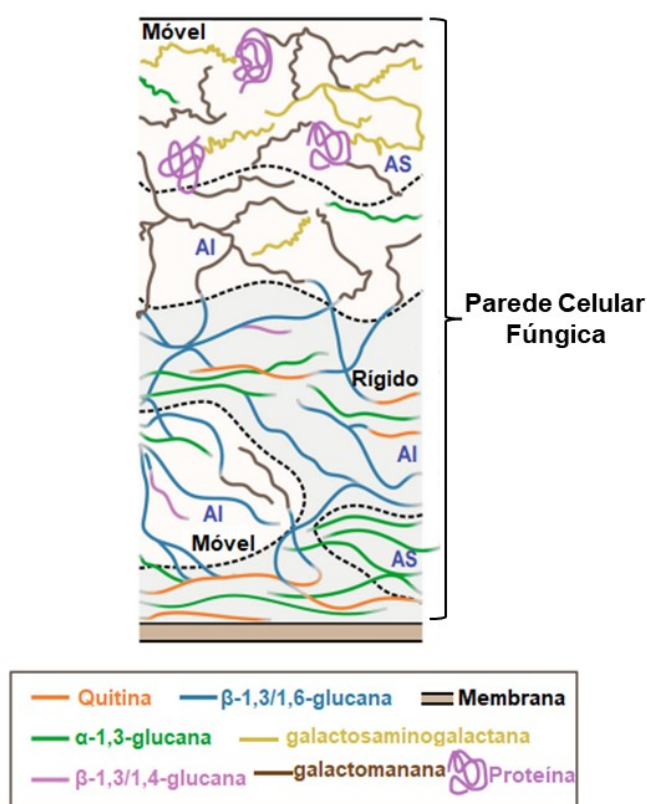
A Lip foi identificada em estudos de degradação de corantes azo sulfonados e não sulfonados, sendo observada formação de CO_2 , bem como hidroperóxido sulfofenóis (moléculas de fácil degradação) (CHIVUKULA, 1995). Estas enzimas se caracterizam por serem resistentes a muitos ciclos de reação, persistindo no meio de cultivo com atividade comprovada sobre corantes sintéticos em até 10 ciclos de renovação do corante. Isto ocorre, pois esta enzima mantém-se ativa mesmo em pH muito baixo (FERNÁNDEZ-FUEYO, RUIZ-DUEÑAS e MARTÍNEZ, 2014).

2.2.1.3 Manganês Peroxidase

A MnP é a enzima peroxidase modificadora de lignina mais comumente produzida por quase todos os basidiomicetos colonizadores de madeira que causam podridão branca, além de vários outros fungos colonizadores de substratos diversos, colonizadores do solo e, também, presentes em aterros e lixões (KUMAR e CHANDRA, 2020).

fases, semelhantes ou diferentes e se aderem formando laços físicos ou ligações químicas na superfície. A adsorção supera as limitações dos métodos convencionais de remoção de corantes em termos de custo, facilidade de operação, com um design simples sem demanda de nenhum equipamento especial para o processo (KANDISA et al., 2016). Muitos materiais podem ser utilizados como adsorventes de baixo custo, incluindo resíduos agroindustriais, subprodutos industriais e materiais naturais (YAGUB et al., 2014).

Figura 7 - Esquema estrutural da parede celular fúngica identificado em ressonância magnética nuclear (AS = solúveis alcalinos; AI = insolúveis alcalinos)



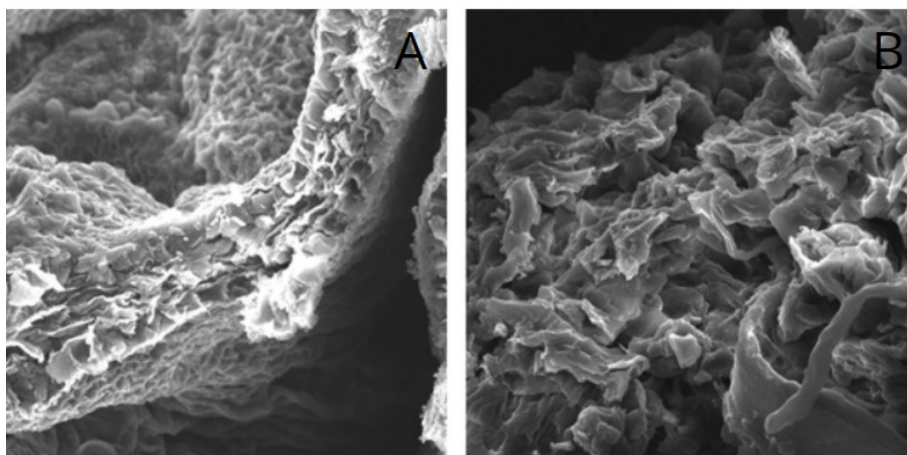
Fonte: Sintakindi e Ankamwar (2021)

A aplicação de fungos para remoção de poluentes de águas residuárias oferece vantagens como, alta área superficial específica, menor formação de lodo, produtos finais menos tóxicos, processos ecologicamente adequados, concomitante a grande capacidade de degradação enzimática e baixo custo de aplicação. Adsorventes fúngicos vem sendo apontados como candidatos úteis para a remoção de corantes. Sintakindi e Ankamwar (2021) conduziram uma pesquisa para estudar

os mecanismos de adsorção em fungos. As interações de adsorção dos corantes às paredes celulares dos fungos se dão devido a presença de moléculas como quitina, glicoproteínas, lipídios e glucanas (Figura 7). Os diferentes grupos funcionais presentes na parede celular dos fungos como ácidos carboxílicos (R-COOH), carbonilas (C=O), hidroxilas (OH), amidas (NH₂CO) e éster (R-COOR') são responsáveis pelas principais interações entre a biomassa fúngica e os poluentes orgânicos (PRIGIONE et al., 2008).

Métodos como espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) associados à espectroscopia de ultravioleta e visível (UV-VIS), são eficientes para a identificação de atividade de adsorção e descoloração respectivamente. Também é possível obter informações através de microanálises e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além disso análises de potencial zeta (Malvern Zetasizer) que identificam a carga elétrica superficial são considerados um dos fatores mais importantes para identificação da biossorção de corantes por fungos (NOURI et al., 2021).

Figura 8. Micrografia de MEV da biomassa micelial do fungo *Trametes versicolor* antes (A) e após (B) a adsorção do corante azo Vermelho Congo



Fonte: Munagapati et al. (2021)

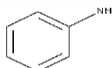
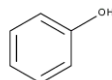
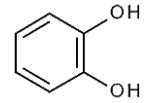
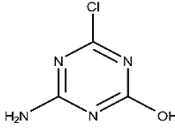
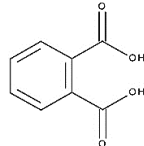
As análises de MEV são importantes para a identificação de mudanças visuais na forma de organização das hifas, como a observação de deformações em poros, deposições superficiais de substâncias (corantes, agrotóxicos e outros poluentes), além de mudanças em angulações e demais comparações morfológicas

que podem ser realizadas entre o controle e os tratamentos (NOURI et al., 2021). A Figura 8, obtida no estudo realizado por Munagapati e colaboradores (2021) evidencia um número considerável de poros heterogêneos no micélio ante do tratamento (Figura 8 A), trazendo a possibilidade do corante ser aprisionado e adsorvido nesses poros. Após adsorção (Figura 8 B), a superfície destes poros foi coberta com corante, confirmando a adsorção (Figura 2B).

2.4 Biodegradação de Corantes por Fungos de Podridão Branca

Para que se comprove que houve biorremediação e que uma solução tóxica se tornou atóxica são necessárias análises da composição de espécies moleculares presentes nesta solução (Tabela 4). Estas análises podem ser realizadas por métodos cromatográficos e espectrométricos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrometria de massas (EM) (CLAE-EM) (NAWAHWI, IBRAHIM e YAHYA, 2013).

Tabela 3. Produtos do corante VR239 identificados por CLAE-EM

| Composto | Fórmula molecular | Massa molar | Número CAS | Estrutura química |
|--|-------------------|-------------|------------|---|
| Anilina | C_6H_7N | 93,129 | 62-53-3 |  |
| Fenol | C_6H_6O | 94,113 | 108-95-2 |  |
| Catecol | $C_6H_6O_2$ | 110,112 | 120-80-9 |  |
| 4-amino-6- cloro-1,3,5- triazina-2- ol | $C_3H_2ClN_4O$ | 144,991 | 38862-29-2 |  |
| Ácido ftálico | $C_8H_6O_4$ | 166,132 | 88-99-3 |  |

Fonte: Costa Dias (2019)

2.5 Tratamento Industrial de Efluentes de Tingimento

Devido ao grande potencial poluidor de corantes azo, é muito importante que as águas residuárias sejam tratadas de modo adequado para remoção destas moléculas orgânicas. Os processos de tratamento podem ser físico-químicos ou biológicos.

Os processos físico-químicos, são fundamentais para plantas de tratamento de efluentes, sendo responsáveis pela separação de fases através da aplicação de forças físicas, como decantação, floculação e filtração (TOSATO e HALASZ, 2011). Dentre os processos físico-químicos utilizados no tratamento de corantes azo, pode-se ressaltar precipitação química, coagulação e floculação, separação por membranas e adsorção. A separação de fases mantém os componentes agregados, porém, não elimina ou degrada os poluentes orgânicos, sendo necessária a utilização de métodos complementares para maior eficiência no tratamento (TURAN-ERTAS, 2001).

Sendo levantada a importância da utilização de métodos de degradação efetiva de compostos orgânicos poluentes presentes em águas residuárias, destacam-se os processos biológicos, caracterizados pela utilização de organismos produtores de enzimas oxidativas, podendo ser bactérias, fungos, algas ou plantas. Estes processos se dão com a aplicação direta de enzimas isoladas, organismos vivos ou biomassa bruta, podendo ser aeróbicos, quando há presença de oxigênio, anóxico, quando há baixos níveis de oxigênio, ou ainda, anaeróbios, quando não há presença de oxigênio (GHALY et al., 2014). A maior parte dos tratamentos biológicos se concentra na utilização de bactérias e fungos ligninolíticos, devido a elevada produção de enzimas, neste sentido, os microrganismos mais importantes são os fungos de podridão branca. Ajustes realizados no meio de cultivo destes microrganismos ampliam ainda mais sua abrangência e eficiência da detoxificação de efluentes industriais (ANASTASI et al., 2011; EL-FAKHARANY et al., 2016; HUY et al., 2020).

Tabela 4. Tratamento de meio contendo corantes utilizando fungos de podridão branca

| Fungo | Reator | Corante | Concentração | Descoloração | Mecanismo | Tempo | Referência |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------|--------------|--------------|-----------------------------|-------|--------------------------|
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | Tambor rotativo ¹ | Poly R-478 | 0,1 g/L | 19,0% | Atividade de MnP, LiP | 15 d | Dominguez et al., 2001 |
| <i>Trametes versicolor</i> | Tanque agitado ² | Poly R-478 | 0,2 g/L | 80,0% | Biodegradação e Adsorção | 41 d | Leidig et al., 1999 |
| <i>Funalia trogii</i> | Biomassa morta ³ | Azul Astrazona | 0,05 g/L | 48,0% | Biossorção | 2 h | Asma et al., 2006 |
| <i>Neurospora crassa</i> | Biomassa morta | Vermelho Ácido 57 | 0,1 g/L | 98,8% | Biossorção | 1 h | Akar et al., 2006 |
| <i>Trametes versicolor</i> | Biomassa morta | Azul direto 1 | 0,8 g/L | 95,2% | Biossorção | 6 h | Bayramoglu e Arica, 2007 |
| <i>Schizophyllum commune</i> | Tanque agitado | Laranja Ácido 7 | 0,1 g/L | 44,2% | Biossorção | 72 h | Renganathan et al., 2006 |
| | | Vermelho Ácido 18 | 0,1 g/L | 100,0% | | | |
| | | Preto Reativo 5 | 0,1 g/L | 100,0% | | | |
| <i>Funalia trogii</i> | Tanque agitado | Azul Reativo 19 | 0,1 g/L | >90% | Atividade de Laccase, MnP | 10 d | Park et al., 2007 |
| | | Azul Reativo 49 | 0,1 g/L | | | | |
| | | Violeta Ácido 43 | 0,1 g/L | | | | |
| | | Preto Reativo 5 | 0,1 g/L | | | | |
| | | Laranja Reativo 16 | 0,1 g/L | | | | |
| <i>Trametes hirsuta</i> | Tanque agitado | Azul Brilhante Remazol | 0,08 g/L | 92,2% | Biossorção e Biodegradação | 7 d | Zhang et al., 2007 |
| <i>Trametes trogii</i> | Tanque agitado | Azul Antraquinona | 0,08 g/L | 88,0% | Atividade de Lacase | 4 h | Levin et al., 2001 |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> | Tanque agitado | Preto Coracril | 0,08 g/L | 67,0% | Atividade de enzimas livres | 6 d | Chander e Arora, 2007 |
| | | Rosa Coracril | 0,08 g/L | 64,9% | | | |
| | | Vermelho Coracril | 0,08 g/L | 36,5% | | | |
| | | Reactive Orange | 0,08 g/L | 19,3% | | | |
| <i>Pleurotus sajor-caju</i> | Tanque agitado | Azul Reativo 220 | 0,05 g/L | 100,0% | Biodegradação e adsorção | 11 d | Munari et al., 2008 |
| | | Vermelho Reativo 198 | 0,05 g/L | 100,0% | | | |
| | | Amarelo Reativo 15 | 0,05 g/L | 100,0% | | | |
| <i>Ganoderma</i> sp. | Tanque | Laranja de | 0,03 g/L | 96,7% | Biodegradação | 3 d | Anastasi et |

| | | | | | | | |
|------------------------------------|-----------------|--|----------|-------|----------------------------|------|---------------------------|
| | agitado | Metila | | | | | al., 2011 |
| | | Cristal Violeta | 0,03 g/L | 75,0% | | | |
| | | Azul Bromofenól | 0,03 g/L | 90,0% | | | |
| | | Verde de Malaquíta | 0,03 g/L | 91,0% | | | |
| <i>Bjerkandera adusta</i> | Tanque agitado | Mistura de Amarelo Reativo 145, Vermelho Reativo 195, Azul Reativo 222 e Preto Reativo 5 | 1,25 g/L | 91,0% | Biossorção e Biodegradação | 10 d | Anastasi et al., 2011 |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | Tanque agitado | Laranja II | 0,1 g/L | 85,0% | Enzima MnP | 7 d | Sharma et al., 2009 |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | Tanque agitado | Violeta Direto 51 | 0,12 g/L | 84,0% | Enzima MnP | 5 d | Enayatizamir et al., 2010 |
| | | Preto Reativo 5 | 0,12 g/L | 90,0% | | | |
| | | Xilidina Ponceau | 0,12 g/L | 85,0% | | | |
| | | Marrom Bismark | 0,12 g/L | 86,8% | | | |
| <i>Trichosporon akiyoshidainum</i> | Tanque agitado | Azul Reativo 221 | 0,2 g/L | 65,0% | Biossorção e Biodegradação | 16 d | Pajot et al., 2011 |
| | | Vermelho Reativo 141 | 0,2 g/L | 98,0% | | | |
| | | Preto Reativo 5 | 0,2 g/L | 75,0% | | | |
| <i>Trametes hirsute</i> | Tambor rotativo | Laranja de Metila | 0,2 g/L | 81,4% | Lacase e MnP | 6 d | Couto et al., 2006 |
| | | Poly R-478 | 0,2 g/L | 46,9% | | | |

¹ Tambor rotativo – Reator rotacionado em tambor contendo os microrganismos e o efluente.

² Tanque agitado – Reator de tanque agitado por astes em movimento contínuo.

³ Biomassa morta – Aplicação de biomassa dos microrganismos visando tratamento.

Ainda pode-se destacar a utilização de processos de oxidação avançada, ozonação e outros métodos de degradação através de radicais hidroxila (HO•) e espécies transitórias oxidativas. Estes métodos são eficientes, porém podem ter custo elevado em comparação com métodos biológicos, entre tanto, podem ser utilizados em sistemas que visam tratamento de efluentes de difícil degradação biológica, ou que afetem negativamente o tratamento biológico (GHALY et al., 2014).

2.5.1 *Trametes cingulata* - potencial para biodegradação de corantes

Pertencente a Ordem filogenética Polyporales, esta espécie de fungo de podridão branca vem sendo estudada desde a década de 1960. *T. cingulata* é uma espécie de grande valor para a área ambiental, pois é uma excelente produtora de enzimas extracelulares como proteases, lacases e peroxidases, sendo relatadas adaptações metabólicas através de mecanismo complexos de reparação celular (MOHAN NAHA, 1960). A capacidade de produzir enzimas em sistemas de degradação de organopoluentes eleva o valor biotecnológico deste fungo (TEKERE et al., 2010). Além disto, a resistência destas enzimas a acidificação do meio gerada pelo metabolismo secundário de *T. cingulata* durante seu crescimento vegetativo, é um fato importante para bioprocessos no saneamento ambiental, pois as mudanças de pH do meio podem inibir a atividade de algumas enzimas. Em estudos *in vivo* de despolimerização e polimerização de lignina *kraft* utilizando *T. cingulata*, foi observado que há uma despolimerização significativa da lignina *kraft* logo na fase de crescimento primário do fungo (NUTSUBIDZE et al., 1998).

Alguns estudos de filogenética evolutiva concluem que o DNA mitocondrial deste fungo possui um clado políporo (agrupamento que inclui um ancestral comum e todos os descendentes) com espécies bastante importantes para usos industriais, como *Phanerochete chrisosporium*, *Moniliophthora perniciosa* e *Pleurotus ostreatus* (HARIDAS e GANTT, 2010).

Alguns trabalhos evidenciam o potencial deste gênero de fungos na degradação de compostos aromáticos complexos, como a lignina *kraft* (ORTH, ROYSE e TIEN, 1993; NUTSUBIDZE et al., 1998; KNEŽEVIĆ et al., 2013), corantes sintéticos (TEKERE et al., 2001; CHENG et al., 2013) e outros organopoluentes (TEKERE, READ e MATTIASSON, 2010). Dayaram e Dasgupta (2008), relataram a descoloração completa de Vermelho Congo e Preto Remazol (0,1 g/L) em 5 dias. No entanto ainda é escassa a literatura sobre o tratamento de corantes por fungos da espécie *T. cingulata*.

2.6 OBJETIVOS

2.7 Objetivos Gerais

Esta pesquisa teve como objetivo selecionar um basidiomiceto e realizar estudos de sua capacidade de descoloração do corante azo VR239 e produção de enzimas ligninolíticas.

2.8 Objetivos específicos

- Selecionar um fungo dentre 4 com potencial para biodegradação de corantes através de testes em meio sólido;
- Avaliar o fungo selecionado quanto a atividade de enzimas ligninolíticas, capacidade de descoloração em meio líquido;
- Identificar condições de suplementação de cultivo do fungo selecionado para otimização da atividade de enzimas ligninolíticas e capacidade de descoloração pelo isolado;
- Verificar a capacidade de descoloração do corante por extrato livre de enzimas extracelulares produzidas pelo fungo selecionado;
- Analisar a biossorção do corante a biomassa micelial do selecionado por FT-IR e MEV;
- Realizar análise do meio de cultura e controle contendo corantes por CLAE para identificação de possíveis metabólitos da biodegradação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

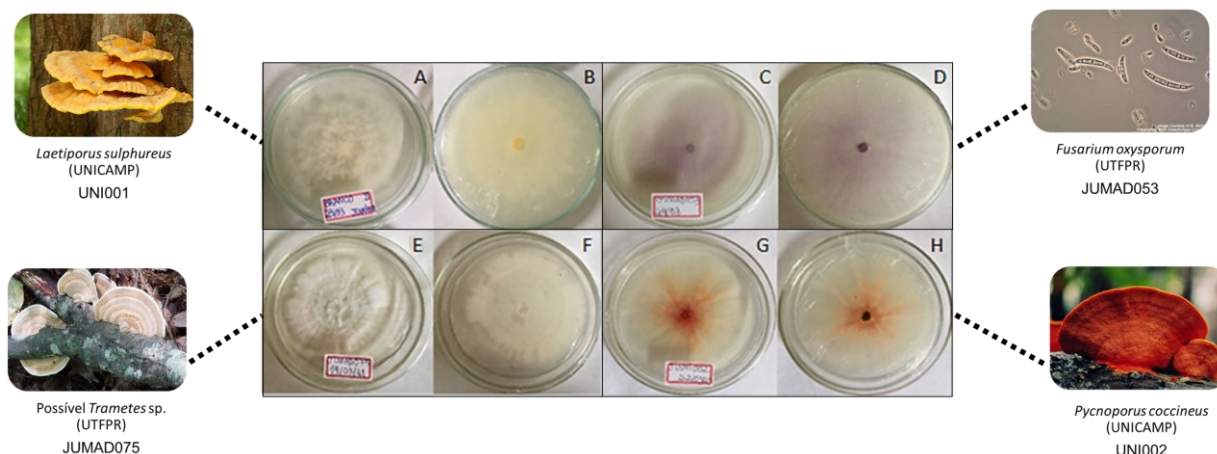
3.1 Corante sintético e reagentes utilizados

Os diversos reagentes utilizados são de propriedade da UTFPR e estão alocados sob a responsabilidade do Quimibio Lab (Laboratório de Química de Microorganismos e Bioatividade) (Bloco L, sala 001 - Campus Londrina). Os corantes obtidos para uso nesta pesquisa foram gentilmente doados pela empresa Golden Technology LTDA. É um corante da classe monoazo, identificado no Color Index® pelo código C.I.RR239 (CAS No. 89157-03-9).

3.2 Obtenção das cepas fúngicas

As cepas UNI001 (*Laetiporus sulphureus*) e UNI002 (*Pycnoporus coccineus*) foram identificadas e fornecidas por parceiros da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil (UNICAMP). A cepa JUMAD053 (*Fusarium oxysporum*), isolada de tronco de árvore em decomposição, foi identificada em pesquisas recentes e é pertencente à coleção microbiológica do Quimibio Lab (Figura 9) (SHIRAISHI, 2019).

Figura 9 - Cultivo das cepas em meio BDA: (A) UNI001 frente; (B) UNI001 verso; (C) JUMAD053 frente; (D) JUMAD053 verso; (E) JUMAD075 frente; (F) JUMAD075 verso; (G) UNI002 frente; (H) UNI002 verso



Fonte: Próprio autor

O basidiocarpo bastante desenvolvido de um fungo de podridão branca foi coletado em um quintal urbano na Região Leste de Londrina, Paraná (Brasil) nas coordenadas geográficas 23° 19' 32''S com 51° 07' 37''O aos 554 metros de altitude colonizando um tronco (25 cm Ø) de cedro (gênero *Cedrela* sp.) (Figura 10). A peça do basídio foi retirada com auxílio de uma lâmina de aço inoxidável e alocada em saco plástico hermeticamente fechado. Então, em câmara de fluxo laminar foi realizada assepsia externa da peça por imersão por 20 segundos em solução de hipoclorito de sódio 2%. Para isolamento, a amostra foi cortada ao meio com um bisturi estéril e retirado um fragmento interno do micélio estrutural e depositado sobre meio de cultivo BDA (Batata cozida: 20%, Dextrose: 2%, e Ágar: 2%), sendo realizada sucessiva purificação do cultivo até tornar-se axênico.

A cepa isolada e purificada foi denominada JUMAD075. Todas as cepas foram conservadas ativas em água destilada estéril, usando a técnica de Castellani (água destilada estéril) (URDANETA et al., 1965).

Figura 10 - Fotos do basidiocarpo do isolado JUMAD075



Fonte: Próprio autor

3.2.1 Identificação do fungo *Trametes cingulata* JUMAD075

A cepa fúngica foi pré-identificada usando a metodologia de Loguercio-Leite (1993), analisando aspectos macro e microscópicos básicos para caracterização morfológica. Foi observada a cor do basidioma, topografia da superfície e contagem de poros por mm (LOGUERCIO-LEITE, 1993). Para análise microscópica foi usado disco de micélio retirado da cultura isolada do fungo, realizado preparo das lâminas corando o micélio com violeta cristal, visando a identificação de himênios: basídios, basidiolas e basidiósporos, hifas generativas, hifas ligadoras e hifas esqueléticas.

Foi realizada comparação de sequências dos espaçadores internos transcritos 1 e 4 (ITS 1-4) para identificação da linhagem filogenética da espécie à nível molecular pela empresa Go Genetics, Brasil (MANTER e VIVANCO, 2007; WELTI et al., 2012).

3.3 Métodos de determinação da atividade enzimática

Foram realizados sistemas de incubação com substratos indicadores, cujas enzimas são sensíveis inferindo atividades de enzimas específicas. Todas as reações foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS (S60 Libra Biochrom) e realizadas sempre em duplicata. Foi feita a verificação paralela da absorbância dos controles da amostra (C1 = reações sem substrato indicador) e dos controles do substrato indicador (C2 = reações sem amostra). A leitura da absorbância das reações foi mantida sempre entre 300-700 nm, ou menor quando não diluído. A oxidação de um μmol de substrato indicador por minuto em um mililitro, a 25°C (U/mL) define uma unidade enzimática, sendo este valor obtido por leituras espectrofotométricas (NC-IUB, 1979).

Para os procedimentos utilizados, verifica-se a conversão do substrato indicador pelas enzimas (Lac, LiP e MnP), em condições fixas de pH e temperatura, assim, U/mL pode determinada a partir da Eq. 1 (SACCHETTO et al., 2018):

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{AT - (AC1 + AC2)}{\varepsilon} \times \frac{1}{V} \times Fd \times \frac{1}{t} \quad (1)$$

Onde:

U/mL: unidade enzimática por mL de solução de enzima;

AT: absorbância da reação;

AC1: absorbância de C1;

AC2: absorbância de C2;

t: tempo de incubação (em minutos);

V: volume de enzima empregado nos ensaios;

Fd: fator de diluição da solução enzimática quando necessário; e

ε : coeficiente de extinção molar do substrato.

3.3.1 Atividade de lacase (Lac)

A atividade de Lac foi determinada de acordo com a metodologia de Sacchetto e colaboradores (2011), utilizando como substrato indicador o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), o ABTS em sistema de incubação da tabela 5. Foi realizado procedimento em tubos de ensaio, adicionando 775 µL de água destilada, 50 µL do substrato ABTS (0,05 M), 150 µL de solução tampão citrato-fosfato pH 3 (0,25 M) e 25 µL de extrato bruto de enzimas totalizando 1000 µL totais. A solução será aquecida em banho-maria a 50°C por 5 minutos e, posteriormente, feita a leitura da absorbância a 420 nm ($\epsilon = 36.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (BOURBONNAIS; PAICE, 1990).

Tabela 5 - Sistema de incubação para determinação da atividade de Lac com ABTS

| | Reação 1 | Reação 2 | C1 | C2 |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------|-----------|
| Substrato ABTS | 50 µL | 50 µL | 0 µL | 50 µL |
| Tampão Citrato | 150 µL | 150 µL | 150 µL | 150 µL |
| Água (q.s.p.) | 775 µL | 775 µL | 825 µL | 800 µL |
| Enzima | 25 µL | 25 µL | 25 µL | 0 µL |

3.3.2 Atividade de Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade da enzima MnP foi determinada utilizando como substrato o sulfato de manganês (MnSO_4), de acordo com método de Wariishi, Valli e Gold (1992) adaptado (Tabela 6). O sistema de incubação foi composto por 200 µL de MnSO_4 (0,1 mM) em 1400 µL de tampão malonato (50 mM, pH 4,5), 200 µL mL de peróxido de hidrogênio 75 µM e 200 µL de extrato bruto. A formação do complexo de Mn (III)-malonato aconteceu a 40°C, por 5 min, realizada leitura da absorbância a 270 nm ($\epsilon = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Tabela 6 - Sistema de incubação para determinação da atividade de MnP com sulfato de manganês

| | Reação 1 | Reação 2 | C1 | C2 |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------|-----------|
| Substrato Sulfato de manganês | 200 µL | 200 µL | 0 µL | 200 µL |
| Tampão Malonato | 1400 µL | 1400 µL | 1600 µL | 1600 µL |
| H ₂ O ₂ | 200 µL | 200 µL | 200 µL | 200 µL |
| Enzima | 200 µL | 200 µL | 200 µL | 0 µL |

3.3.3 Atividade de Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade de LiP foi determinada pelo método de Tien e Kirk (1984) adaptado, através da oxidação do álcool veratrílico a veratrilaldeído (3,4 dimetoxibenzaldeído). O sistema de incubação para reação foi composto por 1700 µL de solução de álcool veratrílico (8,0 mM) em tampão tartarato (0,1M, pH 3,0), 100 µL de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e 200 µL de extrato bruto (Tabela 7). A reação aconteceu em banho maria a 30 °C e leitura por 310 nm ($\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Tabela 7 - Sistema de incubação para determinação da atividade de LiP com álcool veratrílico

| | Reação 1 | Reação 2 | C1 | C2 |
|--|-----------------|-----------------|-----------|-----------|
| Substrato álcool veratrílico em tampão tartarato | 1700 µL | 1700 µL | 1800 µL | 1800 µL |
| H ₂ O ₂ | 100 µL | 100 µL | 0 µL | 200 µL |
| Enzima | 200 µL | 200 µL | 200 µL | 0 µL |

3.4 Avaliação da descoloração dos corantes meio líquido

O corante VR239 foi utilizado para investigação da habilidade de descoloração pelo fungo selecionado em 25 mL de meio mínimo de VOGEL (1956) suplementado com 0,2 g/L do corante.

A investigação da descoloração do meio de cultivo contendo corante foi realizado de acordo com a metodologia de Huy e colaboradores (2020). Foi analisado por espectrofotometria em um espectrofotômetro UV-VIS (S60 Libra, da Biochrom) para a leitura em triplicata da absorbância do meio de cultura puro e sem diluições. Foi usado como base a absorbância máxima ($\lambda_{m\acute{a}x}$) do controle sem fungo para o VR239 (545 nm), descontando a absorbância do meio de cultivo como branco (sem corante ou fungo). Foi identificada a porcentagem de descoloração em relação ao controle abiótico através da Eq. 2.

$$Descoloração (\%) = \frac{(Absorbância\ inicial) - (Absorbância\ final)}{(Absorbância\ inicial)} \times 100\% \quad (2)$$

Para a identificação da concentração (g/L) de VR239, foi realizada a construção de curva padrão com cinco concentrações do corante (1:0,012; 2:0,014; 3:0,016; 4:0,018; e 5:0,02 g/L) e leitura da absorbância de cada ponto em espectrofotômetro UV-VIS (S60 Libra, da Biochrom) no comprimento de onda de 545 nm. Foi obtido coeficiente de determinação (R^2) de 99,77%, indicando que o modelo explica a variabilidade dos dados de resposta ao redor da média. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, a relação entre absorbância (A) e a concentração é linear crescente, definida pela Equação 3.

$$A = k'.c + b \quad (3)$$

Onde:

A = absorbância

k' = coeficiente de extinção k corrigido pelo caminho óptico (l) (constante);

c = concentração da solução;

b = fator de correção.

A Equação 4 é a equação da reta obtida pela curva de calibração:

$$y = 15,65x + 0,0261 \quad (4)$$

3.5 Seleção do microrganismo para estudo

3.5.1 Triagem em meio sólido

Foi realizada triagem em meio sólido visando selecionar um dentre quatro fungos testados quanto a produção de peroxidases e quanto a descoloração visual do corante (XU et al., 2015). Previamente, as cepas UNI001, UNI002, JUMAD053 e JUMAD075 foram reativadas por 10 dias em meio BDA em temperatura constante de 28°C e usadas para os testes.

O experimento em meio sólido foi realizado em triplicata para cada fungo, sendo mantidos em incubadora sob condições controladas de temperatura (28°C). As cepas reativadas foram inoculadas em meio BDA contendo 0,2 g/L do corante VR239, através da retirada de um disco (5 mm Ø) central do meio sólido e substituição por um disco (5 mm Ø) coberto por micélio dos fungos nos ensaios (meio + corante + fungo) e controle biótico (meio + fungo), com exceção do controle abiótico (meio + corante), onde não há inoculação.

A taxa de inibição foi verificada com Eq. 5 (TARIQ et al, 2010), através dos dados de acompanhamento do crescimento do diâmetro micelial, obtidos pela medida com régua em seis diferentes direções. Foram utilizados controles bióticos (apenas o fungo) e controles abióticos (sem o fungo) e realizado registro fotográfico dos tratamentos e testes de peroxidase total para exposição da comparação visual.

$$\text{Taxa de inibição} = \left(1 - \frac{\phi_{\text{micelial tratamento}}}{\phi_{\text{micelial controle}}}\right) \times 100 \quad (5)$$

O teste de peroxidases totais foi realizado com utilização do indicador guaiacol a 1% (m/v) em meio BDA em comparação aos controles sem guaiacol, podendo ser confirmada a atividade positiva através da observação de um halo marrom-avermelhado ao redor do micélio (XU et al., 2015).

3.5.2 Ensaio em meio líquido para avaliação do potencial de descoloração do fungo

O cultivo do microrganismo selecionado para o estudo, foi realizado através da reativação em placas de Petri contendo meio BDA durante 7 dias, a 28°C. Posteriormente, três discos (5 mm Ø) cobertos por micélio, foram transferidos para

frascos Erlenmeyer de 125 mL. Cada frasco continha 25 mL de meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), dextrose a 1% (m/v) adicionada após autoclavagem, extrato de levedura a 2% (m/v) e corante VR239 com concentração de 0,2 g/L. Os cultivos foram mantidos sob agitação a 180 rpm, 28°C, por três tempos diferentes (6, 9 e 12 dias). Após a interrupção e retirada dos frascos da incubadora nos tempos estabelecidos, seguiu-se para peneiramento (0,05 mm), recolhida a biomassa micelial fresca e realizada a pesagem em balança de precisão analítica, secagem e para obtenção da porcentagem de biomassa seca. O líquido percolado do peneiramento foi armazenado em tubos de plástico de 50 mL à 4°C até análise, todos foram previamente centrifugados à 6.000 rpm por 10 minutos. Foi colhido o sobrenadante e medido o potencial hidrogeniônico em peagâmetro digital previamente as análises.

Sob as mesmas condições, foi realizado ensaio com diferentes concentrações do corante VR239 (0,1, 1,05 e 2 g/L) em diferentes tempos de cultivo (6, 12 e 18 dias), para identificação da concentração ideal para máxima descoloração. As concentrações foram definidas de acordo com a metodologia de XU et al. (2015).

3.6 Otimização da atividade enzimática e descoloração – Delineamento Box-Behken e metodologia de superfície de resposta

A cepa JUMAD075 em estudo, foi reativada em meio BDA (20% Batata cozida, 2% de ágar e 1% de glicose) durante 10 dias, a 28° C. Então, três discos (5 mm Ø) cobertos por micélio do fungo foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio mínimo de Vogel com glicose 1% (m/v) adicionada após autoclavagem, e corante VR239 a 0,1 g/L. As condições variáveis foram as concentrações de extrato de levedura (3, 14 e 25 g/L), de sulfato de cobre (1, 1,75 e 2,5 g/L), mantidos em diferentes tempos (8, 16 e 24 dias). Os cultivos permaneceram a 28° C sob agitação a 180 rpm.

Variáveis independentes, X1, X2 e X3 codificadas respectivamente em três níveis apresentam-se em delineamento experimental Box-Behnken na tabela 8, definindo 15 ensaios realizados em três repetições das diferentes combinações de condições de cultivo. Foram analisadas quatro respostas Y1, Y2 e Y3, atividade de Lac (Item 4.3.1), descoloração (Item 4.4) e atividade de LiP (Item 4.3.3), respectivamente, e também atividade de MnP (Item 4.3.2). Para análise de variância

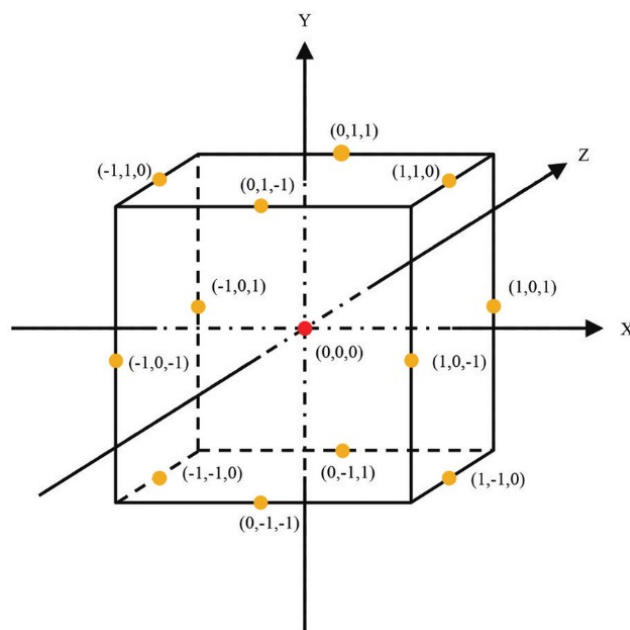
(ANOVA), análise de superfície de resposta e plotagem de gráfico de Pareto foi utilizado o software Statistica 9.0.

Tabela 8 - Delineamento experimental Box-Behken para três fatores em três níveis

| Ensaio | Fatores | | |
|--|----------------|----------------|----------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ |
| 1 | -1 | -1 | 0 |
| 2 | 1 | -1 | 0 |
| 3 | -1 | 1 | 0 |
| 4 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | -1 | 0 | -1 |
| 6 | 1 | 0 | -1 |
| 7 | -1 | 0 | 1 |
| 8 | 1 | 0 | 1 |
| 9 | 0 | -1 | -1 |
| 10 | 0 | 1 | -1 |
| 11 | 0 | -1 | 1 |
| 12 | 0 | 1 | 1 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| Fatores | Valores reais | | |
| | -1 | 0 | -1 |
| X ₁ = tempo (dias) | 8 | 16 | 24 |
| X ₂ = sulfato de cobre (g/L) | 1 | 1,75 | 2,5 |
| X ₃ = extrato de levedura (g/L) | 3 | 14 | 25 |

Com o intuito de maximizar a otimização, as respostas foram analisadas de maneira conjunta com base na associação de efeitos lineares, quadráticos e interações binárias entre as variáveis sobre as respostas (Figura 9).

Figura 9 - Distribuição dos pontos experimentais no delineamento experimental Box-Behken para três fatores em três níveis



Fonte: Fang et al. (2021)

Os ensaios foram acondicionados e analisados de acordo com processo descrito no item 4.5.2. Além disso, a parte líquida e sólida de todos os ensaios foram submetidas a análise de FT-IR e de % de massa seca (item 4.8) e a parte líquida a análise de CLAE (item 4,.7).

3.7 Análises por CLAE

As amostras obtidas dos cultivos foram centrifugados e extraídos com 25 mL de diclorometano contra 25 mL de amostra (1:1) e separados em funil de separação de 125mL, evaporado solvente em evaporador rotativo e secos em temperatura ambiente. Em seguida foram ressuspensas em diluente composto por 250 μ L de água ultrapura e 750 μ L de metanol (1:3), mantidos em sonicador por 20 segundos e filtrado em filtros de membrana (porosidade de 0,45 μ m) acoplados a seringa e por fim, realizada diluição de 250 μ L do filtrado em 750 μ L do mesmo diluente (1:3) e acomodados em frasco (Vail) para análise.

Amostras foram analisadas no Departamento de Química da UTFPR utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um equipamento UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific), e interpretado em software Chromeleon

7.2. Foi utilizada coluna cromatográfica C18 Phenomenex de fase reversa, com dimensões internas de 250 x 4,6 mm. A injeção da amostra foi de 5 µL, no tempo de corrida de 20 min ao fluxo de 0,25mL/min, sem controle da temperatura e o eluente foi monitorado no comprimento de onda 254nm. A fase móvel consistiu em uma parte de água ultra pura contendo ácido tricloroacético (TFA) a 0,1% e três partes de metanol em uma proporção 1:3.

Não foram utilizados padrões analíticos, para quantificar compostos, porém os cromatogramas foram utilizados para análise de possíveis separações entre picos, bem como, diferenças entre os meios tratados biologicamente e controles não tratados.

3.8 Análise da bioadsorção do corante ao micélio

3.8.1 Preparação da biomassa para FTIR

Após o procedimento de otimização descrito na seção 4.6, a parte líquida do meio de cultivo foi separada da biomassa micelial em suspensão dos ensaios em uma peneira de aço inoxidável (0,5mm) (NO, acomodada em placa de petri, pesada fresca em balança de precisão, desidratada em estufa à temperatura de 45°C por 24h e por fim pesada novamente (NOURI et al., 2021). A obtenção da porcentagem de massa seca (MS%) das amostras foi dada através da equação 6. As amostras de biomassa seca obtidas foram congeladas a -20°C por 24h e então submetidas a secagem por sublimação em um liofilizador de bancada Alpha 1-2 LDplusa (Martin Christ), trituradas em cadinho e mantidas em temperatura ambiente sob abrigo da luz até análise de FT-IR.

$$\% \text{ Massa seca} = (MF - MS) / MS \times 100 \quad (6)$$

A parte líquida obtida do procedimento de filtração descrito acima foi acomodada em tubos de 50mL armazenada à 4 °C e utilizadas nas demais análises.

3.8.2 Caracterização dos grupos funcionais do corante e controles por FTIR

A presença de grupos funcionais do corante RR239 adsorvidos a biomassa micelial do fungo antes e após o tratamento foram identificados através de análise

por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de acordo com a metodologia descrita por Nouri et al. (2021). As amostras foram tratadas e liofilizadas conforme descrito por Mota e colaboradores (2015). Para a análise, pellets compostos de mistura da amostra com brometo de potássio (1:20; 0,02 g de amostra e 0,4 g de KBr) foram preparados a uma pressão de 1 Mpa. Pellets confeccionados foram levados a leitura para obtenção das bandas de transmitância na região entre 400 e 4000 cm^{-1} em um espectrômetro FT-IR Spectrum Two (Perkin-Elmer) (Figura 10). As análises foram realizadas em triplicata, sempre descontando o espectro do KBr puro da amostra. Os espectros obtidos graficamente pelo software Spectrum (Perkin-Elmer) foram interpretados de acordo com a chave de Lopes e Facio (2004) e material disponibilizado pela indústria química Merck.

Figura 10 - Espectrômetro FT-IR Spectrum Two (Perkin-Elmer)



Fonte: Website Perkin-Elmer

3.8.3 Análise micrográfica por microscopia eletrônica de varredura

A biomassa do fungo *T. cingulata* JUMAD075 *in natura* após o tratamento do corante e o controle sem corante foi deixada de molho em solução salina por 24h. Para caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a amostra foi previamente fixado com 2,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,2) a 4°C por 12h. A amostra foi delicadamente lavada com tampão fosfato-sódio por 1 h, e levada a desidratação gradual em etanol (70, 80, 90 e 100%), então seca ao ponto crítico (CPD 030 Critical Point BALTEC Dryer, Leica Microsystems, Liechtenstein). Após a secagem, as amostras foram coladas em *stubs* usando fita de carbono e revestidas com camada fina de ouro sob pressão (Revestidor de Pulverização BALTEC SDC 050, Leica Microsystems, Liechtenstein). A biomassa

micelial foi observada e comparada entre controle (sem corante) e tratamento (com 0,1g/L de corante VR239) em equipamento de MEV (VEGA 4^o generation, software Essence™, TESCAN).

3.9 Ensaio descoloração com concentrado de enzimas

Os cultivos para produção de enzimas foram desenvolvidos de acordo com a metodologia de Vasconcelos e colaboradores (2000) adaptada. Em 9 frascos de 125 mL, contendo 25 mL de meio mínimo de Vogel com concentrações de glicose a 1% (m/v), 2,5 g/L de sulfato de cobre, 8,5 g/L de extrato de levedura foram compostos os meios de cultivo. A cepa JUMAD075 foi reativada em meio BDA por 10 dias, a 28°C e então inoculados três discos (5 mm Ø) totalmente cobertos por micélio em cada frasco de cultivo para produção de enzimas mantidos por 12 dias em incubadora sob agitação de 180 rpm e temperatura de 28°C. Os cultivos, então, foram interrompidos e peneirados e o conteúdo líquido de cada frasco foi coletado em banho de gelo. O conteúdo líquido foi acondicionado em saco de papel celofane para processo de dialise contra água ultrapura a em geladeira a 4°C e agitação de 80 rpm por 48h, renovando a totalidade da água ultrapura cada 6 horas. A solução de enzimas separadas por dialise foi congelada a -20°C e então, seca por sublimação através de liofilização e depositada em frasco único e pesada. As enzimas foram ressuspensas em tampão citrato (pH 3) em concentração de 1% (m/v) e mantidas a 4°C até início do ensaio (cerca de 3 h) obtendo assim o concentrado enzimático (CE).

Tabela 9 - Composição do sistema de descoloração com CE

| Componente | Volume |
|----------------------------------|---------------|
| Concentrado enzimático (CE) (1%) | 0,2 mL |
| Tampão citrato pH 6,5 | 2,0 mL |
| Solução de corante (0,1%) | 1,0 mL |
| Água ultra pura | 6,8 mL |

Tabela 10 - Composição do sistema para controle e comparação com CE

| Componente | Volume |
|---------------------------|---------------|
| Tampão citrato pH 6,5 | 2,0 mL |
| Solução de corante (0,1%) | 1,0 mL |
| Água ultra pura | 7,0 mL |

O ensaio de descoloração com CE foi conduzido em 4 repetições em frascos de 125 mL contendo 25 mL de solução aquosa do corante VR239 a 0,1 g/L (m/v) e 1% (m/v) de solução de enzimas por 24h dias. O ensaio foi analisado quanto a descoloração (item 4.4) com leitura da absorbância inicial e final ($\lambda=545$ nm) e atividade de enzimas peroxidases (Lac, MnP e LiP) (item 4.3). A composição do sistema de biodegradação/descoloração com CE extraído do microrganismo *Trametes cingulata* JUMAD075 está detalhada na tabela 10, bem como o controle na tabela 11.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do isolado JUMAD075

4.1.1 Caracterização morfológica

O basidiocarpo é pileado, dimidiado e flabeliforme levemente concavo, fusionado lateralmente com outro basídio lateral, com cerca de 6,5 cm de largura por 12 cm de comprimento, com 14 mm de espessura próxima da base, consistência flexível. Superfície superior do basídio (Figura 11 A) levemente estrigosa, zonada de forma concêntrica, com cores levemente amarelas e amarelo pálido, castanho, com margens delgadas com ondulações. Basídios mais velhos apresentam coloração castanho escura evidenciados poros angulares de 1-3 por mm² (Figura 11 D). De acordo com Loguercio-Leite (1993), as características do basidiocarpo identificado se enquadram no gênero *Trametes* sp..

Figura 11 - Observação morfológica das características macroscópicas do isolado *T. cingulata* JUMAD075: Face superior basidiocarpo (A); Face inferior basidiocarpo (B); Inserção dos basidiocarpos no substrato de origem (C); Composição dos poros (D)

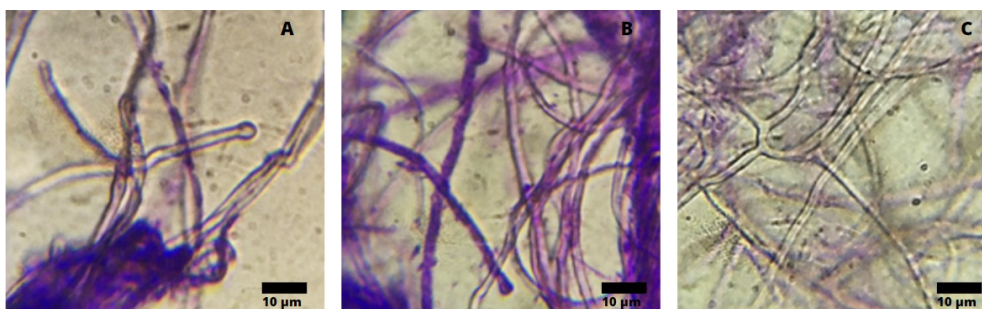


O substrato lenhoso onde o fungo encontrava-se fixado, apresentava características do gênero *Cedrella* sp. (árvores conhecidas popularmente como cedros) sendo este um gênero tropical de densidade do lenho média de 0,41 g/cm³, comumente preferíveis por fungos de podridão branca, como pode ser observado

efeito de indução da produção de Lac em pesquisas recentes (BERTRAND et al., 2014; FERNANDES, VALLE e CALDERON, 2017). Muitas espécies de árvores naturalmente produzem substâncias antifúngicas, no entanto os fungos degradadores de madeira possuem mecanismos de tolerância e resistência a estas substâncias e evoluíram para realizar a digestão extracelular (YU et al., 2008).

As hifas ligadoras (Figura 12 C) foram identificadas e realizada a identificação taxonômica segundo a chave proposta por Loguercio-Leite (1993). O sistema hifal foi identificado como trimítico, com hifas generativas (Figura 12 A) de paredes delgadas e hialinas, hifas esqueléticas (Figura 12 B) predominantes hialinas e de paredes mais grossas e sólidas. Ausência de cistídios e elementos himeniais, também não identificados. Basidióporos oblongos à cilíndricos, ligeiramente curvados, paredes delgadas, lisas de cerca de 3 µm, inamilóides e indextrinoides.

Figura 12 - Imagens de análise de microscopia óptica e identificação de hifas generativas (A), hifas esqueléticas (B) e hifas ligadoras (C)



A análise microscopia óptica da cepa se deu pela fixação e tingimento da massa micelial de um cultivo de 7 dias. Uma alíquota do micélio foi delicadamente colhida com pinça e depositada em placa de vidro, lavada com solução salina e mergulhada em solução de corante cristal violeta por 10 segundos, em seguida depositada em lâmina de vidro, recoberta por lamínula e lavada pela lateral com água destilada.

4.1.2 Caracterização molecular

A identificação molecular do fungo foi realizada pelo serviço terceirizado da empresa Go Genéticos de Curitiba. Foram analisadas as regiões ITS1 e ITS2 visando a identificação filogenética do isolado fúngico. O fungo foi identificado com 99% de

confiabilidade como *Tametes cingulata*. A árvore filogenética foi obtida pelo software MEGA 11.

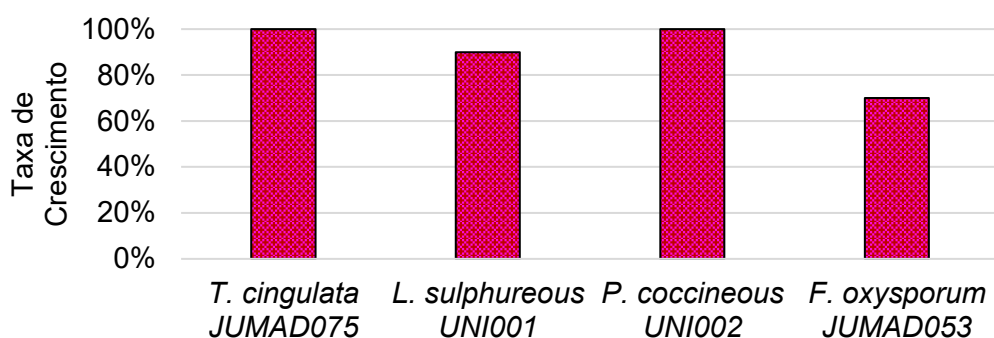
A identificação de fungos de podridão branca, como *T. cingula* JUMAD075, com elevado potencial de ligninolítico evidencia a grande diversidade de microrganismos fúngicos disponíveis que podem ser explorados pela indústria de saneamento de corantes sintéticos oriundos da Floresta Atlântica brasileira e áreas remanescentes ou sobrepostas por centros urbanos (LYRA et al., 2009). O trabalho realizado por Cruz-Morató (2013) evidenciou a presença de fungos de podridão branca (em especial *Trametes versicolor*) dentro do ambiente urbano, e seu elevado potencial para o tratamento de águas residuais contendo moléculas polifenólicas complexas.

4.2 Seleção do microrganismo para estudo

4.2.1 Testes em meio sólido

O microrganismo *T. cingulata* JUMAD075 foi selecionado dentre outros três testados em meio sólido (*L. sulfureous* UNI001, *P. sanguineus* UNI002, *F. oxysporum* JUMAD053). No teste de crescimento micelial ao longo de 6 dias houve crescimento abundante do micélio em meio sólido contendo 0,6 g/L de corantes azo. O crescimento dos fungos *T. cingulata* JUMAD075 e *P. sanguineus* UNI002 não se alterou ao longo dos dias, no entanto, os fungos *L. sulphureous* UNI001 e *F. oxysporum* JUMAD053 sofreram, respectivamente redução de crescimento de 10% e 7% em meio contendo o corante VR239 em comparação com controle sem corante (Figura 13).

Figura 13 - Taxas médias de inibição do crescimento micelial pelo corante VR239 das cepas estudadas

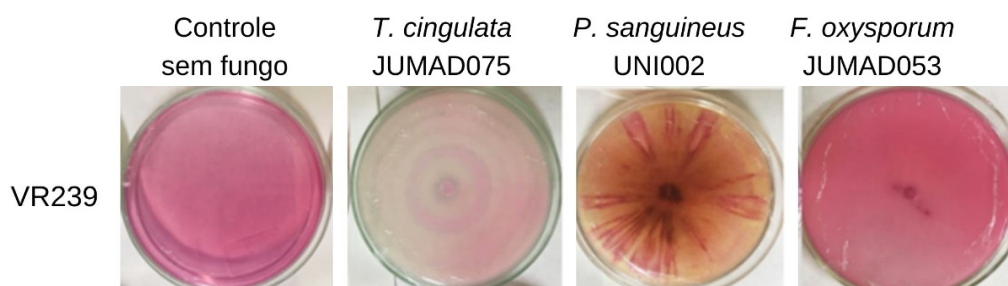


Comparando com a pesquisa realizada por Bibi & Asgher (2011), a inibição do crescimento de *P. chrisosporium* pelo corante verde de malaquita ocorreu em concentrações de 0,5 g/L, o que indica uma baixa toxicidade do corante VR239 em comparação ao corante verde de malaquita, bastante tóxico para bactérias e fungos (PAPINUTTI e FORCHIASSIN; 2004). A CL₅₀ do corante VR239 para o peixe-zebra foi de 1,5 g/L (JUNGTANASOMBUT et al., 2014) a inibição de até 10 % do crescimento micelial para concentração de 0,6 g/L deste corante azo, reforça a resistência de fungos na presença de compostos tóxicos. Como pode ser observado na pesquisa de Jebapriya e Gnanadoss (2013), que relataram desenvolvimento de fungos de podridão branca na presença de alguns corantes azo reativos, como o VR239.

Além do crescimento micelial, as características do desenvolvimento do micélio em meio sólido contendo 0,6 g/L de corante foram analisadas quanto a descoloração visual ao longo de 6 dias, com as cepas *P. sanguineus* UNI002, *F. oxysporum* JUMAD053 e *T. cingulata* JUMAD075 apresentando resultado positivo para descoloração (Figura 16). É conhecida a capacidade destas espécies em descolorir outros corantes azo (POINTING e VRIJMOED, 2000; GAJERA et al., 2015; DAYARAM e DASGUPTA; 2008), bem como a relação entre a descoloração e a sua elevada atividade de enzimas oxidativas.

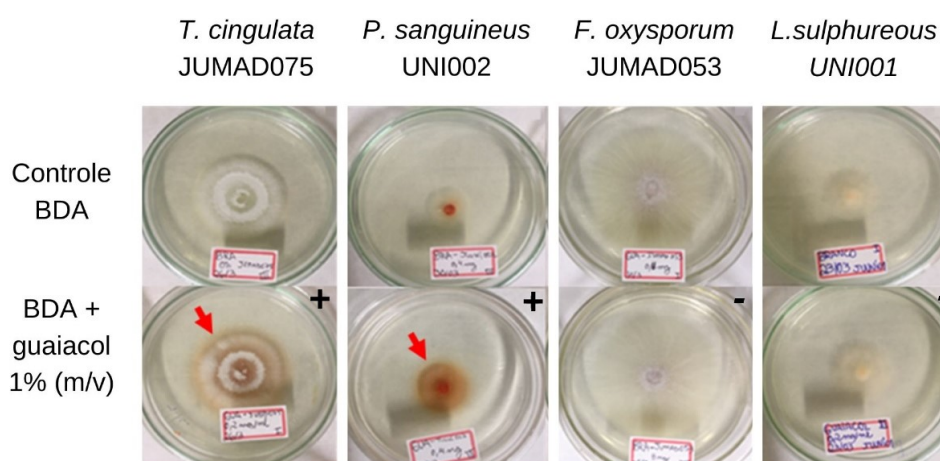
Pôde ser observado na Figura 16 que o microrganismo que obteve maior área e tonalidade de descoloração em comparação com o controle foi a cepa *T. cingulata* JUMAD075.

Figura 16 - Ensaio de descoloração em meio sólido para o corante VR239 para três cepas testadas e controle



O teste de oxidação do guaiacol é uma forma rápida de averiguar a presença de enzimas oxidativas, devido a sensibilidade deste composto a oxidação a tetraguaiacol, formando um halo marrom avermelhado no micélio quando positivo (VISWANATH et al, 2008). Neste sentido, o teste de oxidação do guaiacol 1% (m/v), foi positivo para as cepas *P. sanguineus* UNI002 e *T. cingulata* JUMAD075 (Figura 17). Este resultado pode ser observado para *P. sanguineus* (DANTÁN-GONZÁLEZ, 2008) e *T. cingulata* (NYANHONGO et al, 2007) em pesquisas realizadas anteriormente.

Figura 17 - Teste de oxidação do guaiacol para quatro cepas e formação de halo marrom avermelhado para positivo (+) e ausência de halo marrom avermelhado para negativo (-)



Desta forma foi tomado como critério para seleção da cepa *T. cingulata* JUMAD075 a ausência de inibição do crescimento micelial pelos corantes testados, destaque na descoloração visual dos corantes dentre os demais microrganismos e teste de oxidação do guaiacol positivo.

4.2.2 Ensaio preliminares em meio líquido com o microrganismo selecionado *T. cingulata* JUMAD075

A cepa *T. cingulata* JUMAD075 foi submetida a ensaio em meio líquido ao longo de 12 dias para investigação do potencial de descoloração dos corantes VR239 e AR145 na concentração de 0,2 g/L, produção de lacase e peso da matéria seca do micélio. Foi possível observar um efeito de descoloração de 40% e 50%

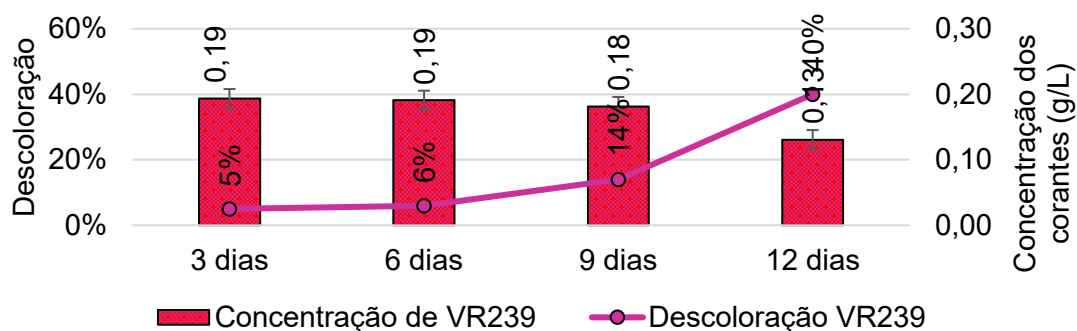
respectivamente para o corante VR239 e AR145 em 12 dias (Tabela 12). Através da Lei de Lambert & Beer (SWINEHART, 1962) foi possível utilizar a curva padrão realizada para identificar os valores de concentração em g/L, sendo observado decaimento de 0,07 g/L do corante VR239 em 12 dias em relação a concentração inicial (0,2 g/L). A concentração inicial de corante livre nos ensaios com a cepa *T. cingulata* JUMAD075 diminuiu em comparação ao controle ao longo dos dias do experimento (Figura 15). Este fato mostra a capacidade do fungo *T. cingulata* JUMAD075 em descolorir os corantes testados em meio líquido com agitação de 180 rpm e a 28°C.

Tabela 11 - Descoloração e concentração ao longo de 12 dias para os corantes VR239 com concentração inicial de 0,2 g/L

| | 3 dias | 6 dias | 9 dias | 12 dias |
|------------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| Descoloração VR239 | 5% | 6% | 14% | 40% |
| Concentração de VR239 (g/L) | 0,19 | 0,19 | 0,18 | 0,13 |
| Controle VR239 (g/L) | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| Decaimento VR239 (g/L) | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,07 |

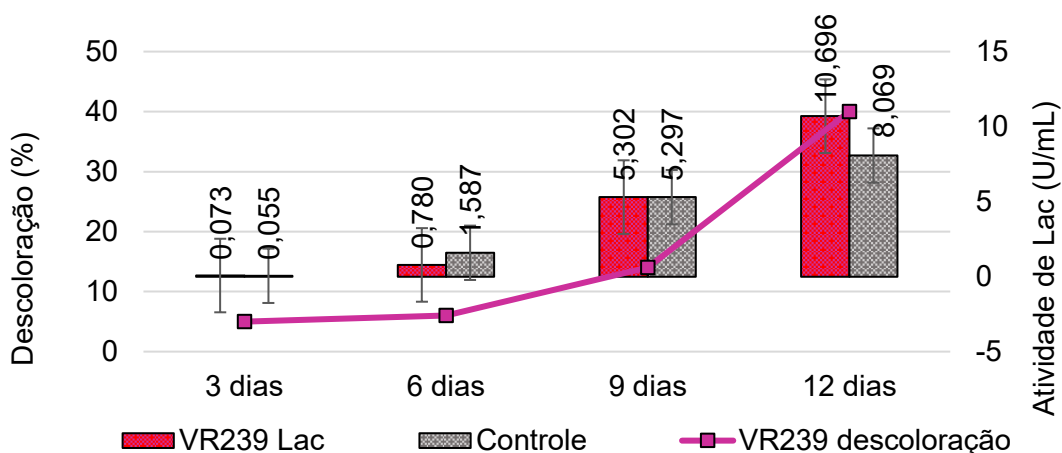
A concentração de 0,2 g/L utilizada no presente estudo não impediu o desenvolvimento do fungo *T. cingulata* JUMAD075, gerando efeitos esperados de descoloração do meio. Entretanto, comparativamente a concentração do corante azo verde de malaquita (0,5 g/L) para o fungo *P. chrisosporium* testado por Bibi e Asgher (2011), inibiu os efeitos de descoloração do fungo. Outro trabalho de descoloração de corantes têxteis por *T. cingulata*, realizado por Dayaram e Dasgupta (2008), testou diversos corantes em diversas concentrações de 0,1 a 1 g/L. No caso dos corantes azo reativos, como Laranja Reativo, Preto Remazol e Azul Reativo na concentração de 0,1 g/L, a cor remanescente nos tratamentos, também esteve entre 40 e 50 %, bem como foi observado no ensaio realizado com a cepa *T. cingulata* JUMAD075 com o corante azo VR239 a 0,2 g/L.

Figura 14 - Porcentagem de descoloração e decaimento da concentração (g/L) de corante VR239 nos ensaios realizados ao longo de 12 dias



A atividade de Lac nos quatro tempos testados foi crescente, observando-se uma maior atividade aos 12 dias de cultivo, com máximo de 10,7 U/mL para o teste contendo corante VR239 (0,2 g/L), ambos resultados superiores ao controle sem corante. Também, foi possível observar o crescimento concomitante da descoloração e da atividade de Lac em ambos corantes testados (Figura 17). A expressão de Lac pode ser influenciada por diversos parâmetros, incluindo fonte de nitrogênio, limitações de carbono e tipos de cultivo (NILADEVI e PREMA, 2008). No entanto, culturas de *Trametes versicolor* já demonstraram que a presença de compostos xenobióticos como a xilidina e a lignina podem estimular a expressão de lacases (BOLLAG e LEONOWICZ, 1984). Neste caso, ainda em comparação com o estudo de Dayaram e Dasgupta (2008), a atividade de lacase da cepa de *T. cingulata* estudada, também foi similar, sendo obtida atividade máxima de Lac de 11,5 U/mL.

Figura 15 - Relação da atividade da de Lac e descoloração pela cepa *T. cingulata* JUMAD075 na presença do corante VR239 e controle sem corante em diferentes tempos de cultivo



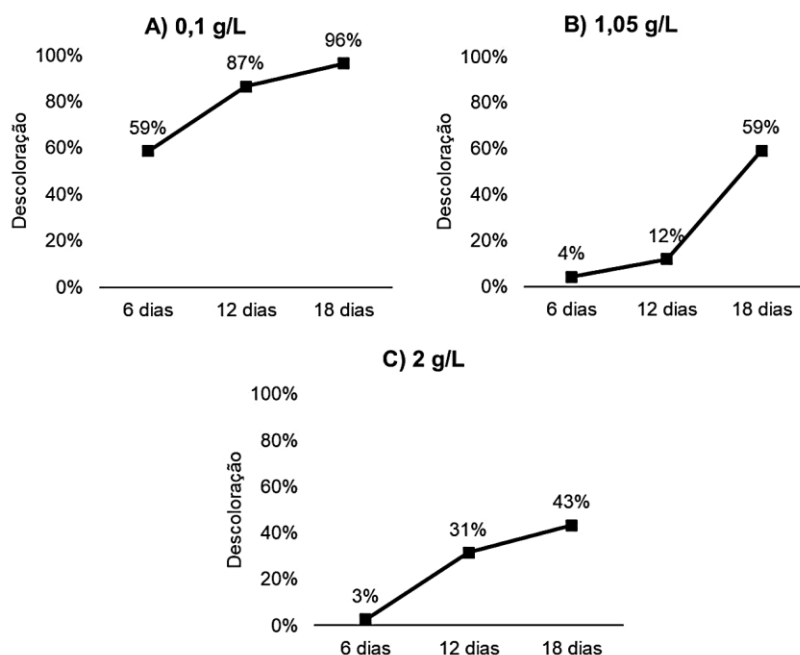
Quanto as mudanças de pH do meio de cultivo contendo o corante VR239, foi observada acidificação de em média 1,1 graus entre 3 e 12 dias de cultivo (Tabela 14). Esta diminuição observada do pH pode ser atribuída à produção de ácidos orgânicos durante o metabolismo secundário do fungo (KUHAD, SINGH & ERIKSSON, 2006). O fungo *T. cingulata* obteve melhores resultados de descoloração em condições mais ácidas de pH (de 6,0 a 4,5) em outros estudos com corantes azo (TEKERE et al., 2001).

Tabela 12 - Média do pH dos meios de cultivo contendo corantes azo e controle abiótico ao longo de 12 dias

| | 3 dias | 6 dias | 9 dias | 12 dias |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| pH VR239 | 7,0 | 6,4 | 6,1 | 6,1 |
| Controle sem corante | 7,2 | 6,4 | 6,2 | 6,0 |

A habilidade de descoloração da cepa *T. cingulata* JUMAD075 frente três diferentes concentrações do corante VR239 (0,1, 1,05 e 2 g/L) em três diferentes tempos (6, 12 e 18 dias), foi testada em um experimento paralelo com intuito de identificar a concentração indicada para iniciar-se a otimização das condições de cultivo (sessão 5.3). Os resultados estão apresentados graficamente abaixo (Figura 16). Pode-se observar que na concentração de 0,1 g/L o fungo obteve maiores porcentagens de descoloração do corante em relação a controle, chegando a 96% em 18 dias de cultivo em meio líquido agitado (180 rpm e 25°C), enquanto no mesmo tempo decorrido a concentração de 2 g/L obteve apenas 43%.

Figura 16 - Descoloração em três diferentes tempos em relação a diferentes concentrações do corante VR239



A concentração do corante no meio influencia diretamente o fator decoloração, sendo está uma relação inversamente proporcional (SI et al., 2011). É esperado neste caso que quanto mais alta a concentração do corante no meio, menor seja sua taxa de decoloração em relação ao controle. Deste modo, foi determinado que a concentração de 0,1 g/L (A) deu melhores condições para decoloração do corante VR239 pela cepa *T. cingulata* JUMAD075, sendo esta escolhida para ser fixada no experimento de otimização devido a maior porcentagem de decoloração obtida no experimento realizado.

4.3 Otimização das condições de cultivo para três fatores

A otimização da atividade das enzimas Lac (Y1) e LiP (Y3), concomitante à decoloração (Y2), foi realizada com base nos dados obtidos em gráficos de Pareto e metodologia de superfície de resposta, com base na influência das variáveis tempo (X₁), concentração de sulfato de cobre (X₂) e concentração de extrato de levedura (X₃). O corante escolhido para dar sequência ao experimento de otimização foi o VR239 com a concentração de 0,1 g/L.

Tabela 13 - Delineamento experimental Box-Behken para três fatores em três níveis e respostas obtidas com respectivos desvios padrão

| Ensaio | Fatores | | | Respostas | | |
|---|----------------|----------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Atividade Lac ¹ (Y1) | Descoloração ² (Y2) | Atividade LiP ¹ (Y3) |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 4,022 ± 0,286 | 68 ± 6,28 | 0,000 ± 0,000 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 11,583 ± 1,155 | 66 ± 3,12 | 0,002 ± 0,000 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 8,708 ± 0,665 | 96 ± 0,41 | 0,033 ± 0,003 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 9,975 ± 0,343 | 80 ± 0,14 | 0,005 ± 0,001 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 8,221 ± 0,657 | 94 ± 5,00 | 0,005 ± 0,001 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 6,759 ± 0,758 | 60 ± 0,22 | 0,001 ± 0,001 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 1,607 ± 0,281 | 47 ± 5,06 | 0,000 ± 0,000 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 9,929 ± 0,830 | 43 ± 2,27 | 0,012 ± 0,002 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 8,418 ± 0,499 | 79 ± 5,22 | 0,029 ± 0,002 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 7,723 ± 0,398 | 100 ± 0,43 | 0,013 ± 0,001 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 8,281 ± 0,263 | 53 ± 3,69 | 0,029 ± 0,002 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 12,447 ± 0,498 | 57 ± 5,62 | 0,014 ± 0,001 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 11,183 ± 0,828 | 66 ± 3,22 | 0,021 ± 0,002 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 11,044 ± 0,650 | 63 ± 2,67 | 0,022 ± 0,002 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 9,691 ± 0,520 | 78 ± 0,14 | 0,020 ± 0,001 |
| Fatores | Valores reais | | | | | |
| | -1 | 0 | 1 | | | |
| X ₁ = tempo (dias) | 8 | 16 | 24 | | | |
| X ₂ = sulfato de cobre ³ | 1 | 1,75 | 2,5 | | | |
| X ₃ = extrato de levedura ³ | 3 | 14 | 25 | | | |

¹ Expresso em U/mL; ² Expresso em %; ³ Expresso em g/L

Os dados obtidos deste planejamento fatorial (Tabela 13), foram ajustados pelo modelo quadrático com interações lineares, no software Statistica 9.0, apresentando coeficiente de correlação (R^2) de 0,90262 para o fator atividade da Lac (Y1), 0,93957 para o fator descoloração (Y2), e 0,96107 para o fator atividade de LiP (Y3). É possível neste sentido, obter as informações de condições ideais de suplementação de sulfato de cobre e extrato de levedura, além do tempo de cultivo para maximização da atividade das três respostas combinadamente. As análises de variância indicaram que os modelos foram significativos num nível de 5% de confiança, pois os termos F calculados foram maiores que os valores de F tabelados para os graus de liberdade de cada modelo definido.

Através da análise dos gráficos de superfície de resposta obtidos para determinação das três respostas ótimas em relação aos fatores testados, o resultado para máxima atividade de Lac (12,447 U/mL) foi obtida no ensaio de nº 12, sob as seguintes condições: 2,5 g/L de sulfato de cobre, 25 g/L de extrato de levedura e 16 dias de cultivo. Para a máxima atividade de LiP (0,033 U/mL) obtida no ensaio nº 3,

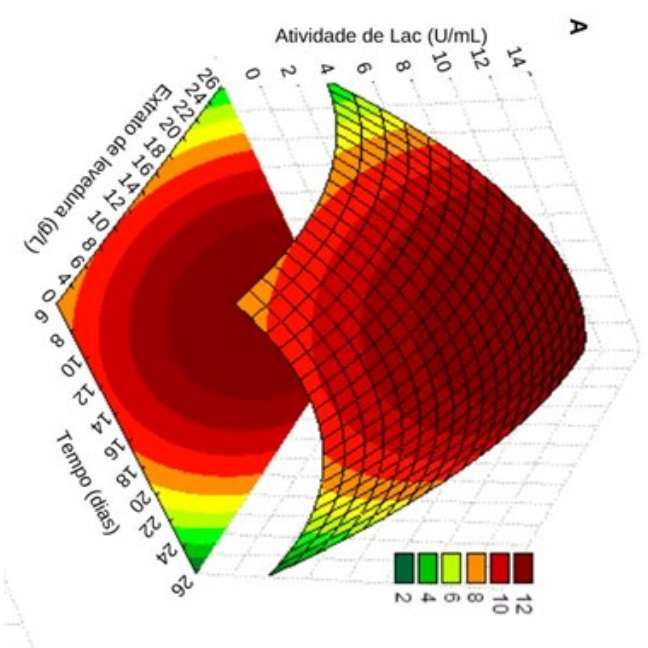
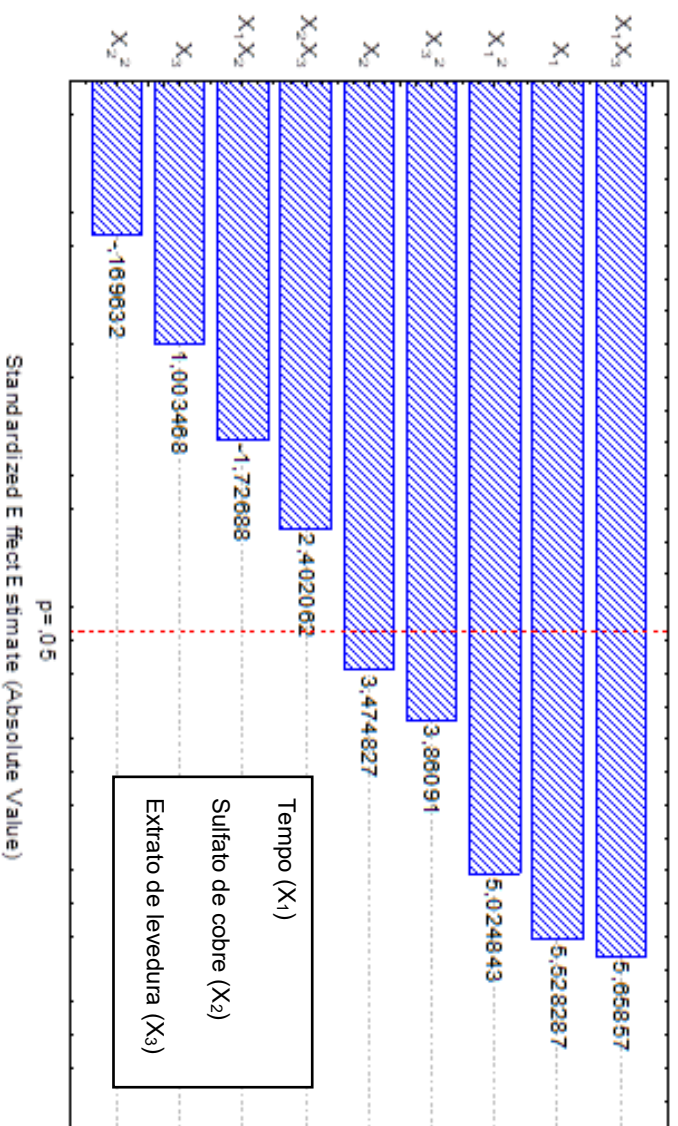
as condições foram: 2,5 g/L de sulfato de cobre 14 g/L de extrato de levedura e 8 dias de cultivo. E para a resposta máxima de descoloração o ensaio nº 10 obteve a melhor média ($100\% \pm 0,43\%$) sob as seguintes condições: 2,5 g/L de sulfato de cobre 3 g/L de extrato de levedura e 16 dias de cultivo.

A partir dos resultados apresentados no gráfico de Pareto para a atividade de Lac (Y1) (Figura 17) foi possível observar que os fatores que exerceram maior efeito para esta resposta foi a interação entre tempo e extrato de levedura ($X_1X_3 = 5,658$). No gráfico x os efeitos de maior relevância estão ordenados de forma decrescente, sendo a linha de divisão vermelha ($p = 0,05$) utilizada para representar fatores que resultam em efeitos significativos na produção desta enzima, sendo efeitos lineares apresentados como X_n e X_nX_m (quando há interação entre duas variáveis) e X_n (variável isolada), e os efeitos quadráticos representados por X_n^2 .

Neste caso, dentre as interações relevantes, a variável menos importante para a atividade de Lac (Y1), foi a concentração de sulfato de cobre ($X_2 = 3,475$) e a mais relevante a interação entre tempo e concentração de extrato de levedura ($X_1X_3 = 5,658$). No entanto, a variável concentração de sulfato de cobre (X_2) foi fixada com valor máximo, devido a seu efeito positivo observado em outros trabalhos (LEVIN, HERRMANN e PAPINUTTI, 2008), e sua comprovada atividade na catalise oxidativa de compostos (SALEM, 2000; YE et al., 2021). A tecnologia baseada no radical sulfato ($SO_4^{\bullet-}$) vem sendo bastante estudada devido ao potencial no campo de saneamento de águas residuárias de tingimento (YE et al, 2021). O sulfato de cobre pode agir na catalise através de mecanismo de troca iônica simples, onde há liberação de sulfato ($SO_4^{\bullet-}$), sendo que no trabalho de Dhale e Mahajani (2000) este mecanismo capaz reduzir até 75% da demanda química de oxigênio (DQO) e remover até 99% da cor do corante azo Azul Disperso em meio líquido agitado.

Os resultados apresentados no gráfico de Pareto para a descoloração (Y2) (Figura 18) evidenciam que o fator que exerceu maiores efeitos para esta resposta foi, principalmente a concentração de extrato de levedura (X_3). Neste caso, a correlação deste fator com a descoloração, especificamente, pode estar ligada a preferência de fungos de podridão branca em utilizar fontes orgânicas de nitrogênio para ampliação da rede micelial, elevando o aumento da biomassa do espécime, e conseqüentemente de sua área superficial de biossorção do corante ao micélio, por exemplo (KIRSCH, MACEDO e TEIXEIRA, 2016).

Figura 18 - Gráfico de Pareto para a Atividade de Lac com valores representativos das interações lineares e quadráticas entre os fatores e Gráfico de Superfície de Resposta pela interação entre os dois fatores mais relevantes: A) Atividade de Lac (Y1)



50 Figura 17 - Gráfico de Pareto para a Descoloração (Y2) com valores representativos das interações lineares e quadráticas entre os fatores e Gráfico de Superfície de Resposta pela interação entre os dois fatores mais relevantes: B) Descoloração (Y2), tempo/extrato de levedura (X1X3)

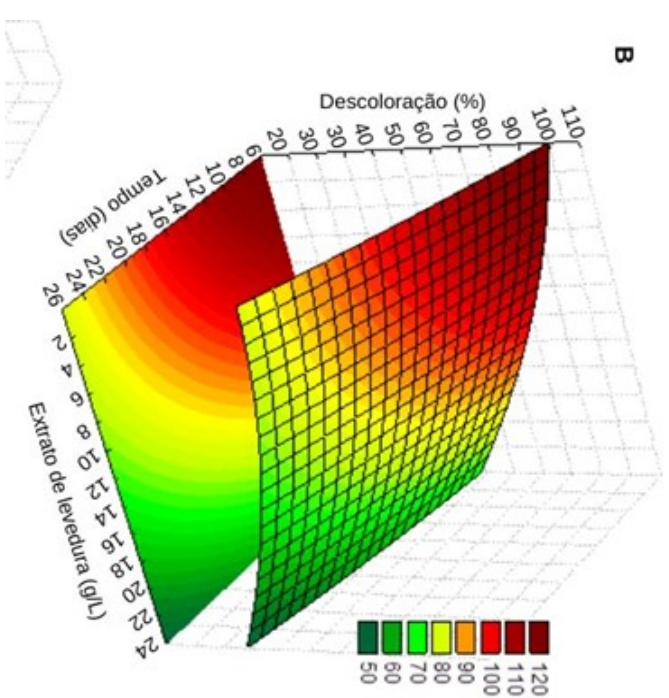
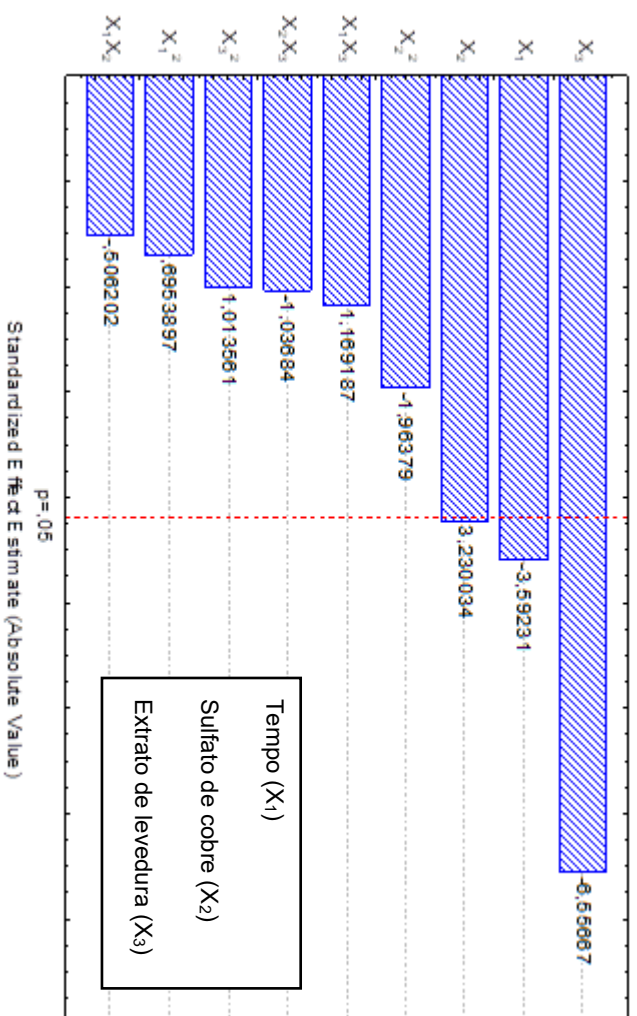
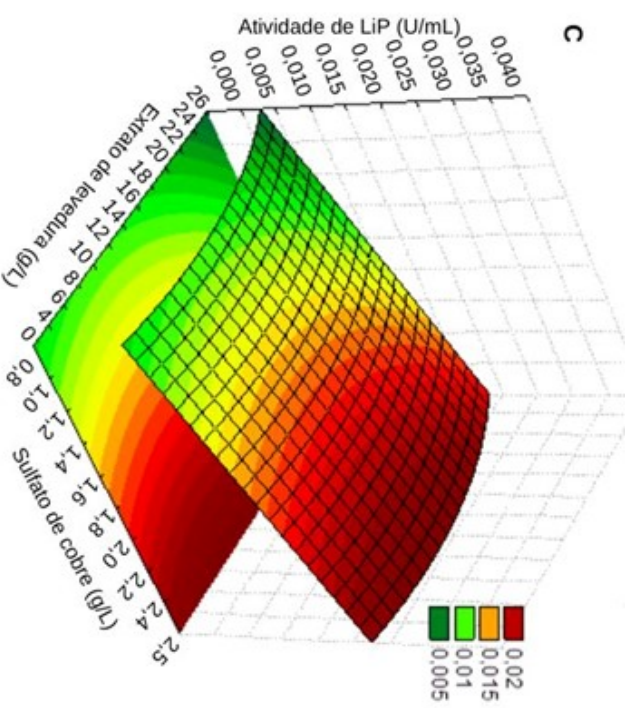
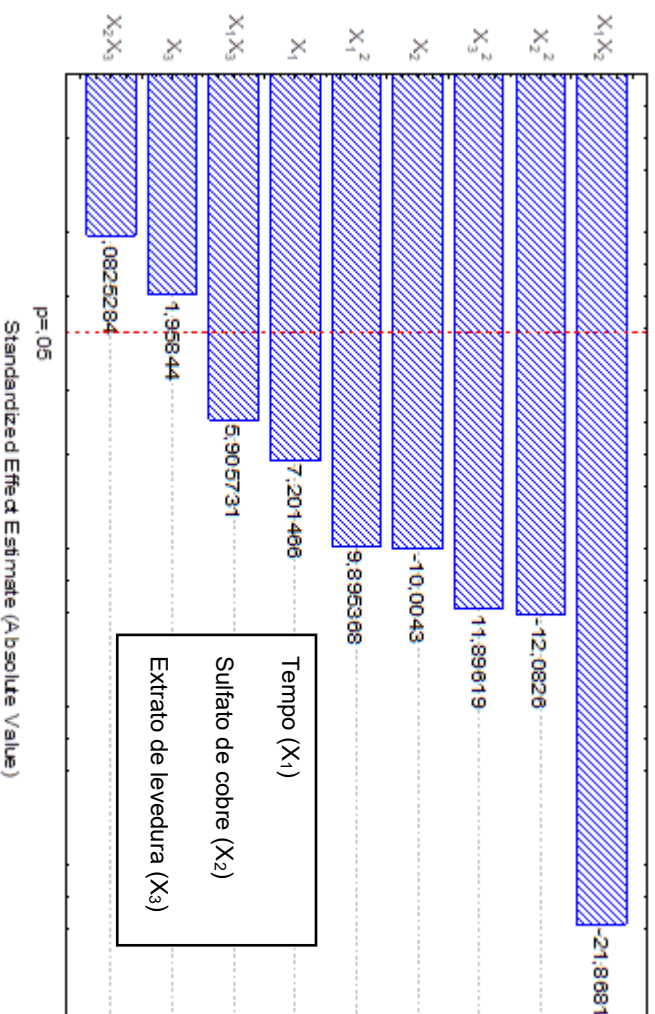


Figura 18 - Figura 20 - Gráfico de Pareto para a Atividade de Lignina peroxidase (Y3) com valores representativos das interações lineares e quadráticas entre os fatores e Gráfico de Superfície de Resposta pela interação entre os dois fatores mais relevantes: B) A

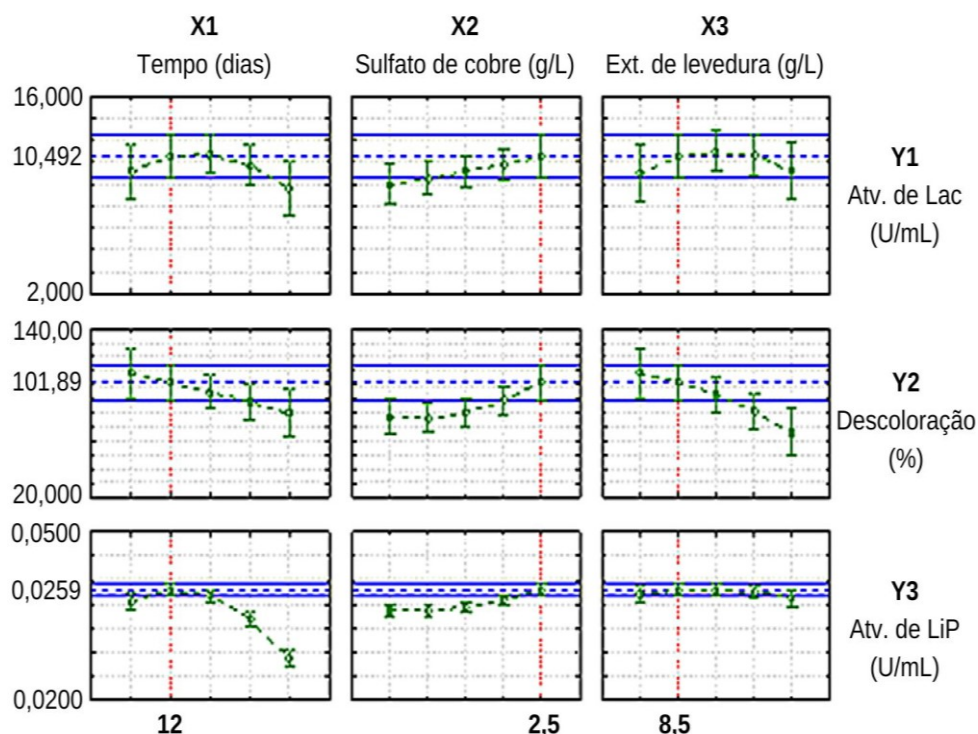


Para a resposta atividade de LiP (Y3), a partir das superfícies de resposta apresentadas, vê-se que as melhores respostas foram obtidas em tempos nos níveis intermediários e inferiores. Desta forma, a superfície de resposta para a LiP (Y3) (Figura 19) foi obtida fixando-se o tempo de cultivo em 10 dias, que representa um tempo entre o valor limite inferior e o central.

A atividade de LiP (Y3) foi influenciada majoritariamente pela interação entre tempo e concentração de sulfato de cobre ($X_1X_2 = -21,868$), sendo a variável relevante menos significativa a concentração do extrato de levedura ($X_3 = 5,905$), porém essa variável se mostrou importante para as respostas de atividade lacase (Y1) e descoloração (Y2). A influência de complexos de cobre sobre a atividade de enzimas peroxidases de fungos do gênero *Trametes* sp. e outros fungos de podridão branca já foi amplamente estudada (VRSANSKA et al. 2016). Complexos metálicos, bem como compostos halogênios podem alterar a dinâmica de funcionamento da LiP, através da saturação de bases metálicas e disponibilização de substrato enzimático (JING, 2010).

Sendo está uma otimização realizada para três fatores e três respostas, através das sobreposições das curvas de resposta, pode-se obter graficamente o ponto ótimo de cada fator para máximas respostas levando em consideração as demais respostas plotadas (Figura 20). Através desta metodologia, foi possível determinar que a condição de cultivo adequada para maximização das três respostas concomitantemente de acordo com o modelo proposto foi: 2,5 g/L de sulfato de cobre 8,5 g/L de extrato de levedura e 12 dias de cultivo. Bem como com estes parâmetros são previstas as respostas ótimas de atividade de Lac (Y1) de 10,492 U/mL, descoloração (Y2) de 100% e atividade de LiP (Y3) de 0,0259 U/mL.

Figura 19 - Curvas de resposta as três variáveis analisadas, considerando os fatores tempo (X1), concentração de sulfato de cobre (X2) e concentração de extrato de levedura (X3)



Ainda, visando confirmar a aplicabilidade deste modelo obtido, foram realizados experimentos de validação com as condições de cultivo combinadas para as três respostas. A atividade de Lac obtida pelo ensaio de validação, foi de 10,302 U/mL e não diferiu significativamente do valor previsto pelo modelo (10,290 U/mL), bem como se aproximou de resultados da literatura para *Trametes* sp. (LI et al, 2008). A atividade de LiP obtida no ensaio de validação da otimização, foi de 0,0168 U/mL, e também, não diferiu significativamente do valor previsto pelo modelo (0,0259 U/mL). No entanto, a descoloração obtida no ensaio foi de 63%, sendo diferente do valor previsto pelo modelo (100%). Também, foi medida atividade da enzima MnP pelo fungo *T. cingulata* JUMAD075 nas condições otimizadas, sendo o valor obtido de 0,003 U/mL, majoritariamente superior ao obtido por outras cepas do gênero *Trametes* sp. testadas por Vrsanska e colaboradores (2016) em condições suplementadas de sulfato de cobre, como pode-se observar na Tabela 14.

O fato de a descoloração não ter sido validada mesmo seguindo os parâmetros do ensaio biológico em condições otimizadas, pode estar relacionado a

um possível efeito antagônico entre as variáveis validadas com os parâmetros encontrados (Atividade de Lac e Atividade de LiP) e a variável descoloração. Em muitos casos as interações entre variáveis podem potencializar o efeito de otimização, no entanto neste em específico, pode-se observar uma falta de efeito sinérgico (melhora as condições de ambos) entre a descoloração e as demais respostas. Ainda, pode-se levantar com este resultado, que o efeito de descoloração pode estar relacionado a outro fator, ainda não identificado, como a bio-sorção, por exemplo.

Tabela 14 - Comparação dos resultados obtidos pelo fungo *T. cingulata* JUMAD075 para a atividade enzimática de Lac, LiP e MnP (U/mL) em condições otimizadas e outras espécies do gênero *Trametes* sp. testadas em condições otimizadas por Vrsanska et al. (2016)

| | U/mL | | | Referência |
|------------------------------------|----------|---------|---------|-------------------------|
| | Lac | LiP | MnP | |
| <i>Trametes versicolor</i> | 1,29170 | 0,00181 | 0,00009 | VRSANSKA et al, 2016 |
| <i>Trametes suaveolens</i> | 1,29170 | 0,00181 | 0,00009 | |
| <i>Trametes gibbosa</i> | 0,15690 | 0,00030 | 0,00025 | |
| <i>Trametes cingulata</i> JUMAD075 | 10,29000 | 0,01600 | 0,00300 | Presente estudo |

As amostras passaram por análises de CLAE e FT-IR, com finalidade de gerar um estudo aprofundado do processo de otimização, através da identificação de pistas de possíveis interferências das variáveis e efeitos em respostas bioquímicas relacionadas à biodegradação/bio-sorção do corante pelo isolado selecionado.

4.4 Análise de possíveis produtos da biodegradação

As amostras obtidas dos ensaios e repetições realizadas no experimento de otimização, bem como os controles, foram extraídas com diclorometano (1:1), ressuspensas em metanol e água (1:3) e acidificados para CLAE com ácido tricloroacético 0,1% ao pH 2. As análises de CLAE foram realizadas para cada extrato e obtidos os cromatogramas. Não foi possível identificar modificações mensuráveis entre os cromatogramas dos ensaios e seus respectivos controles, pois não foram utilizados padrões moleculares ou curva padrão. No entanto, foi observada diferença relevante entre o número de picos de alguns cromatogramas de

ensaios de tratamento biológico contendo o corante VR239 e controles com cultivo da cepa sem a presença do corante.

Pode-se observar na Figura 21 o cromatograma do controle (corante + meio, 8 dias), obtido da leitura no comprimento de onda 254 nm, onde aos 5,04 min há um pico de 29,64 mAU. Na mesma figura, o cromatograma do ensaio nº3 (8 dias), no mesmo comprimento de onda, foi observado aos 5,05 min um pico de 24,39 mAU e abertura de um novo pico.

Figura 20 - Cromatograma obtido por análise de CLAE do controle (sem tratamento) e do tratamento por 8 dias com a cepa *T. cingulata* JUMAD075

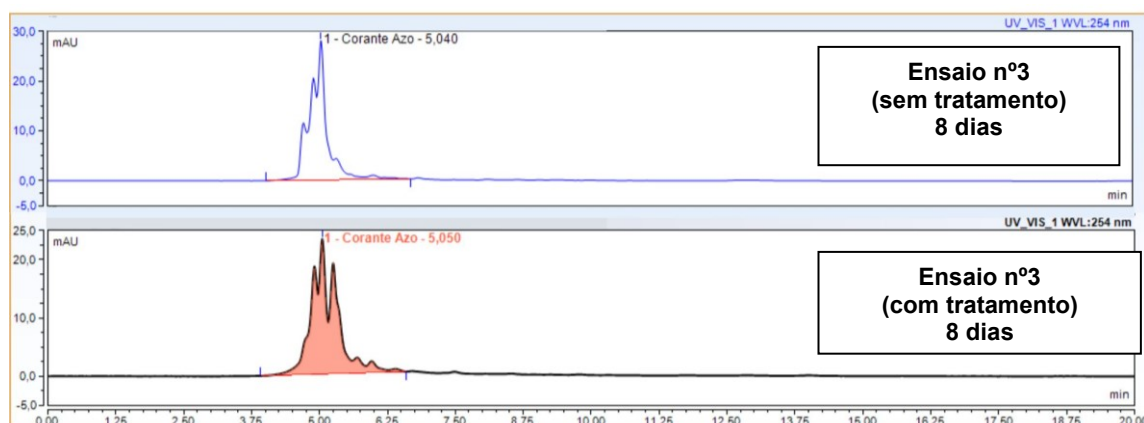
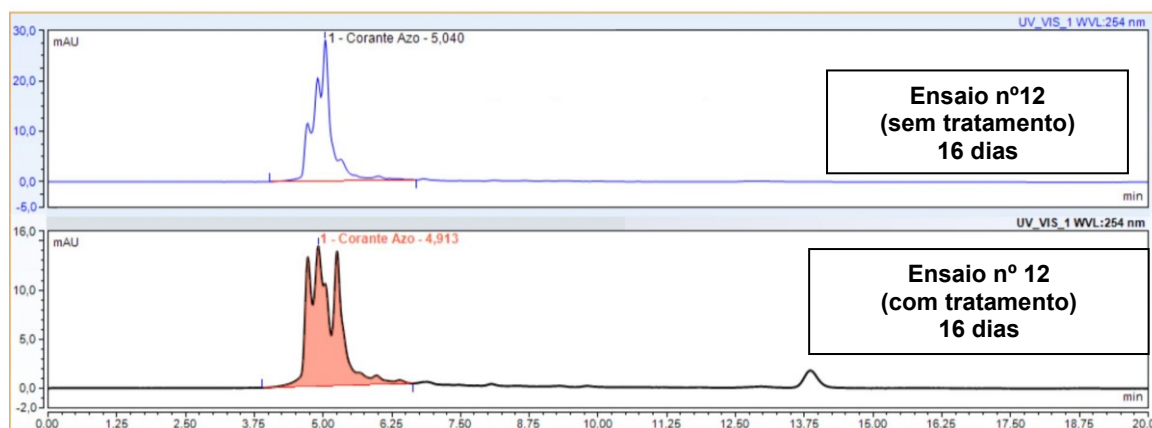


Figura 21 - Cromatograma obtido por análise de CLAE do controle (corante + meio) e do tratamento por 8 dias com a cepa *T. cingulata* JUMAD075



Na Figura 22, o cromatograma de CLAE aos 16 dias do ensaio nº12 evidencia o pico semelhante entre controle e tratamento com decaimento ainda maior, de 28,93 mAU para 14,81 mAU, levando a indicação de possíveis modificações nas

estruturas moleculares, que poderiam ser identificadas por espectroscopia de massas em trabalhos futuros.

4.5 Análise da biossorção do corante ao micélio

4.5.1 Análise da biomassa

Visando identificar um possível efeito de adsorção do corante ao micélio fúngico, foi realizado um estudo da biomassa obtida do experimento de otimização através de IV-FT e MEV.

A média da biomassa produzida pela cepa *T. cingulata* JUMAD075, em cada um dos ensaios do experimento de otimização, bem como o controle (fungo + meio) foram separadas do meio líquido e determinadas respectivas porcentagens de MS de acordo com a metodologia descrita na sessão 4.8.1. As porcentagens de descoloração e de MS foram expressas de acordo com as especificações de cada ensaio junto de seus respectivos desvios padrão na Tabela 15.

Tabela 15 - Porcentagens de matéria seca por ensaio em comparação com a porcentagem de descoloração respectiva

| Ensaio | CuS04 | Ext. Lev. | Dias | Descoloração (%) | MS (%) |
|--------|-------|-----------|------|------------------|-------------|
| 1 | 1 | 14 | 8 | 68 ± 6,28 | 4,08 ± 0,37 |
| 2 | 1 | 14 | 24 | 66 ± 3,12 | 5,8 ± 2,47 |
| 3 | 2,5 | 14 | 8 | 96 ± 0,41 | 4,12 ± 0,62 |
| 4 | 2,5 | 14 | 24 | 80 ± 0,14 | 4,88 ± 0,94 |
| 5 | 1,75 | 3 | 8 | 94 ± 5,00 | 3,22 ± 0,39 |
| 6 | 1,75 | 3 | 24 | 60 ± 0,22 | 3,29 ± 0,08 |
| 7 | 1,75 | 25 | 8 | 47 ± 5,06 | 3,91 ± 0,48 |
| 8 | 1,75 | 25 | 24 | 43 ± 2,27 | 5,20 ± 0,19 |
| 9 | 1 | 3 | 16 | 79 ± 5,22 | 2,64 ± 0,37 |
| 10 | 2,5 | 3 | 16 | 100 ± 0,43 | 4,83 ± 0,70 |
| 11 | 1 | 25 | 16 | 53 ± 3,69 | 4,46 ± 0,50 |
| 12 | 2,5 | 25 | 16 | 57 ± 5,62 | 4,05 ± 1,40 |
| 13 | 1,75 | 14 | 16 | 66 ± 3,22 | 2,39 ± 2,07 |
| 14 | 1,75 | 14 | 16 | 63 ± 2,67 | 3,58 ± 0,10 |
| 15 | 1,75 | 14 | 16 | 78 ± 0,14 | 2,97 ± 0,34 |

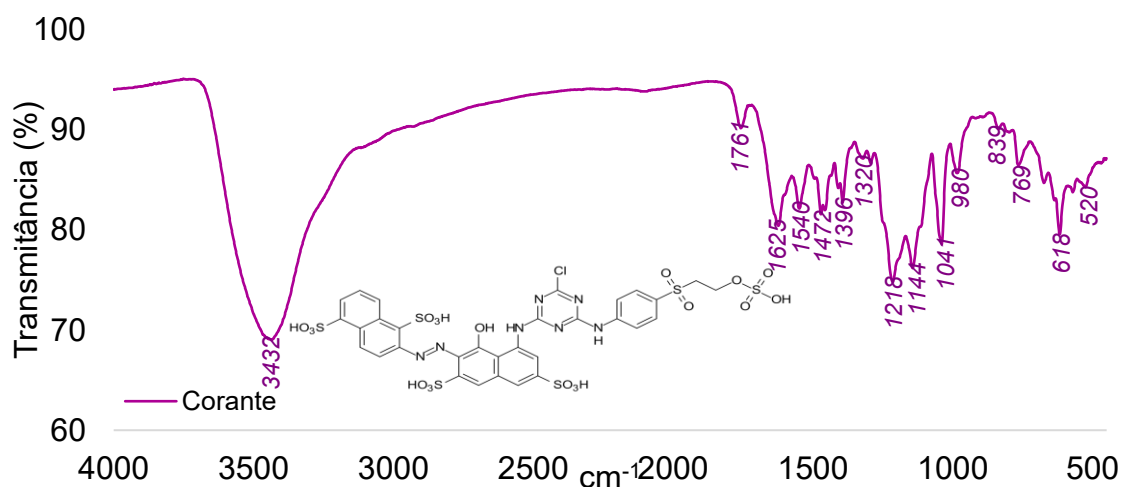
A adsorção é um fator diretamente relacionado a área superficial do substrato adsorvente, isto é, neste caso a área superficial da biomassa micelial produzida pelo fungo. Logo quanto maior a produção de biomassa do fungo, maior a superfície adsorvente do tratamento e maiores as chances de haver biossorção e, conseqüentemente, o efeito de descoloração (HAMZEH et al., 2012; NOURI et al.,

2021). No entanto, este fato não pôde ser observado de forma clara neste experimento, não sendo encontrada relação estatística entre as duas respostas.

4.5.2 Análise da biomassa por FT-IR

O espectro de FT-IR foi obtido na região de 500-4000 cm^{-1} , e as distintas bandas do infravermelho exibidas pela adsorção do corante VR239, foram analisadas comparativamente de acordo com a metodologia estabelecida e expressas graficamente por espectros de transmitância no IR. O espectro do corante VR239 (Figura 23) foi utilizado como referência para identificação de picos de grupos funcionais ligados ao micélio. Foram escolhidos os espectros vibracionais da biomassa dos ensaios nº 3 (8 dias), nº 15 (16 dias) e nº 4 (24 dias) (Tabela 16 e Figura 24, Tabela 17 e Figura 25 e Tabela 18 e Figura 26, respectivamente) como padrão para análises comparativas dos grupos funcionais de acordo com o tempo de cultivo de cada ensaio.

Figura 22 - Gráfico das bandas de transmitância no infravermelho para a molécula do corante VR239 puro



A elevada área superficial do micélio dos fungos e a presença de uma alta variedade de grupos adsorventes, como lipídios, proteínas e carboidratos, faz destes microrganismos os sorvetes biológicos de maior potencial para a indústria (GODAGE e GIONFRIDDO 2020). As Figuras 23, 24 e 25 exibem os espectros vibracionais da biomassa micelial do fungo *T. cingulata* JUMAD075 após contato com o corante VR239 e comparação com controle e corante puro em três diferentes tempos. O espectro FT-IR mostrou maior intensidade de bandas entre 1600-1000 cm^{-1} . As

mudanças observadas nas posições das bandas, no número de ondas e as mudanças nos grupos funcionais do FT-IR são demonstradas para 8, 16 e 24 dias na Tabela 18. Para identificação das frequências das bandas e correlação com seus respectivos grupos funcionais, foi usada como referência a tabela disponibilizada pela Merk (KGAA, 2020).

Figura 23. Espectro vibracional da biomassa do fungo *T. cingulata* JUMAD075 antes (linha cinza) e após 8 dias (ensaio nº3) de contato com corante VR239 e corante puro

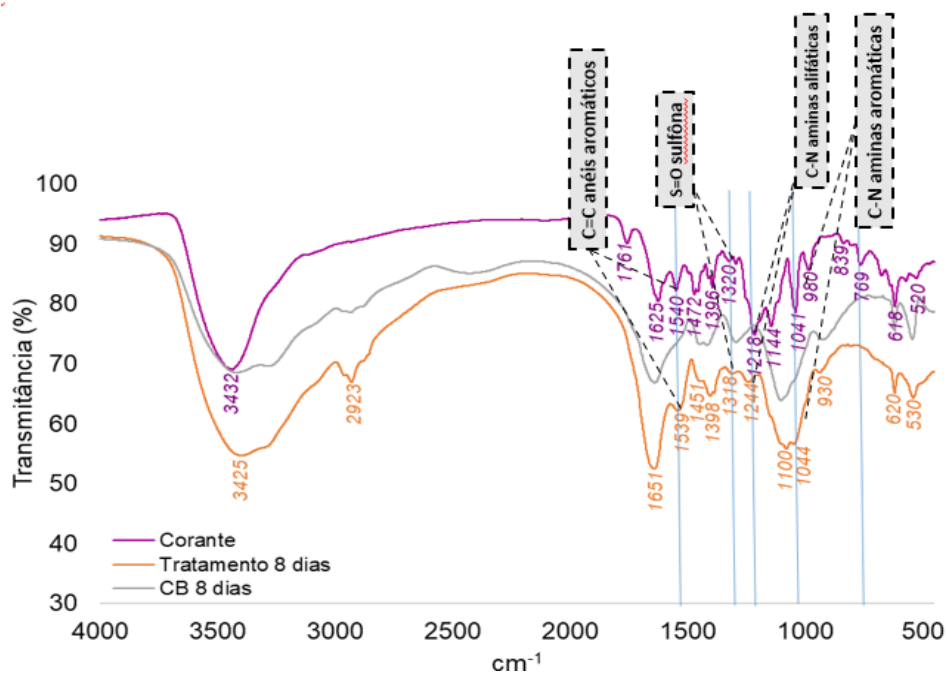


Tabela 16 - Posição da banda dos grupos funcionais antes da adsorção e após 8 dias (ensaio nº3) de contato com corante VR239 e controle corante puro

| Frequência da banda (cm ⁻¹) | | | Grupo funcional atribuído |
|---|-------------------|--------------------|--|
| Corante puro | Antes da adsorção | Depois da adsorção | |
| 3432 | 3403 | 3389 | O-H e/ou N-H alongamento |
| - | 2932 | 2926 | C-H alongamento |
| 1761 | - | - | C=O alongamento <u>ác. carboxílico</u> |
| 1625 | 1644 | 1639 | N-H banda de aminas I |
| 1540 | - | 1539 | C = C alongamento de anéis aromáticos |
| 1472 | - | 1451 | C-H banda de Grupo metileno |
| 1396 | 1417 | 1398 | banda de C-H ou alongamento C-C |
| 1320 | - | 1318 | S=O alongamento de sulfôna |
| 1296 | 1299 | - | C-N alongamento de aminas aromáticas |
| 1218 | - | 1244 | C-N de aminas alifáticas |
| 1041 | - | 1044 | C-N alongamento de aminas |
| 980 | 926 | 948 | C=C banda de alcanos <u>des</u> substituídas (trans) |
| 839 | - | - | C=C banda de alcanos <u>tri</u> substituídos |

Figura 24 - Espectro vibracional da biomassa do fungo *T. cingulata* JUMAD075 antes (linha cinza) e após 16 dias (ensaio nº15) de contato com corante VR239 em comparação com corante puro

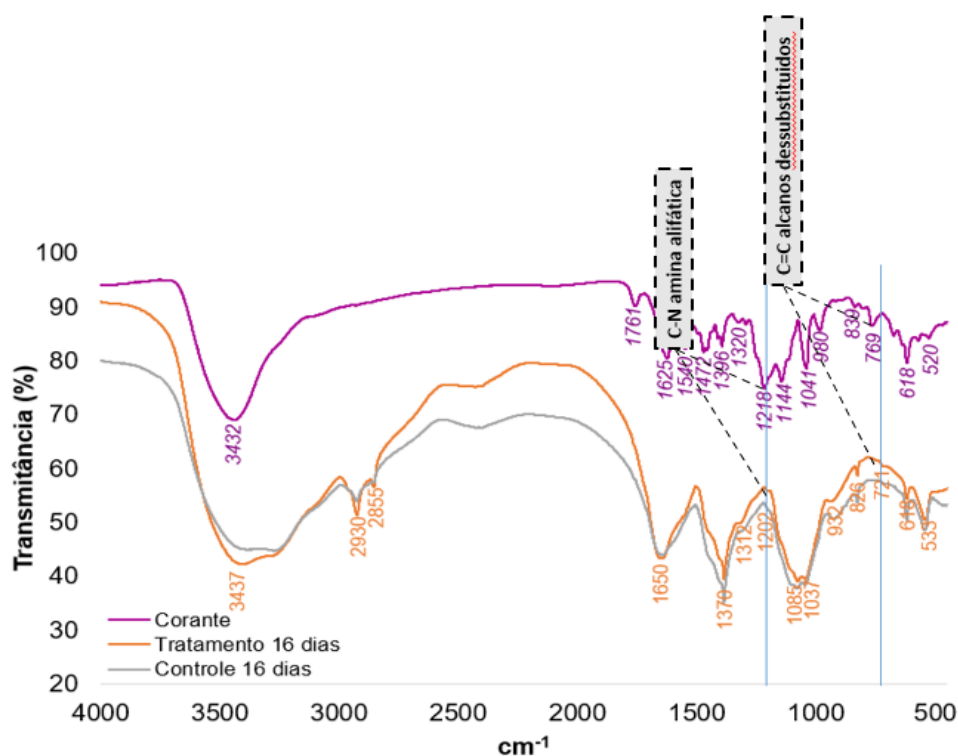


Tabela 17 - Posição da banda dos grupos funcionais antes da adsorção e após 16 dias (ensaio nº15) de contato com corante VR239 e controle corante puro

| Frequência da banda (cm ⁻¹) | | | Grupo funcional atribuído |
|---|-------------------|--------------------|---|
| Corante puro | Antes da adsorção | Depois da adsorção | |
| 3432 | 3414 | 3404 | O-H e/ou N-H alongamento |
| - | 2927 | 2922 | C-H alongamento |
| 1761 | - | - | C=O alongamento <u>ác. carboxílico</u> |
| 1625 | 1639 | 1648 | N-H banda de aminas I |
| 1540 | - | - | C = C alongamento de anéis aromáticos |
| 1472 | - | - | C-H banda de Grupo metileno |
| 1396 | 1384 | 1386 | Banda de C-H ou alongamento C-C |
| 1320 | - | - | S=O alongamento de <u>sulfona</u> |
| 1296 | 1292 | 1253 | C-N alongamento de amina aromática |
| 1218 | - | 1202 | C-N de amina alifática |
| 1041 | 1047 | 1047 | C-N de aminas alifáticas |
| 980 | 918 | 928 | C=C banda de alcanos <u>desubstituídas (trans)</u> |
| 839 | 825 | 827 | C=C banda de alcanos <u>trisubstituídos</u> |
| 769 | - | 721 | C=C banda de alcanos <u>desubstituídas (cis)</u> |

Figura 25 - Espectro vibracional da biomassa do fungo *T. cingulata* JUMAD075 antes (linha cinza) e após 16 dias (ensaio nº15) de contato com corante VR239 em comparação com corante puro

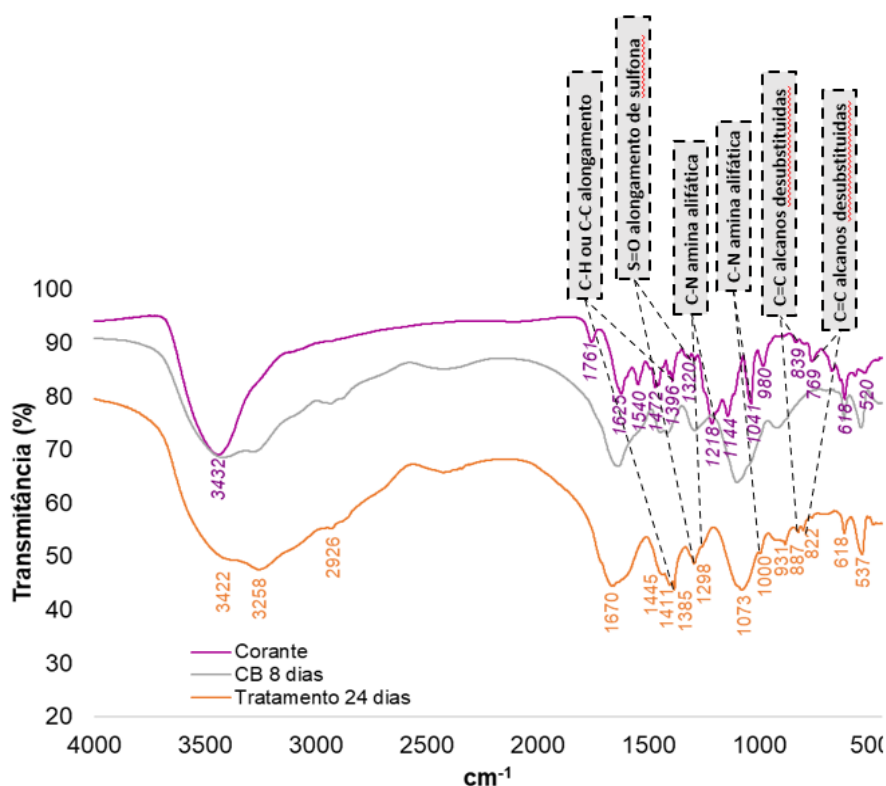
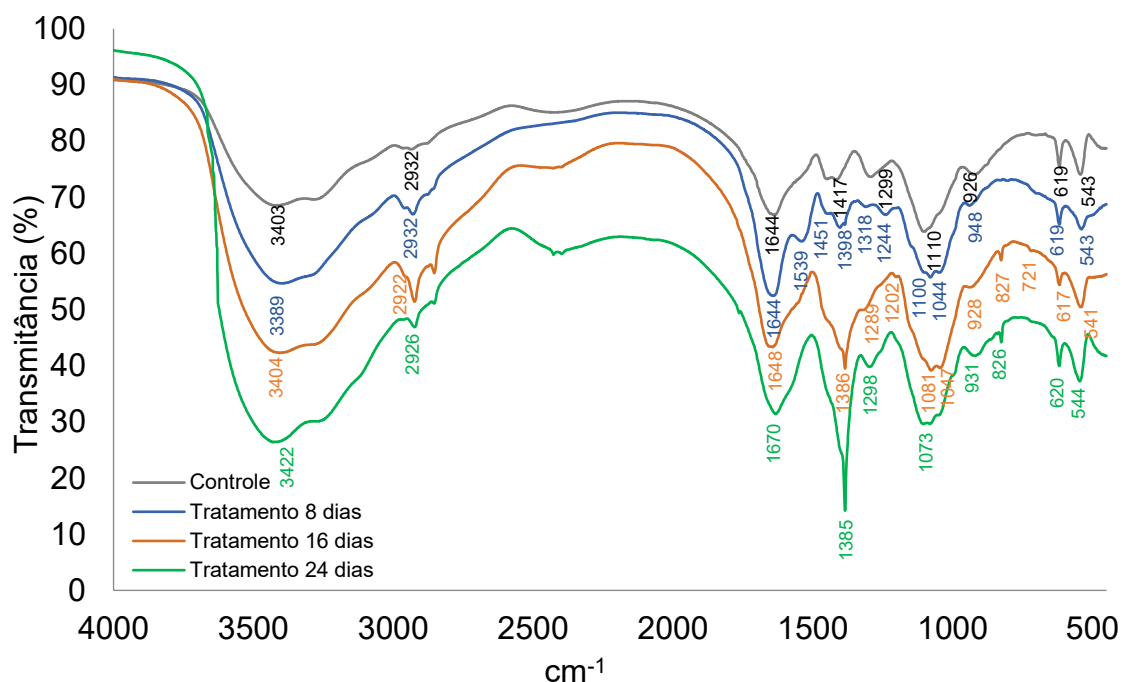


Tabela 18 - Posição da banda dos grupos funcionais antes da adsorção e após 24 dias (ensaio nº4) de contato com corante VR239 e controle corante puro

| Frequência da banda (cm ⁻¹) | | | Grupo funcional atribuído |
|---|-------------------|--------------------|---|
| Corante puro | Antes da adsorção | Depois da adsorção | |
| 3432 | 3435 | 3422 | O-H e/ou N-H alongamento |
| - | 3275 | - | C-H alongamento |
| 1761 | - | - | C=O alongamento <u>ác. carboxílico</u> |
| 1625 | 1639 | 1670 | N-H banda de amina I |
| 1540 | - | - | C = C alongamento de anéis aromáticos |
| 1472 | 1457 | 1445 | C-H banda de Grupo metileno |
| - | 1412 | 1411 | banda de C-H ou alongamento C-C |
| 1396 | - | 1385 | banda de C-H ou alongamento C-C |
| 1320 | - | 1298 | S=O alongamento de sulfona |
| 1296 | 1287 | 1246 | C-N alongamento de amina aromática |
| 1218 | - | 1203 | C-N de amina alifática |
| 1041 | - | 1000 | C-N de amina alifática |
| 980 | 921 | 931 | C=C banda de alcanos <u>desubstituídas</u> (trans) |
| 839 | - | 887 | C=C banda de alcanos <u>desubstituídas</u> (cis) |
| 769 | - | 822 | C=C banda de alcanos <u>desubstituídas</u> (cis) |

O surgimento de picos atribuídos a grupamentos sulfonados nos tratamentos no alongamento S=O ($1350-1300\text{ cm}^{-1}$) de sulfônas e ácidos sulfônicos também foram identificados, o que sugere que estes grupos também são possíveis pontes de adsorção do corante ao micélio (BIRELLER et al., 2012).

Figura 26 - Espectro vibracional da biomassa da cepa JUMAD075 antes (linha cinza) e após 8 dias (linha azul), após 16 dias (linha laranja) e 24 dias (linha verde) de contato com corante VR239



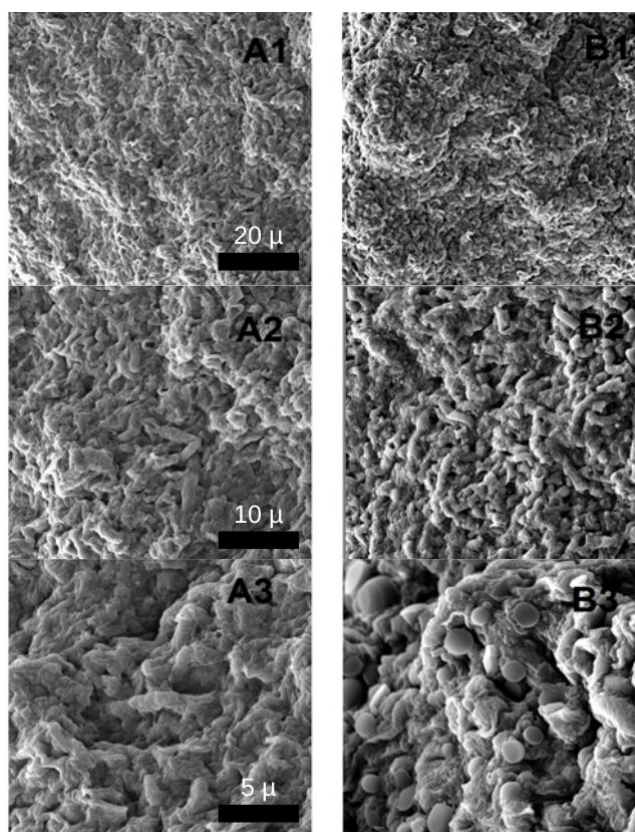
Entre os grupos funcionais identificados na análise de FT-IR do ensaio nº 3 (8 dias) comparados com antes da adsorção e depois da adsorção, as frequências tiveram deslocamento de -14 cm^{-1} na banda de alongamento O-H e/ou N-H, de -4 cm^{-1} no alongamento de C-H, -5 cm^{-1} nas bandas de N-H de aminas primárias, -19 cm^{-1} nas bandas de C-H ou alongamento de C-C e de -10 cm^{-1} na banda C-N de aminas alifáticas, além do surgimento do alongamento C=C de anéis aromáticos. Uma vez que um deslocamento de posição de banda de mais de 4 cm^{-1} é considerado significativo, essas mudanças listadas podem ter contribuído para adsorção do corante nesses grupos de superfície envolvidos na biossorção (BAIRAGI et al., 2011). Além disso, nestes quatro grupos a intensidade dos picos foi menor na amostra de tratamento com corantes (Figura 27), o que pode ser um sinal relacionado com a adsorção nestes sítios (NOURI et al., 2021).

Diferentes estudos confirmam uma variedade de grupos funcionais envolvidos na adsorção e que podem estar relacionados a estrutura química dos corantes e, também, ao tipo de adsorvente e seus grupos de superfície. Entre os grupos de superfície mais importantes envolvidos na biossorção estão as hidroxilas e as aminas, presentes em biopolímeros como a quitina (Ch), polissacarídeos como a galactosaminogalactana (GAG) e a galactomanana (GM), β -1,3-glucanas e α -1,3-glucanas, além de proteínas e outros componentes da estrutura celular fúngica (RINAUDO, 2006; CHAKRABORTY et al., 2021).

4.5.3 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Com intuito de caracterizar morfologia de superfícies de biosorventes, a MEV é uma técnica bastante eficiente, sendo possível determinar a estrutura porosa da biomassa e diferenciar tratamentos (DOTTO et al., 2012 *apud* SI, YUAN e CUI, 2015). As amostras de biomassa obtidas da validação da otimização foram analisadas em MEV. As imagens obtidas apresentaram algumas modificações morfológicas entre amostra antes do tratamento (A1, A2 e A3) e após o tratamento (B1, B2 e B3). Além da coloração visivelmente relacionada ao efeito de tingimento do micélio, foi possível notar a superfície da biomassa da amostra antes do tratamento (A1, A2 e A3) como uma rede polimérica enrugada (SI, YUAN e CUI, 2015), com números consideráveis de poros irregulares e presença de estruturas esféricas difusas (Figura 28).

Figura 27. Análises de MEV para biomassa antes do tratamento (A1, A2 e A3) e após o tratamento (B1, B2 e B3) em três diferentes escalas de aumento



A perda de cor na superfície celular foi observada bem como indicações da precipitação do VR239 na superfície do *T. cingulata* JUMAD075. Nouri e colaboradores (2021) realizaram estudos com a biossorção de corantes azo à levedura *Sarocladium* sp. e relatou precipitação semelhante na amostra tratada. A análise realizada sugere que a área superficial externa do micélio foi recoberta pelo corante.

Para melhor caracterização deste material biosorvente é necessário que haja identificação do Potencial Zeta da superfície do micélio adsorvente. Esta informação é muito importante para que seja possível conhecer as cargas da superfície exterior de materiais adsorventes. Este é um forte indicador de capacidade de floculação de suspensões, por exemplo (KLIS et al., 2002). Nouri e colaboradores (2021) utilizaram esta análise sendo possível qualificar o alto potencial de adsorção da biomassa fúngica. Em seu estudo, verificou-se a diferença do potencial de carga de -12,7 mV antes do tratamento e -15,9 mV após o tratamento, sendo a mudança relacionada a saturação da superfície externa do micélio pelo corante.

4.6 Análise da descoloração do corante por concentrado de enzimas produzidas pelo isolado *T. cingulata* JUMAD075

O concentrado de enzimas obtido por diálise (Figura 29) foi utilizado na concentração de 1% (m/v) em solução contendo corante VR239 (0,1g/L) foi mantido sob agitação constante por 24h obtendo a atividade média de Lac de 7,332 U/mL, não diferindo significativamente da solução controle sem corante que atingiu 7,617 U/mL. Concomitantemente as análises de atividade de Lac, foi realizada análise da descoloração do meio, com máximo de 36% de descoloração e redução de 0,024 g/L na concentração do corante VR239 livre em relação ao controle sem CE.

Figura 28 - Processo de extração de enzimas através de dialise



Tabela 19 - Resultados em triplicata de porcentagem de descoloração do corante VR239 e atividade de Lac em meio contendo CE a 1 % (m/v), controle sem CE (CA) e controle sem corante (CB)

| Nome | Lac U/mL | VR239 g/L | Abs. $\lambda=545\text{nm}$ | Descoloração |
|-------------------------|--------------|--------------|-----------------------------|--------------|
| ELE1 | 7,048 | 0,080 | 0,694 | 30% |
| ELE2 | 7,978 | 0,077 | 0,652 | 35% |
| ELE3 | 6,969 | 0,076 | 0,634 | 36% |
| M_e | 7,332 | 0,077 | 0,660 | 34% |
| CA1 | - | 0,1 | 0,995 | - |
| CA2 | - | 0,1 | 1,004 | - |
| CA3 | - | 0,1 | 1,000 | - |
| CB1 | 8,081 | - | - | - |
| CB2 | 7,733 | - | - | - |
| CB3 | 7,036 | - | - | - |
| M_e CB | 7,617 | - | - | - |

Esta investigação identifica a ação específica do ELE obtido do cultivo otimizado da cepa *T. cingulata* JUMAD075 sobre a descoloração e redução do

corante no meio líquido. Sendo anteriormente determinada que a descoloração do corante sob a faixa média de atividade de Lac de 7,332 U/mL.

5 CONCLUSÃO

O microrganismo selecionado foi identificado como *Trametes cingulata* JUMAD075, caracterizado macro e microscopicamente, além de confirmação por sequenciamento e análise molecular. Esta espécie foi analisada quanto ao seu potencial para tratamento de corantes azo. Pôde-se observar efeitos visuais de descoloração do corante em meio sólido e teste positivo para peroxidases totais (guaiacol). Em meio líquido na concentração de 0,2 g/L o fungo foi capaz de realizar até 50% de descoloração para corante azo VR239 em 12 dias. Foi determinada a concentração de corante VR239 ideal para otimização de 0,1 g/L. O fungo foi capaz de atingir a atividade de Lac de 10,69 U/mL em 12 dias.

Foi realizada otimização de condições de cultivo do fungo em meio líquido através de um delineamento multifatorial, visando atingir a máxima produção enzimática e descoloração do corante VR239. Foi identificada a suplementação ideal de sulfato de cobre (2,5 g/L), extrato de levedura (8,5 g/L) e tempo de cultivo (12 dias), com a validação das condições de cultivo mantendo 10,290 U/mL de atividade de Lac, de 0,016 U/mL de LiP, 0,003 U/mL de MnP e descoloração de 64%. No entanto, no experimento de otimização, a máxima atividade de Lac (12,447 U/mL) foi obtida no ensaio de nº 12 (2,5 g/L de sulfato de cobre, 25 g/L de extrato de levedura e 16 dias de cultivo), a máxima atividade de LiP (0,033 U/mL) obtida no ensaio nº 3 (2,5 g/L de sulfato de cobre 14 g/L de extrato de levedura e 8 dias de cultivo), e a resposta máxima de descoloração o ensaio nº 10 obteve a melhor média (100% ± 0,43 (2,5 g/L de sulfato de cobre 3 g/L de extrato de levedura e 16 dias de cultivo).

Sobre a análise por CLAE, ainda que pouco conclusivos, os resultados obtidos indicam que há decaimento da absorbância do corante em comparação com controle. Na análise do ensaio nº12 (16 dias) evidencia o pico semelhante entre controle e tratamento com decaimento ainda maior, de 28,93 mAU para 14,81 mAU, levando a indicação de possíveis modificações nas estruturas moleculares, que poderiam ser identificadas por espectroscopia de massas em trabalhos futuros.

Quanto a análise de bioadsorção, em ambos os estudos realizados, foram identificados indicativos de bioadsorção do corante VR239 ao micélio do fungo. Em análise de FT-IR, o deslocamento gradual da posição de banda superior a 4 cm^{-1} , em grupos de superfície envolvidos na bioadsorção, sugere de fato há este efeito ocorrendo nos tratamentos analisados. Em análise de MEV, também foram observados fatos relevantes que indicam o efeito de bioadsorção, como a superfície da amostra antes do tratamento como uma rede polimérica enrugada, com números consideráveis de poros irregulares e presença de estruturas esféricas difusas.

A descoloração do corante VR239, também foi testada em experimento com ELE, sendo observada atividade média de 7,332 U/mL (ELE 1%) e descoloração de em média 34%. Pode-se concluir que a presença de enzimas dentro deste *pool* extraído do cultivo do fungo *T. cingulata* JUMAD075, contribuíram para a descoloração do corante azo.

Deste modo, foi possível concluir que o microrganismo *T. cingulata* JUMAD075 possui alta capacidade de realizar o tratamento de corantes azo, sendo capaz de atuar por duas vias de tratamento, a bioadsorção ao micélio fúngico, e a biodegradação por enzimas ligninolíticas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F. R., GRAVATO, C., SOARES, A. M., & de OLIVEIRA, D. P. Biochemical approaches to assess oxidative stress induced by exposure to natural and synthetic dyes in early life stages in zebrafish. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(23-24), 1259-1268. 2017.

AKAR, Tamer et al. Biosorption potential of *Neurospora crassa* cells for decolorization of Acid Red 57 (AR57) dye. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, v. 81, n. 7, p. 1100-1106, 2006.

ALI, Hanan M.; BADR, Sanaa Qassem; AL-KINANI, Murtadha F. Hassan. DNA Binding three Azo Dyes as new Antibiotics. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing, 2019. p. 012102.

ANASTASI, Antonella et al. Decolourisation and detoxification in the fungal treatment of textile wastewaters from dyeing processes. *New Biotechnology*, v. 29, n. 1, p. 38-45, 2011.

ARDILA-LEAL, Leidy D. et al. A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. *Molecules*, v. 26, n. 13, p. 3813, 2021.

ARREGUI, L., AYALA, M., GÓMEZ-GIL, X., GUTIÉRREZ-SOTO, G., HERNÁNDEZ-LUNA, C. E., de LOS SANTOS, M. H., ... & VALDEZ-CRUZ, N. A. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, v. 18, n. 1, p. 1-33, 2019.

ASMA, Dilek et al. Adsorptive removal of textile dyes from aqueous solutions by dead fungal biomass. *Journal of basic microbiology*, v. 46, n. 1, p. 3-9, 2006.

BAFANA, Amit; DEVI, Sivanesan Saravana; CHAKRABARTI, Tapan. Azo dyes: past, present and the future. *Environmental Reviews*, v. 19, n. NA, p. 350-371, 2011.

BAIRAGI, Himadri et al. Adsorption profile of lead on *Aspergillus versicolor*: a mechanistic probing. *Journal of hazardous materials*, v. 186, n. 1, p. 756-764, 2011.

BAYRAMOĞLU, Gülay; ARICA, M. Yakup. Biosorption of benzidine based textile dyes "Direct Blue 1 and Direct Red 128" using native and heat-treated biomass of *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 143, n. 1-2, p. 135-143, 2007.

BENKHAYA, Said; M'RABET, Souad; EL HARFI, Ahmed. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 115, p. 107891, 2020.

BERGAMINI, Márcio F.; DE OLIVEIRA, F. C. M.; ZANONI, Maria Valnice Boldrin. Análise voltamétrica do corante têxtil do tipo antraquinona empregando eletrodos de carbono impresso. *Eclética Química*, v. 30, p. 53-59, 2005.

BERTRAND, Brandt et al. Induction of laccases in *Trametes versicolor* by aqueous wood extracts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 1, p. 135-142, 2014.

BIBI, Ismat; BHATTI, Haq Nawaz; ASGHER, Muhammad. Comparative study of natural and synthetic phenolic compounds as efficient laccase mediators for the

transformation of cationic dye. *Biochemical engineering journal*, v. 56, n. 3, p. 225-231, 2011.

BIRELLER, E. S. et al. Removal of some reactive dyes by untreated and pretreated *Saccharomyces cerevisiae*, an alcohol fermentation waste. 2012.

BISBY FA, ROSKOV YR, ORRELL TM, NICOLSON D, PAGLINAWAN LE, BAILLY N, KIRK PM, BOURGOIN T & BAILLARGEON G.(eds) (2009) *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2009 Annual Checklist*. Digital Resource, Reading, UK. Disponível em [Mhttp://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2009/](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2009/)>.

BOKHARI, T. H., KASHIF, M., BHATTI, I. A., ZUBAIR, M., ADEEL, S., YOUSAF, M., ... & MANSHA, A. Degradation Study of CI Reactive Yellow 145 by Advanced Oxidation Process. *Asian Journal of Chemistry*, v. 25, n. 15, 2013.

BOLLAG, Jean-Marc; LEONOWICZ, Andrzej. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and environmental microbiology*, v. 48, n. 4, p. 849-854, 1984.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, v. 267, n. 1, p. 99-102, 1990.

BROSILLON, S. et al. Innovative integrated process for the treatment of azo dyes: coupling of photocatalysis and biological treatment. *Desalination*, v. 222, n. 1-3, p. 331-339, 2008.

CHAKRABORTY, Arnab et al. A molecular vision of fungal cell wall organization by functional genomics and solid-state NMR. *Nature communications*, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.

CHAKROUN, Hanen et al. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 4, p. 507-513, 2010.

CHANDER, M.; ARORA, D. S. Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. *Dyes and Pigments*, v. 72, n. 2, p. 192-198, 2007.

CHENG, W. N. et al. Characterization of an azo-dye-degrading white rot fungus isolated from Malaysia. *Mycosphere*, v. 7, n. 5, p. 560-569, 2016.

CHUNG, King-Thom. Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines metabolically produced from azo dyes. *Journal of Environmental Science & Health Part C*, v. 18, n. 1, p. 51-74, 2000.

COLLINS, Patrick J.; DOBSON, A. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 9, p. 3444-3450, 1997.

COSSOLIN, Aline Silva et al. Decolorization of textile azo dye Reactive Red 239 by the novel strain *Shewanella xiamenensis* G5-03 isolated from contaminated soil. *Revista Ambiente & Água*, v. 14, 2019.

COSTA DIAS, Natalia. Degradação do corante Vermelho Reativo 239 por ozonização e avaliação do efeito dos subprodutos no desempenho e comunidade microbiana de sistema MBBR. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química, Tese de Doutorado. 2019.

COUTO, S. Rodríguez; ROSALES, E.; SANROMÁN, Ma A. Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors. *Chemosphere*, v. 62, n. 9, p. 1558-1563, 2006.

CRUZ-MORATÓ, Carles et al. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water research*, v. 47, n. 14, p. 5200-5210, 2013.

DANTÁN-GONZÁLEZ, Edgar et al. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. *Int Microbiol*, v. 11, n. 3, p. 163-169, 2008.

DAYARAM, Poonam; DASGUPTA, Debjani. Synthetic dye decolourisation by white rot fungus, *Trametes cingulata*. *NATURE ENVIRONMENT AND POLLUTION TECHNOLOGY*, v. 7, n. 1, p. 7, 2008.

DAYARAM, Poonam; DASGUPTA, Debjani. Synthetic dye decolourisation by white rot fungus, *Trametes cingulata*. *NATURE ENVIRONMENT AND POLLUTION TECHNOLOGY*, v. 7, n. 1, p. 7, 2008.

DE ROSSO, Veridiana Vera; MERCADANTE, Adriana Zerlotti. Dyes in South America. *Handbook of natural colorants*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, p. 53-64, 2009.

DEDAVID, Berenice Anina; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. EdiPUCRS, 2007.

DEGAWA, Masakuni; MIYAIRI, Shinichi; HASHIMOTO, Yoshiyuki. Electrophilic reactivity and mutagenicity of ring-methyl derivatives of N-acyloxy-N-methyl-4-aminoazobenzene and related azo dyes. GANN Japanese Journal of Cancer Research, v. 69, n. 3, p. 367-374, 1978.

DHALE, A. D.; MAHAJANI, V. V. Studies in treatment of disperse dye waste: membrane-wet oxidation process. Waste Management, v. 20, n. 1, p. 85-92, 2000.

DHANKHAR, Rajesh; HOODA, Anju. Fungal biosorption—an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. Environmental technology, v. 32, n. 5, p. 467-491, 2011.

DIORIO, L. A.; FRÉCHOU, DM Salvatierra; LEVIN, L. N. Removal of dyes by immobilization of *Trametes versicolor* in a solid-state micro-fermentation system. Revista Argentina de Microbiología, v. 53, n. 1, p. 3-10, 2021.

DOMÍNGUEZ, Alberto et al. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. Process Biochemistry, v. 37, n. 5, p. 549-554, 2001.

DORWARD, Andrew; GILLER, Ken E. Change in the climate and other factors affecting agriculture, food or poverty: An opportunity, a threat or both? A personal perspective. Global Food Security, v. 33, p. 100623, 2022.

ENAYATZAMIR, Kheirghadam et al. Decolouration of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* immobilised into alginate beads. Environmental Science and Pollution Research, v. 17, n. 1, p. 145-153, 2010.

ERDEN, Emre; KAYMAZ, Yasin; PAZARLIOGLU, Nurdan Kasikara. Biosorption kinetics of a direct azo dye Sirius Blue K-CFN by *Trametes versicolor*. Electronic Journal of Biotechnology, v. 14, n. 2, p. 3-3, 2011.

FANG, Zhe-zheng et al. Progress on application of central composite design-response surface methodology in optimization of preparations in China. Acta Pharmaceutica Sinica, p. 169-177, 2021.

FARACO, V. et al. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. Biodegradation, v. 20, n. 2, p. 209-220, 2009.

FARGHALY, Thoraya A.; ABDALLAH, Zeinab A. Synthesis, azo-hydrazone tautomerism and antitumor screening of N-(3-ethoxycarbonyl-4, 5, 6, 7-tetrahydro-benzo [b] thien-2-yl)-2-arylhydrazono-3-oxobutanamide derivatives. *Arkivoc*, v. 17, p. 295-305, 2008.

FERNANDES, Neila Cristina Lima; VALLE, Mara Lúcia Agostini; CALDERON, Claudene Menezes Atayde. Características físicas e anatômicas de *Cedrela odorata* L. e *Cedrelinga cateniformis* Ducke. *Floresta e Ambiente*, v. 25, 2017.

GAJERA, H. P. et al. Molecular identification and characterization of novel *Hypocrea koningii* associated with azo dyes decolorization and biodegradation of textile dye effluents. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 98, p. 406-416, 2015.

GALHAUP, Christiane et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, n. 4, p. 529-536, 2002.

GAVRILESCU, Maria; CHISTI, Yusuf. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology advances*, v. 23, n. 7-8, p. 471-499, 2005.

GHALY, A. E. et al. Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review. *J Chem Eng Process Technol*, v. 5, n. 1, p. 1-19, 2014.

GHALY, A. E. et al. Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review. *J Chem Eng Process Technol*, v. 5, n. 1, p. 1-19, 2014.

GODAGE, Nipunika H.; GIONFRIDDO, Emanuela. Use of natural sorbents as alternative and green extractive materials: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1125, p. 187-200, 2020.

GREIM, H. et al. Toxicity and ecotoxicity of sulfonic acids: structure-activity relationship. *Chemosphere*, v. 28, n. 12, p. 2203-2236, 1994.

GRELSKA, Agnieszka; NOSZCZYŃSKA, Magdalena. White rot fungi can be a promising tool for removal of bisphenol A, bisphenol S, and nonylphenol from wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 32, p. 39958-39976, 2020.

GÜL, Şermin; ÖZCAN, Özlem; ERBATUR, Oktay. Ozonation of CI Reactive Red 194 and CI Reactive Yellow 145 in aqueous solution in the presence of granular activated carbon. *Dyes and Pigments*, v. 75, n. 2, p. 426-431, 2007.

HAMZEH, Yahya et al. Removal of Acid Orange 7 and Remazol Black 5 reactive dyes from aqueous solutions using a novel biosorbent. *Materials Science and Engineering: C*, v. 32, n. 6, p. 1394-1400, 2012.

HARIDAS, Sajeet; GANTT, J. Stephen. The mitochondrial genome of the wood-degrading basidiomycete *Trametes cingulata*. *FEMS microbiology letters*, v. 308, n. 1, p. 29-34, 2010.

HAUTPHENNE, C; PENNINCKX, M; FRÉDÉRIC, D. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. *Environmental Technology & Innovation*, v. 5, p. 250-266, 2016.

HERNÁNDEZ-ZAMORA, Miriam; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, Fernando. Exposure to the azo dye Direct blue 15 produces toxic effects on microalgae, cladocerans, and zebrafish embryos. *Ecotoxicology*, v. 28, n. 8, p. 890-902, 2019.

HURLBERT, A.; LING, Y. Understanding colour perception and preference. In: *Colour Design*. Woodhead Publishing, 2012. p. 129-157.

HUY, Nguyen Duc et al. Synthetic dyes removal by *Fusarium oxysporum* HUIB02 and stimulation effect on laccase accumulation. *Environmental Technology & Innovation*, v. 19, p. 101027, 2020.

ISROI, Isroi et al. Biological treatment of Lignocelluloses with white-rot fungi and its applications. *BioResources*, v. 6, n. 4, p. 5224-5259, 2011.

JAMEE, Radia; SIDDIQUE, Romana. Biodegradation of synthetic dyes of textile effluent by microorganisms: an environmentally and economically sustainable approach. *European Journal of Microbiology and Immunology*, v. 9, n. 4, p. 114-118, 2019.

JEBAPRIYA, G. Roseline; GNANADOSS, J. Joel. Bioremediation of textile dye using white rot fungi: a review. *International Journal of Current Research and Review*, v. 5, n. 3, p. 1, 2013.

JING, Debing. Improving the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces lavendulae* by medium optimization. *Bioresource technology*, v. 101, n. 19, p. 7592-7597, 2010.

JUNGTANASOMBUT W, PREEPREM P, KOVITVADHI S, KOVITVADHI U, HANNONGBUA S. Effects of Reactive Red 239 on developing Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Kasetsart J Nat Sci* 48:619–628, 2014.

KANDISA, Ravi Vital et al. Dye removal by adsorption: a review. *Journal of bioremediation and Biodegradation*, v. 7, n. 6, 2016.

KAUSHAL, Jyotsna; MAHAJAN, Pooja; KAUR, Navjeet. A review on application of phytoremediation technique for eradication of synthetic dyes by using ornamental plants. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-20, 2021.

KGAA, Merk. IR spectrum table by frequency range. 2020. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>. Acesso dia 25 de setembro de 2022.

KIISKINEN, Laura-Leena et al. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*, v. 150, n. 9, p. 3065-3074, 2004.

KIRSCH, Larissa de Souza; MACEDO, Ana Júlia Porto de; TEIXEIRA, Maria Francisca Simas. Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. *brazilian journal of microbiology*, v. 47, p. 658-664, 2016.

KLIS, Frans M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, v. 26, n. 3, p. 239-256, 2002.

KNEŽEVIĆ, Aleksandar et al. Potential of *Trametes* species to degrade lignin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 85, p. 52-56, 2013.

KUHAD, Ramesh Chander; SINGH, Ajay; ERIKSSON, Karl-Erik L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Biotechnology in the pulp and paper industry*, p. 45-125, 2006.

KUMAR, Adarsh; CHANDRA, Ram. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*, v. 6, n. 2, p. e03170, 2020.

KUMAR, Pradeep; AGNIHOTRI, Ruchika; MONDAL, Monoj Kumar. Catalytic treatment of synthetic dye wastewater: COD and color reduction. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 1, n. 3, p. 440-447, 2013.

LAWLEY, P. D. Effects of some chemical mutagens and carcinogens on nucleic acids. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, v. 5, p. 89-131, 1966.

LEGERSKÁ, Barbora; CHMELOVÁ, Daniela; ONDREJOVIČ, Miroslav. Decolourization and detoxification of monoazo dyes by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, v. 285, p. 84-90, 2018.

LEIDIG, E. et al. Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Bioprocess engineering*, v. 21, n. 1, p. 5-12, 1999.

LEIDIG, E. et al. Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Bioprocess engineering*, v. 21, n. 1, p. 5-12, 1999.

LEMUS-GÓMEZ, Luis Enrique et al. Performance analysis of azo dye decolorization by immobilized *Trametes versicolor* in a sequencing batch reactor. *Environmental Engineering Science*, v. 35, n. 12, p. 1322-1328, 2018.

LEVIN, L.; PAPINUTTI, L.; FORCHIASSIN, F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*, v. 94, n. 2, p. 169-176, 2004.

LEVIN, Laura; HERRMANN, Claudia; PAPINUTTI, Victor L. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, n. 1, p. 207-214, 2008.

LEVINE, Walter G. Metabolism of azo dyes: implication for detoxication and activation. *Drug metabolism reviews*, v. 23, n. 3-4, p. 253-309, 1991.

LI, Airong et al. Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes* sp. *Afr J Biochem Res*, v. 2, n. 8, p. 181-183, 2008.

LOGUERCIO-LEITE, Clarice. Polyporaceae II: *Trametes* Fr. na Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. *INSULA Revista de Botânica*, v. 22, p. 03-20, 1993.

LOPES, Wilson Araújo; FASCIO, Miguel. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química nova*, v. 27, p. 670-673, 2004.

LYRA, E. S. et al. Decolorization of synthetic dyes by basidiomycetes isolated from woods of the Atlantic Forest (PE), Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 8, p. 1499-1504, 2009.

MANTER, Daniel K.; VIVANCO, Jorge M. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by

qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, v. 71, n. 1, p. 7-14, 2007.

MARCO, E. et al. Co-composting as a management strategy to reuse the white-rot fungus *Trametes versicolor* after its use in a biotechnological process. *International Journal of Environment and Waste Management*, v. 11, n. 1, p. 100-108, 2013.

MATHUR, Nupur; BHATNAGAR, Pradeep; SHARMA, Pratibha. Review of the mutagenicity of textile dye products. *Universal Journal of Environmental Research & Technology*, v. 2, n. 2, 2012.

MOHAN NAHA, Pritindra. Nuclear Phenomena in *Trametes cingulata* Berk. *Nature*, v. 186, n. 4728, p. 903-904, 1960.

MUNAGAPATI, Venkata Subbaiah et al. Anionic congo red dye removal from aqueous medium using Turkey tail (*Trametes versicolor*) fungal biomass: adsorption kinetics, isotherms, thermodynamics, reusability, and characterization. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 42, n. 12, p. 1785-1798, 2021.

MUNARI, Fernanda M. et al. Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 8, p. 1383-1392, 2008.

NAWAHWI, M. Z.; IBRAHIM, Z.; YAHYA, A. Degradation of the azo dye Reactive Red 195 by *Paenibacillus* spp. R2. *J Bioremed Biodeg*, v. 4, n. 174, p. 2, 2013.

NC-IUB. Nomenclature committee of the international union of biochemistry. Units of enzyme activity, Recommendations. *European Journal of Biochemistry*, v. 97, p. 319–320, 1979.

NILADEVI, K. N.; PREMA, P. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. *Bioresource technology*, v. 99, n. 11, p. 4583-4589, 2008.

NOURI, Hoda et al. Biosorption performance and cell surface properties of a fungal-based sorbent in azo dye removal coupled with textile wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 18, n. 9, p. 2545-2558, 2021.

NUTSUBIDZE, Nugzar N. et al. Consecutive polymerization and depolymerization of kraft lignin by *Trametes cingulata*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 5, p. 1203-1212, 1998.

NUTSUBIDZE, Nugzar N. et al. Consecutive polymerization and depolymerization of kraft lignin by *Trametes cingulata*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 5, p. 1203-1212, 1998.

NYANHONGO, Gibson S. et al. Oxidoreductases from *Trametes* spp. in biotechnology: a wealth of catalytic activity. *Food Technology and Biotechnology*, v. 45, n. 3, p. 250-268, 2007.

ORTH, Ann B.; ROYSE, D. J.; TIEN, M. I. N. G. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Applied and environmental microbiology*, v. 59, n. 12, p. 4017-4023, 1993.

ORTIZ-MONSALVE, Santiago et al. Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa*. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 109, p. 437-451, 2017.

PAJOT, Hipólito Fernando; FARIÑA, Julia Inés; DE FIGUEROA, Lucía Inés Castellanos. Evidence on manganese peroxidase and tyrosinase expression during decolorization of textile industry dyes by *Trichosporon akiyoshidainum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 8, p. 1199-1207, 2011.

PALMIERI, Gianna et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology*, v. 66, n. 3, p. 920-924, 2000.

PAPINUTTI, Víctor L.; FORCHIASSIN, Flavia. Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of oxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS microbiology letters*, v. 231, n. 2, p. 205-209, 2004.

PARK, Chulhwan et al. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 36, n. 1, p. 59-65, 2007.

PATIL, Namata N.; SHUKLA, Sanjeev R. Degradation of Reactive Yellow 145 dye by persulfate using microwave and conventional heating. *Journal of Water Process Engineering*, v. 7, p. 314-327, 2015.

PERIASAMY, Dhevagi; MANI, Sudhakarn; AMBIKAPATHI, Ramya. White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. In: Recent advancement in white biotechnology through fungi. Springer, Cham, 2019. p. 73-100.

POINTING, S. Bx; VRIJMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 16, n. 3, p. 317-318, 2000.

PRIGIONE, Valeria et al. Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. *Water Research*, v. 42, n. 12, p. 2911-2920, 2008.

RANIMOL, G. et al. Production of laccase from *Trichoderma harzianum* and its application in dye decolourisation. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 16, p. 400-404, 2018.

RENGANATHAN, S. et al. Accumulation of acid orange 7, acid red 18 and reactive black 5 by growing *Schizophyllum commune*. *Bioresource technology*, v. 97, n. 16, p. 2189-2193, 2006.

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

ROMERO, Sílvia et al. Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 31, n. 1, p. 42-47, 2006.

ROWLAND, Hannah M.; BURRISS, Robert P. Human colour in mate choice and competition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 372, n. 1724, p. 20160350, 2017.

SACCHETTO, J.P. et al. *Botryosphaeria* spp. as Producers of Laccase When Cultivated on Vegetable Oils as Sole Carbon Source: Optimizing Laccase Production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 on Soybean Oil. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, v. 10, n. 7, p. 568-577, 2018.

SAHASRABUDHE, M. M. et al. Decolourization of CI reactive yellow 145 by *Enterococcus faecalis* strain YZ66. *Archives of Applied Science Research*, v. 3, n. 3, p. 403-414, 2011.

SALEM, Ibrahim A. Kinetics of the oxidative color removal and degradation of bromophenol blue with hydrogen peroxide catalyzed by copper (II)-supported

alumina and zirconia. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 28, n. 3-4, p. 153-162, 2000.

SALOHEIMO, Markku; NIKU-PAAVOLA, Marja-Leena; KNOWLES, Jonathan KC. Isolation and structural analysis of the laccase gene from the ligninegrading fungus *Phlebia radiata*. *Microbiology*, v. 137, n. 7, p. 1537-1544, 1991.

SEN, Sudip Kumar et al. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: a review. *Fungal Biology Reviews*, v. 30, n. 3, p. 112-133, 2016.

SHARMA, Praveen; SINGH, Lakhvinder; DILBAGHI, Neeraj. Biodegradation of Orange II dye by *Phanerochaete chrysosporium* in simulated wastewater. 2009.

SHIRAISHI, Igor Shoiti et al. Biodegradação da lignina kraft: otimização da produção de lacase pelo isolado JUMAD053 e análise dos produtos por CLAE. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

SI, Jing et al. Application in dye decolorization and optimization of conditions in discoloration by *Trametes orientalis*. *Genomics and Applied Biology*, v. 30, n. 3, p. 364-371, 2011.

SI, Jing; YUAN, Tong-Qi; CUI, Bao-Kai. Exploring strategies for adsorption of azo dye Congo Red using free and immobilized biomasses of *Trametes pubescens*. *Annals of microbiology*, v. 65, n. 1, p. 411-421, 2015.

SI, Jing; YUAN, Tong-Qi; CUI, Bao-Kai. Exploring strategies for adsorption of azo dye Congo Red using free and immobilized biomasses of *Trametes pubescens*. *Annals of microbiology*, v. 65, n. 1, p. 411-421, 2015.

SINGH, Lokendra. Biodegradation of synthetic dyes: a mycoremediation approach for degradation/decolourization of textile dyes and effluents. **Journal of Applied Biotechnology and Bioenergy**, v. 3, n. 5, p. 430-435, 2017.

SINGH, P.; IYENGAR, L.; PANDEY, A. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **Microbial Degradation of Xenobiotics**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 101-133.

SINGH, S., CHATTERJI, S., NANDINI, P. T., PRASAD, A. S. A., & RAO, K. V. B. Biodegradation of azo dye Direct Orange 16 by *Micrococcus luteus* strain SSN2. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 7, p. 2161-2168, 2015.

SINTAKINDI, Aneeta; ANKAMWAR, Balaprasad. Fungal biosorption as an alternative for the treatment of dyes in waste waters: a review. *Environmental Technology Reviews*, v. 10, n. 1, p. 26-43, 2021.

SOSA-MARTÍNEZ, Jazel Doménica et al. Synthetic dyes biodegradation by fungal ligninolytic enzymes: Process optimization, metabolites evaluation and toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 400, p. 123254, 2020.

SWINEHART, Donald F. The beer-lambert law. *Journal of chemical education*, v. 39, n. 7, p. 333, 1962.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TARIQ, Mohsin; YASMIN, Sumera; HAFEEZ, Fauzia Y. Biological control of potato black scurf by rhizosphere associated bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 439-451, 2010.

TEKERE, M.; READ, J. S.; MATTIASSON, B. An evaluation of organopollutant biodegradation by some selected white rot fungi: an overview. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, v. 132, p. 131-141, 2010.

TELKE, Amar A. et al. Biochemical characterization and potential for textile dye degradation of blue laccase from *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 15, p. 696-703, 2010.

THORSTENSON, Christopher A. The social psychophysics of human face color: Review and recommendations. *Social Cognition*, v. 36, n. 2, p. 247-273, 2018.

THURSTON, Christopher F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 81, n. 8, p. 2280–2284, 1984.

TKACZYK, A.; MITROWSKA, K.; POSYNIAK, A. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. *Science of The Total Environment*, v. 717, p. 137222, 2020.

TOSATO, J. C.; HALASZ, M. R. T. Tratamento de efluentes têxteis utilizando processos físico-químicos e oxidativos avançados. Faculdade de Aracruz–Espírito Santo, 2011.

TURAN-ERTAS, Tuba. Biological and physical-chemical treatment of textile dyeing wastewater for color and COD removal. *Ozone: science & engineering*, v. 23, n. 3, p. 199-206, 2001.

UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME (UNDP); GLOBAL INFRASTRUCTURE FACILITY. *Catalyzing Private Sector Investment in Climate Smart Cities*. World Bank, 2020.

URDANETA, M. S. et al. Preservation of Fungi in Distilled Water. Preliminary Results. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 7, n. 1, p. 24-6, 1965.

VASCONCELOS, Ana Flora D. et al. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 10, p. 1131-1138, 2000.

VASINA, Daria V. et al. Lignin-degrading peroxidases in white-rot fungus *Trametes hirsuta* 072. Absolute expression quantification of full multigene family. *PLoS One*, v. 12, n. 3, p. e0173813, 2017.

VELÁZQUEZ-CEDEÑO, Marnyye et al. Interspecific interactions with *Trichoderma longibrachiatum* induce *Pleurotus ostreatus* defence reactions based on the production of laccase isozymes. *Biotechnology letters*, v. 29, n. 10, p. 1583-1590, 2007.

VICTOR, Hans et al. Metabolite Identification from Biodegradation of Congo Red by *Pichia* sp. *KnE Life Sciences*, 2020.

VISWANATH, Buddolla et al. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 8, 2008.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, v.13, p.42-43, 1956.

VRANSKA, Martina et al. Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes. *Molecules*, v. 21, n. 11, p. 1553, 2016.

VRANSKA, Martina et al. Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes. *Molecules*, v. 21, n. 11, p. 1553, 2016.

WANG, Yuxin; YU, Jian. Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*. *Water Science and Technology*, v. 38, n. 4-5, p. 233-238, 1998.

WELTI, Stéphane et al. Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera, and description of a new genus *Leiotrametes*. *Fungal Diversity*, v. 55, n. 1, p. 47-64, 2012.

XU, Chunyan et al. Screening of ligninolytic fungi for biological pretreatment of lignocellulosic biomass. *Canadian Journal of microbiology*, v. 61, n. 10, p. 745-752, 2015.

YAGUB, Mustafa T. et al. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review. *Advances in colloid and interface science*, v. 209, p. 172-184, 2014.

YE, Yuxuan et al. Catalytic oxidation of dyeing wastewater by copper oxide activating persulfate: Performance, mechanism and application. *International Journal of Environmental Research*, v. 15, p. 1-10, 2021.

YESILADA, Ozfer; BIRHANLI, Emre; GECKIL, Hikmet. Bioremediation and decolorization of textile dyes by white rot fungi and laccase enzymes. In: *Mycoremediation and environmental sustainability*. Springer, Cham, p. 121-153, 2018.

YU, Hong-Bo et al. Effects of wood species and enzyme production on lignocellulose degradation during the biodegradation of three native woods by *Trametes versicolor*. *Forest products journal*, v. 58, n. 4, p. 62, 2008.

ZENG, Xiangkang et al. Anthraquinone dye assisted the decolorization of azo dyes by a novel *Trametes trogii* laccase. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 1, p. 160-163, 2012.

ZHANG, Fu-ming; KNAPP, Jeremy S.; TAPLEY, Kelvin N. Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, n. 1-2, p. 48-53, 1999.