

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**CECILIA CLAUDETE RICACZESKI**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS A PARTIR DE UM  
PROCESSO FERMENTATIVO EM EFLUENTE TÊXTIL POR  
*Phanerochaete chrysosporium***

**DISSERTAÇÃO**

**PONTA GROSSA**

**2020**

**CECILIA CLAUDETE RICACZESKI**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTIICAS A PARTIR DE UM  
PROCESSO FERMENTATIVO EM EFLUENTE TÊXTIL POR  
*Phanerochaete chrysosporium***

Dissertação apresentada à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Martins  
Teixeira de Abreu Pietrobelli  
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo  
Bittencourt Sydney

**PONTA GROSSA**

**2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca  
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa  
n.68/20

R487 Ricaczeski, Cecilia Claudete

Produção de enzimas ligninolíticas a partir de um processo fermentativo em efluente têxtil por *Phanerochaete chrysosporium*. / Cecilia Claudete Ricaczeski, 2020.  
57 f.; il. 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Martins Teixeira de Abreu Pietrobelli  
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2020.

1. Enzimas. 2. Indústria têxtil. 3. Resíduos industriais. 4. Biodegradação. I. Pietrobelli, Juliana Martins Teixeira de Abreu. II. Sydney, Eduardo Bittencourt. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 660



Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Ponta Grossa  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA QUÍMICA**



## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Título de Dissertação Nº 91/2020

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS A PARTIR DE UM PROCESSO  
FERMENTATIVO EM EFLUENTE TÊXTIL POR *Phanerochaete chrysosporium***

por

Cecilia Claudete Ricaczeski

Esta dissertação será apresentada às 13:30 do dia **1 de setembro de 2020** como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, com área de concentração em Desenvolvimento de Processos, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

**Profa. Dra. Maria Filomena Filipe Barreiro  
(IPB)**

**Profa. Dra. Giane Gonçalves Lenzi  
(UTFPR)**

**Profa. Dra. Juliana M. T. de A. Pietrobelli  
(UTFPR) – Orientadora**

**Profa. Dra. Simone Delezuq Inglez  
(UTFPR)  
Coordenadora do PPGEQ**

A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE NO DEPARTAMENTO DE  
REGISTROS ACADÊMICOS DA UTFPR –CÂMPUS PONTA GROSSA

Dedico este trabalho  
primeiramente a Deus por me  
dar força em toda a caminhada.  
Aos meus pais que sempre me  
incentivaram e foram  
fundamentais na minha  
formação. E ao meu noivo  
Eduardo El Akkari Sallum, pelo  
companheirismo e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus e Meishu-Sama, por estarem sempre presentes em minha vida e por tornar tudo possível, principalmente na realização deste trabalho.

Aos meus pais por todo esforço em proporcionar meu estudo, pelo amor incondicional e pelos conselhos nos momentos difíceis.

À orientadora Prof.<sup>a</sup> Doutora Juliana M. T. de Abreu Pietrobelli pela amizade e paciência. Sem o seu apoio nada disso seria possível. Desde graduação me orienta a ser uma pessoa melhor, a acreditar nos meus sonhos e a buscá-los com toda força, obrigada por tudo. Ao Prof. Doutor Eduardo Bittencourt Sydney, pela oportunidade que me concedeu, pelo suporte e incentivo, por sempre suprir minhas dúvidas prontamente. À Prof.<sup>a</sup> Doutora Safi Amaro Monteiro pela ajuda na aquisição da cepa.

Ao meu noivo Eduardo El Akkari Sallum, pelo acolhimento, amor e por tantos momentos de alegria e confraternização. A convivência com você ressignificou o meu conceito de família. Obrigada também, pelo apoio e pela torcida!

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela concessão da bolsa de mestrado.

## RESUMO

RICACZESKI, Cecília Claudete. **Produção de enzimas ligninolíticas a partir de um processo fermentativo em efluente têxtil por *Phanerochaete chrysosporium***. 2020. 57 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2020.

Os efluentes são um desafio para as indústrias têxteis, pois não podem ser lançados ao meio ambiente sem o devido tratamento. A biodegradação tem sido cada vez mais explorada como uma alternativa para o tratamento desse tipo de efluente, permitindo a coprodução de moléculas de interesse comercial. A proposta deste trabalho, é avaliar a produção de enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase a partir um efluente têxtil utilizando o fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Os resultados do trabalho indicaram uma atividade de 15,32 U.L<sup>-1</sup> para manganês peroxidase de e 70 U.L<sup>-1</sup> para lignina peroxidase. Demonstrando que o processo estudado é promissor para a produção de enzimas ligninolíticas a partir de um efluente têxtil suplementado. Estas enzimas podem ser posteriormente utilizadas no processo fabril têxtil para reduzir o peróxido de hidrogênio utilizado no processo de alvejamento e também podem ser utilizadas após o tingimento, para a redução de corantes residuais, agregando sustentabilidade e fomentando uma economia circular.

**Palavras-chaves:** Enzimas. *Phanerochaete chrysosporium*. Indústria Têxtil.

## ABSTRACT

RICACZESKI, Cecilia Claudete. **Production of ligninolytic enzymes from a fermentation process in textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium***. 2020. 57 p. Thesis (Master's Degree in Chemical Engineering) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2020.

Effluents are a challenge for the textile industries, as they cannot be released into the environment without proper treatment. Biodegradation has been increasingly explored as an alternative for the treatment of this type of effluent, allowing the coproduction of molecules of commercial interest. The purpose of this work is to evaluate the production of lignin peroxidase and manganese peroxidase enzymes from a textile effluent using the fungus *Phanerochaete chrysosporium*. The results of the work indicated an activity of 15.32 U.L<sup>-1</sup> for manganese peroxidase and 70 U.L<sup>-1</sup> for lignin peroxidase. Demonstrating that the studied process is promising for the production of ligninolytic enzymes from a supplemented textile effluent. These enzymes can later be used in the textile manufacturing process to reduce the hydrogen peroxide used in the bleaching process and they can also be used after dyeing, to reduce residual dyes, adding sustainability and fostering a circular economy.

**Keywords:** Enzymes. *Phanerochaete chrysosporium*. Textile industry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organograma dos métodos de tratamento de efluentes industriais .....	17
Figura 2 - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> observado no microscópio.....	20
Figura 3 - <i>Pellets</i> de <i>P.chrysosporium</i> obtidos em cultivo .....	32
Figura 4 - Curva de crescimento do fungo <i>P.chrysosporium</i> .....	33
Figura 5 - Resultado da primeira otimização: (a) fosfato x CN, (b) pH x CN e (c) fosfato x pH .....	37
Figura 6 - Curva superfície de resposta .....	38
Figura 7 - Superfície de resposta .....	39
Figura 8 - (a) Meio de contendo guaiacol no momento da inoculação, (b) Desenvolvimento de halo avermelhado em meio contendo guaiacol após 8 dias de incubação .....	41
Figura 9 - Meio com guaiacol e sem ajuste de pH após 8 dias de incubação .....	42
Figura 10 - (a) Biorreator utilizado no processo, (b) Biorreator com o efluente suplementado e o fungo <i>P. chrysosporium</i> .....	43
Figura 11 - Demanda de O <sub>2</sub> pelo tempo.....	43
Figura 12 - Processo circular resultante do uso de águas residuais têxteis para a produção de peroxidases por <i>P.chrysosporium</i> .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i> para biodegradação ..	18
Tabela 2 - Otimização baseada nos primeiros resultados.....	29
Tabela 3 - Valores dos parâmetros e limites de lançamento do efluente .....	34
Tabela 4 - Otimização .....	36
Tabela 5 - Resultados da segunda otimização.....	38
Tabela 6 - Equação do modelo quadrático completo que melhor se ajusta aos resultados alcançados na otimização.....	40
Tabela 7 - Resultado da análise estatística ANOVA .....	41
Tabela 8 - Valores comparativos encontrados em outros estudos.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

P <sub>1</sub>	Tara da cápsula (g)
P <sub>2</sub>	Cápsula com amostra após secagem (g)
P <sub>3</sub>	Cápsula com amostra após calcinação (g)
PUF	Espuma de poliuretano
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl, em mgN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L
R	Volume do caldo enzimático (mL)
T	Tempo da reação (min.)
V <sub>1</sub>	Volume da solução de ácido utilizado para titular a amostra (mL)
V <sub>2</sub>	Volume da solução de ácido utilizado para titular o branco (mL)
V <sub>amo</sub>	Volume da amostra (mL)
N <sub>ácido</sub>	Normalidade da solução de ácido utilizado na titulação.
Δ Abs.	Absorbância [Abs. Final (T <sub>10</sub> ) - Abs. Inicial (T <sub>0</sub> )];
ε	Coefficiente de absorção molar (L.M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> );
ABIT	Associação Brasileira de Indústrias Têxteis
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
LiP	Lignina Peroxidase
MgP	Manganês Peroxidase
NaOH	Hidróxido de Sódio
OD	Oxigênio Dissolvido
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
SST	Sólidos em Suspensão Totais
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
VA	Álcool Veratrílico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL E EFLUENTE TÊXTIL .....	16
2.2 TRATAMENTOS DE EFLUENTES TÊXTEIS .....	16
2.3 BIODEGRADAÇÃO .....	17
2.4 BIOECONOMIA .....	18
2.5 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	19
2.6 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS .....	20
2.6.1 Utilização Das Peroxidases .....	21
2.6.2 Fatores Que Interferem Na Atividade Das Ligninases .....	22
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>24</b>
3.1 MICRORGANISMO .....	24
3.1.1 Manutenção .....	24
3.1.2 Esporulação .....	24
3.1.3 Curva De Crescimento .....	24
3.2 COLETA DO EFLUENTE .....	25
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE .....	25
3.3.1 Determinação De pH .....	25
3.3.2 Determinação De Açúcares Totais .....	25
3.3.3 Determinação De Sólidos Totais, Fixos e Voláteis .....	25
3.3.4 Determinação De DQO .....	26
3.3.5 Determinação De Nitrogênio Total .....	26
3.4 OTIMIZAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS .....	28
3.5 PRODUÇÃO DE PEROXIDASE .....	29
3.6 CONFIGURAÇÃO DO BIORREATOR E CONDIÇÕES OPERACIONAIS .....	30
3.7 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA MANGANÊS PEROXIDASE (MnP) E LIGNINA PEROXIDASE (LiP) .....	30

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
4.1 CURVA DE CRESCIMENTO .....	32
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE .....	33
4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE BIOMASSA EM EFLUENTE INDUSTRIAL .....	35
4.4 PRODUÇÃO DE PEROXIDASES .....	41
4.5 CULTIVO EM BIORREATOR.....	42
4.6 PRODUÇÃO DE MANGANÊS PEROXIDASE (MnP) E LIGNINA PEROXIDASE (LiP) POR FERMENTAÇÃO .....	44
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO A - DEPÓSITO NA COLEÇÃO MICROBIOLÓGICA DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO .....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As indústrias têxteis (incluindo a cultura do algodão) consomem cerca de 93 bilhões de metros cúbicos de água anualmente, representando 4% da captação global de água doce para o processamento das fibras, tecidos e outros, gerando grandes quantidades de efluentes (THECONSCIOUSCHALLENGE, 2019).

Esses efluentes geralmente possuem alta carga orgânica, forte cor e uma composição complexa que lhe confere potencial carcinogênico e mutagênico. Dentre os produtos químicos nocivos ao meio ambiente utilizados durante o processamento na indústria têxtil se destacam os corantes, compostos aromáticos recalcitrantes, tóxicos e xenobióticos que possuem benzeno em sua base estrutural.

O tratamento físico-químico dos efluentes têxteis não é totalmente viável, visto o alto custo deste. O tratamento biológico surge, então, como uma alternativa promissora, pois além da versatilidade dos microrganismos frente aos compostos a serem degradados, este ainda permite que através de processos biológicos seja possível associar o tratamento de efluentes com a produção de biomoléculas que podem agregar valor à cadeia produtiva.

O uso de fungos para o tratamento de efluentes têm grande potencial uma vez que tais microrganismos possuem um aparato metabólico robusto e são reconhecidos por produzirem grandes quantidades de enzimas capazes de degradar os compostos presentes no efluente. O grupo Basidiomiceto é o mais estudado pelo fato de possuir alto potencial de biorremediação (recuperação de ambientes degradados).

O fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* tem sido frequentemente empregado para a degradação de corantes sintéticos devido à sua alta produção de enzimas ligninolíticas extracelulares não específicas com alto poder oxidativo. Algumas delas, como a lignina peroxidase e a manganês peroxidase possuem alta capacidade de degradar poluentes em geral.

O presente trabalho, se dispôs a avaliar a produção de enzimas ligninolíticas pelo fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* cultivado em biorreator de bancada em meio composto por um efluente da indústria têxtil. Neste processo, o efluente têxtil é o substrato para o crescimento do referido fungo, que produz enzimas ligninolíticas (manganês peroxidase e lignina peroxidase) que podem ser reutilizadas na própria indústria têxtil (podendo ser utilizadas para reduzir o peróxido de hidrogênio utilizado no processo de alvejamento e também após o tingimento, para a redução de

corantes residuais), agregando valor ao efluente e gerando circularidade. Este estudo é inovador na literatura visto que até o momento não se têm estudos com a finalidade de produzir enzimas a partir de um efluente têxtil para utilizá-las na própria indústria têxtil que o gerou.

### 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de enzimas ligninolíticas pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* cultivado em um efluente de indústria têxtil, em biorreator batelada.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efluente têxtil (carboidratos, pH, nitrogênio total, DQO (Demanda química de oxigênio), cátions e ânions);
- Otimizar as condições operacionais de crescimento do fungo por meio de planejamento fatorial;
- Realizar o cultivo do fungo em biorreator de bancada;
- Efetuar o teste com Guaiacol para observar se ocorre a produção de peroxidase;
- Avaliar quantitativamente a produção de enzimas ligninolíticas (manganês peroxidase e lignina peroxidase) em efluente têxtil pela ação do fungo em estudo;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL E EFLUENTE TÊXTIL

De acordo com dados obtidos junto a ABIT (2019), o Brasil no ano de 2017 apresentou um faturamento da Cadeia Têxtil e de Confecção de US\$ 51,58 bilhões, sendo que os investimentos no setor chegaram a R\$ 3,1 milhões com produção média de confecção de 8,9 bilhões de peças, 1,5 milhão de empregados diretos sendo o segundo maior empregador da indústria de transformação perdendo apenas para bebidas e alimentos. O Brasil é ainda autossuficiente na produção de algodão, 9,4 bilhões de peças confeccionadas ao ano.

Apesar dos benefícios sociais e econômicos deste segmento, as indústrias têxteis utilizam grande quantidade de produtos químicos durante seu processamento. Além de consumirem um grande volume de água para o desenvolvimento de sua atividade, desta forma produz grandes volumes de um efluente complexo e extremamente colorido, apresentando-se como atividade potencialmente poluidora (SANTOS, 2017).

Além dos efluentes têxteis apresentarem forte coloração devido à presença de corantes que não se fixam adequadamente às fibras no processo de tingimento, ocorre também a presença de compostos orgânicos como aminas, dextrinas, gomas, graxas, pectinas, álcoois, ácido acético, sabões e detergentes e compostos inorgânicos como hidróxido de sódio, carbonato, sulfato e cloreto, que conferem aos efluentes elevados níveis de DQO, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Sólidos em Suspensão Totais (SST) e baixas concentrações de Oxigênio Dissolvido (OD), afetando a biota aquática se descartados no corpo receptor sem nenhum tratamento prévio (QUEIROZ *et al.* 2016).

Dessa forma, é extremamente importante que esses efluentes possuam um tratamento adequado para que não poluam o meio ambiente.

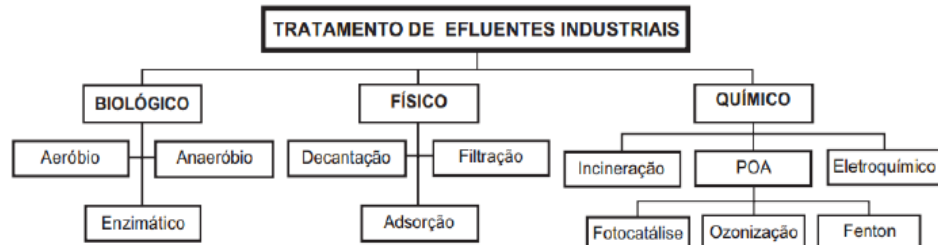
### 2.2 TRATAMENTOS DE EFLUENTES TÊXTEIS

Existem diferentes métodos para a remoção de poluentes dos efluentes têxteis, estes métodos podem ser divididos basicamente em três categorias a biológica, química e física (Figura 1) (FREIRE *et al.* 2000). Sendo que o biológico tem sido



intensamente estudado com a finalidade de remover compostos tóxicos do ambiente (KAMIDA e DURRANT, 2015).

**Figura 1: Organograma dos métodos de tratamento de efluentes industriais**



**Fonte: Freire et al., 2000**

Para o tratamento de efluentes têxteis, a maior ênfase tem sido dada ao estabelecimento de metodologias que combinam os processos biológicos com outras alternativas como as físicas ou físico-químicas, tais como floculação, adsorção ou oxidação eletroquímica seguidas de tratamento biológico (CARDOSO, 2010).

Dentre os processos biológicos, destaca-se a biorremediação técnica que utiliza os microrganismos como fungos, bactérias, algas ou a produção de enzimas proveniente deles com o propósito de degradar, reduzir e eliminar poluentes do meio ambiente (PIRES, 2013).

### 2.3 BIODEGRADAÇÃO

As pesquisas de degradação de compostos químicos têm mostrado vários microrganismos extremamente versáteis na degradação de substâncias recalcitrantes. Os caminhos atuais da biotecnologia indicam fungos basidiomicetos degradadores de lignina, como eficientes na degradação de grande variedade de compostos e de corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (KAMIDA et al. 2005).

A motivação de grande parte dos pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação pode ser expressa pela busca contínua de microrganismos versáteis, capazes de degradar de maneira eficiente um grande número de poluentes a um baixo custo operacional, e de preferência gerando algum bioproduto com valor comercial.

Um fungo que é capaz de mineralizar, além da lignina, parcialmente e ou completamente uma variedade de poluentes de difícil degradação é o *Phanerochaete*

*chryso sporium*. Este fungo é frequentemente citado pela literatura, conforme demonstra a Tabela 1.

**Tabela 1: Estudo utilizando *Phanerochaete chryso sporium* para biodegradação**

Estudo	Autor
Biodegradação do DDT por <i>P. chryso sporium</i> .	ZHENG <i>et al.</i> 2012
Biodegradação do antibiótico sulfametoxazol por <i>Phanerochaete chryso sporium</i> .	GUO <i>et al.</i> 2014
Biotratamento de efluente têxtil em biorreator estático por <i>Curvularia lunata</i> URM 6179 e <i>Phanerochaete chryso sporium</i> URM 6181.	MIRANDA <i>et al.</i> 2013
Biodegradação de petróleo bruto de águas residuais salinas utilizando o fungo podridão branca <i>Phanerochaete chryso sporium</i> .	BEHNOOD <i>et al.</i> 2014
Biodegradação de polipropileno isotático (iPP) / poli (ácido láctico) (PLA) e iPP / PLA / carbonatos de nano cálcio usando <i>Phanerochaete chryso sporium</i> .	SHIMPI <i>et al.</i> 2018
Biodegradação de sulfadiazina por <i>Phanerochaete chryso sporium</i> : identificação de mecanismos e produtos de degradação.	ZHANG <i>et al.</i> 2019

**Fonte: Aatoria Própria**

O fungo *Phanerochaete chryso sporium* recebeu atenção devido à sua capacidade de atacar uma ampla gama de poluentes e seu rápido crescimento (GUO, *et al.* 2014). Ele tem a capacidade de mineralizar, além da lignina, pelo menos parcialmente e em alguns casos completamente, uma variedade de poluentes tradicionalmente resistentes à biodegradação. Isso advém do sistema lignolítico deste fungo que é representado principalmente pelas enzimas lignina e manganês peroxidase que têm a capacidade de despolimerizar a lignina em uma grande variedade de outros compostos. Por este motivo alguns estudos têm sido realizados explorando sua capacidade de degradar e mineralizar corantes advindos da indústria têxtil.

## 2.4 BIOECONOMIA

A indústria da moda, incluindo a têxtil e do vestuário, geram poluição ambiental significativa em cada etapa do ciclo de vida. Como os consumidores estão cada vez

mais conscientes desta realidade, eles também estão mais exigentes e vem buscando produtos fabricados a partir de recursos sustentáveis, com impacto ambiental mínimo. A sustentabilidade se tornou a vanguarda da moda e a economia circular e a bioeconomia fazem parte desse processo.

A bioeconomia é um dos principais pilares da sustentabilidade pois maximiza a utilização de produtos biológicos, resíduos e outros produtos resultantes da transformação de recursos biológicos, com o objetivo de minimizar o desperdício da cadeia produtiva e reduzir a pressão sobre o meio ambiente (CUNHA, 2016). Isso representa um benefício geral por dois principais motivos. O primeiro deles é uma finalidade útil para um material que seria descartado. O segundo é a obtenção de uma matéria-prima de custo reduzido (FARIA, 2019).

Ao contrário dos processos químicos, tradicionalmente utilizados nas indústrias, a utilização de enzimas e microrganismos permite, de maneira geral, a formação de produtos que geram menos resíduos, utilizam menores quantidades de água em sua produção e são mais facilmente degradados (processos ambientalmente amigáveis), e também aumenta o rendimento dos processos e diminui o requerimento de energia (FARIA, 2019).

O mais interessante é que tanto bactérias quanto fungos são capazes de utilizar naturalmente esses resíduos, não só para crescer, mas também para gerar produtos de interesse humano. O uso desses organismos pode ajudar, inclusive, a dispensar etapas custosas do processo. Ou seja, os resíduos representam uma matéria-prima vantajosa tanto do ponto de vista ambiental, quanto econômico.

### 2.5 *Phanerochaete chrysosporium*

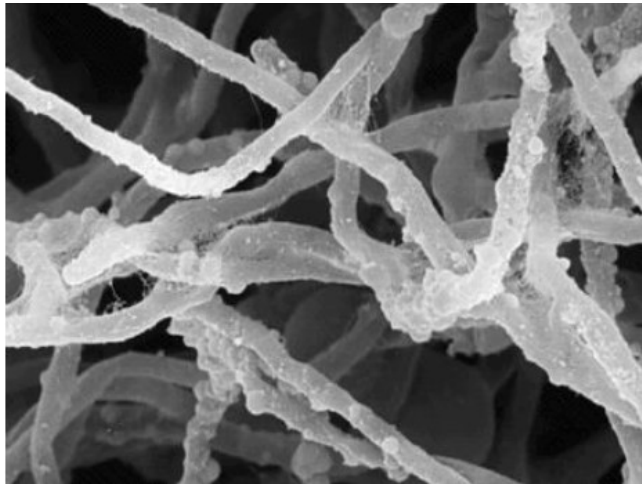
É um decompositor secundário de madeira, podendo ser encontrado em florestas de toda América do Norte, Europa e Irã. Essa espécie é o representante mais estudado dos fungos causadores da “podridão branca” os quais são conhecidos por sua habilidade de degradar lignina de madeira, e descolorir a pigmentação marrom associada com esse biopolímero. Essa habilidade tem gerado muito interesse para indústria de polpa e papel como um começo ambientalmente alternativo para o clareamento químico de polpa (FILHO, 2005).

O *Phanerochaete chrysosporium* secreta enzimas ligninolíticas extracelulares não específicas. A produção e a secreção das enzimas dependem da limitação de nutrientes, que pode ser carbono ou nitrogênio e não necessariamente do próprio

poluente, facilitando o desenvolvimento, controle e manipulação de um bioprocesso. Ainda, o eficiente sistema enzimático extracelular permite que ele tolere altas concentrações de efluente (KAPDAN *et al.* 2000).

Uma vantagem notável da espécie *P.chrysosporium* é sua capacidade de competir com outros microrganismos que venham contaminar o meio. Um dos fatos que explicam essa capacidade é a temperatura ideal de crescimento desse fungo (entre 37 e 39°C) e a sua capacidade de lançar esporos ao meio externo (MASARIN, 2018). O que em escala industrial é uma grande vantagem pois produz esporos com muita facilidade, além de ser um processo robusto com baixa taxa de contaminação. A Figura 2 ilustra as hifas deste fungo.

**Figura 2: *Phanerochaete chrysosporium* observado no microscópio**



Fonte: JGI, 2019

## 2.6 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Enzimas podem ser rapidamente definidas como proteínas com poder catalítico. O fungo *Phanerochaete chrysosporium* produz as peroxidases e lacases, as quais são extracelulares e apresentam baixa especificidade para o substrato, tornando estes organismos bastante interessantes para o tratamento de resíduos de características variadas como os resíduos têxteis. As principais enzimas envolvidas são lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases (SOUZA, 2012).

A lignina peroxidase (LiP) foi descoberta em 1984 em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* (TIEN e KIRK, 1984). A LiP é uma glicoproteína, composta por 20-30% de açúcar, possui ferro como grupo prostético e necessita de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para a sua atividade catalítica. Sua massa molar é de aproximadamente 38-43

Kda, tendo ponto isoelétrico entre 3,2 e 4,0 e pH ótimo de atividade entorno de 3,0, é produzida durante o metabolismo secundário do fungo, pela falta de nutrientes (MOREIRA, 2006). A lignina peroxidase (MnP) é uma glicoproteína com ferro protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para sua atividade, onde seu ponto isoelétrico é cerca de 4,9 e massa molar entre 38 – 62,5 Kda. Seu ciclo catalítico é semelhante ao da Lignina Peroxidase, porém, o Mn<sup>2+</sup> atua como doador de elétrons (HOLZAPFEL, 2002).

### 2.6.1 Utilização Das Peroxidases

As peroxidases são grupos de enzimas oxi-redutases que catalisam a redução do peróxido e a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos. A sua ação enzimática é obtida da redução cíclica do átomo de ferro no grupo hematina. Na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a enzima se combina com esta molécula, formando um complexo que pode oxidar uma variedade de doadores de elétrons, formando água no final (SOUZA, 2012).

Compreendem enzimas extracelulares dependentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para atuarem sobre a lignina, desempenhando importante papel durante a degradação do substrato. A enzima peroxidase é conhecida por sua capacidade de remoção de grupos fenólicos e aminas aromáticas de soluções aquosas (ELY *et al.* 2016).

Na indústria de papel e celulose, a peroxidase é utilizada na etapa de branqueamento da polpa e no tratamento de seus efluentes (SOUZA, 2012). O uso de MnP no branqueamento de polpas promove altos níveis de deslignificação e de alvura. No entanto, requer a presença de vários coadjuvantes no meio reacional (RESENDE, 2017). Na indústria têxtil é utilizada para melhorar o branqueamento, inibir a transferência de cor durante a lavagem e para a remoção do excesso de corante da água de lavagem de tecidos tingidos (SOUZA, 2012).

Os resíduos de peróxido de hidrogênio, utilizados na etapa de alvejamento de tecidos, em contato com pigmentos sensíveis à oxidação podem sofrer pequenas alterações na tonalidade (quantidades de 15ppm de peróxido residual causam redução na cor). No processo convencional, os resíduos de peróxido de hidrogênio são removidos através de vários enxágues ou da adição de um redutor inorgânico. No entanto, estes causam grande carga de sais nos efluentes. Neste caso, pode-se utilizar as peroxidases para reduzir o peróxido de hidrogênio. Além disso, os produtos

(efluentes) desta reação não causam problemas ecológicos, como a elevada carga de sais, e a quantidade de enzimas usada é muito menor que a quantidade de agente redutor inorgânico. As peroxidases também podem ser utilizadas após o tingimento, para a redução de corantes residuais (FERRANTE, 2011).

No processo de tingimento com corantes reativos ocorre um grau de hidrolização do corante, ou seja, em vez de reagir com a fibra, ele reage com a água do banho e fica depositado sobre o tecido. Como resultado negativo deste processo, as cores escuras apresentam forte deficiência de solidez à lavagem (quando se lava em casa e a água fica tingida da cor da roupa lavada, além de manchar peças de outra cor). Essas enzimas destroem este corante hidrolisado, garantindo melhor qualidade, economizando água e tempo no processo (MONTEIRO, 2010). Isso mostra uma interessante particularidade do processo que está sendo proposto neste trabalho: a possibilidade de se utilizar um efluente têxtil para produção de um bioproduto utilizado pela própria indústria, promovendo, assim, a valorização de um subproduto e a promoção de bioeconomia e economia circular.

Desta forma, a utilização de enzimas oxidativas se mostra como um processo alternativo para realizar o tratamento de efluentes. As enzimas apresentam propriedades interessantes como requisitos de baixa energia, processo de fácil controle e operação numa ampla faixa de pH (2,0 a 8,0) e concentração de contaminantes, sendo dependentes do tipo de substrato e possuem um baixo impacto sobre os ecossistemas (ELY *et al.* 2016).

### 2.6.2 Fatores Que Interferem Na Atividade Das Ligninases

Vários fatores afetam a produção de ligninases, como a concentração de nitrogênio e/ou carbono do meio de cultura, condições de incubação do fungo (meio estático ou agitado, pH, temperatura) (ARAKAKI, 2011).

No estudo desenvolvido por Sharari *et al.*, 2013, observou-se que a eficiência do tratamento de águas residuais foi aumentada pela imobilização do fungo em comparação com o tratamento com células livres. Concluindo que a imobilização de *P. chrysosporium* em PUF (espuma de poliuretano) aumenta sua eficiência na degradação dos poluentes do efluente do bagaço. Isso pode ser explicado pela natureza porosa do PUF que aumenta a difusão de oxigênio, resultando em um aumento da produção de enzimas ligninolíticas, a imobilização de *P. chrysosporium*no

PUF permitiu um aumento na área de contato interfacial líquido micélio/cultura e uma diminuição das forças de cisalhamento.

A produção das enzimas ligninolíticas é sensível às forças de cisalhamento. Uma variedade de sistemas de imobilização é usada como a teia de nylon, espuma de poliuretano, material plástico poroso, tubo de silicone e vidro sinterizado (SEDIGHI *et al.* 2009).

No estudo desenvolvido por Yu *et al.*, 2004, em que se observou que a relação C/N média exerceu influência diferente sobre a produção de LiP e MnP em cultura não imersa de *P. chrysosporium*. LiP foi sintetizado sob limitação de carbono e não sob limitação de nitrogênio, indicando que uma baixa relação C/N era vantajosa para Produção de LiP. Por outro lado, a significativa produção sob limitação de nitrogênio ou alto teor de carbono condições (56 mM / 44 mM) e a formação reprimida em uma baixa concentração de carbono (28 mM / 44 mM) sugeriu que a síntese de MnP preferia uma alta nível de carbono.

Desta forma é possível perceber a necessidade de estudar e estabelecer as condições ótimas de operação, visto que as condições de operação bem como nutrientes presentes podem estimular a produção de enzimas ligninolíticas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MICRORGANISMO

##### 3.1.1 Manutenção

A cepa do fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi obtida por doação da EMBRAPA Ceará e registrado no banco de cepas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa com o número CMIB-206. Foi realizado também a identificação molecular da linhagem em estudo, que se encontra no Anexo A, para verificar se a cepa obtida por doação era realmente do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

A espécie fúngica foi cultivada em meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Para a manutenção da cepa, o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos, após o resfriamento, foi inoculado em câmara de fluxo laminar e levado a estufa de 39°C por cinco dias e posteriormente guardado sob refrigeração a 4°C (HUANG *et al.* 2010).

##### 3.1.2 Esporulação

Para a esporulação o meio BDA foi esterilizado a 121°C por 15 min e após o resfriamento o fungo foi inoculado e incubado por 10 dias em estufa a 30°C.

Após o período de incubação foi adicionado água destilada estéril sobre as placas, com objetivo de obter-se uma suspensão de esporos. A concentração de esporos foi avaliada em microscópio com uma câmara de Neubauer e ajustada para  $2,0 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> (HUANG *et al.* 2010; CUNHA, A. L. *et al.* 2012).

##### 3.1.3 Curva De Crescimento

Alíquotas de 1 mL da suspensão de esporos foram inoculadas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio extrato de malte 2%. Os frascos foram incubados a 37°C, durante 216 horas (9 dias), sob agitação de 100 rpm. Amostras foram retiradas a cada 24 horas. A biomassa foi obtida por filtração e seca em estufa a 80°C por 24 horas. A média do peso seco, em duplicata, foi utilizada para estabelecer o gráfico correspondente a curva de crescimento (HUANG *et al.* 2010; FILHO, 2005).



## 3.2 COLETA DO EFLUENTE

O efluente foi coletado em uma indústria têxtil localizada na cidade de Quedas do Iguaçu – PR e congelado sem filtrar em um freezer a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

Após o descongelamento, devido à presença de partículas sólidas (fiapos de tecido), o efluente foi filtrado utilizando papel filtro de 90 mm de espessura e retenção de partículas de  $4\text{-}12\mu\text{m}$  para uso posterior.

## 3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

### 3.3.1 Determinação De pH

O pH foi determinado por meio do pHmetro digital modelo Pro-01-1014.

### 3.3.2 Determinação De Açúcares Totais

Para determinação de açúcares totais foi utilizado o método Fenol Sulfúrico, no qual o sistema de reação compreende 1 mL de amostra ou de padrão e 1 mL de fenol, ao qual se adiciona, rapidamente, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Como a reação é exotérmica, foi resfriado à temperatura ambiente antes de fazer a leitura da absorbância a 490 nm (DUBOIS et al., 1956).

Para obtenção da curva padrão, 10 mg de glicose foi diluída em água utilizando um balão de 25 ml, obtendo assim uma concentração de  $100\text{ mg.L}^{-1}$ . Posteriormente foram realizadas diluições para obter concentrações de 80,70, 60, 50, 40, 30, 20, e  $10\text{ mg.L}^{-1}$ .

### 3.3.3 Determinação De Sólidos Totais, Fixos e Voláteis

Todas as substâncias que permaneçam na cápsula após a total secagem de um determinado volume de amostra são determinadas de sólidos totais. Após a etapa de evaporação a amostra foi para o forno mufla, sendo que as substâncias que permanecerão na cápsula após calcinação são os sólidos fixos. Do resultado da subtração entre os sólidos totais e os sólidos fixos tem-se os sólidos voláteis (APHA, 1999).

- Preparação da cápsula: A cápsula de porcelana foi lavada com água destilada, seca e calcinada a  $550^{\circ}\text{C}$  por 1 (uma) hora em forno mufla. Posteriormente

deixada em um dessecador para esfriar até temperatura ambiente. Em seguida pesou ( $P_1$ ) g.

- Evaporação da amostra: Uma alíquota da amostra (com um volume de amostra pré-determinado) foi transferido para a cápsula. Seca em estufa ( $105 \pm 2^\circ\text{C}$ ) até peso constante. A cápsula foi colocada em dessecador para esfriar até temperatura ambiente. Pesou afim de obter o  $P_2$  (g).
- Calcinação da amostra: Após execução da etapa anterior, a cápsula com o resíduo da foi seca em forno-mufla ( $550 \pm 50^\circ\text{C}$ ) por 30 minutos. Ao final transferiu-se para um dessecador até atingir temperatura ambiente. Pesou então o  $P_3$  (g).
- Cálculos dos sólidos totais e fixos são obtidos pelas Equações 1, 2 e 3:

$$\text{Sólidos Totais} = \left( \frac{P_2 - P_1}{\text{vol. am.}} \right) * 10^5 \quad (1)$$

$$\text{Sólidos Fixos} = \left( \frac{P_3 - P_1}{\text{vol. am.}} \right) * 10^5 \quad (2)$$

$$\text{Sólidos Voláteis} = \text{Sólidos Totais} - \text{Sólidos Fixos} \quad (3)$$

Em que:

$P_1$  = Tara da cápsula (g);

$P_2$  = Cápsula com amostra após secagem (g);

$P_3$  = Cápsula com amostra após calcinação (g);

vol.am. = Volume da amostra (mL).

### 3.3.4 Determinação De DQO

A DQO foi determinada utilizando o Kit Hach. O procedimento de análise requer digestão da amostra no reator modelo Hach DRB200 com orifícios para tubos de ensaio de 16mm de diâmetro. Após a digestão foi realizada a leitura em um espectrofotômetro Hach modelo DR 6000.

### 3.3.5 Determinação De Nitrogênio Total

O princípio baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio por meio da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada (APHA, 1999).

### 3.3.5.1 Método Micro-Kjeldahl

Para determinação do Nitrogênio total Kjeldahl NTK, pelo método do Micro-Kjeldahl, foram reduzidos os valores de amostra e reagente como segue.

- Para a digestão: Foi colocado no tubo digestor de nitrogênio (macro) 5,0 mL da amostra bruta; 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado P.A.; 0,6 g de sulfato de potássio P.A.; 0,2 g de sulfato de cobre P.A. e 2 a 3 pérolas de vidro.
- Para a destilação: O procedimento foi realizando tanto para as amostras quanto para o branco. Em frasco de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de solução de ácido bórico (2%) e 4 a 5 gotas do indicador misto, completado com amostra/branco até o conteúdo de 100 mL. Antes de iniciar a destilação, após o tubo estar devidamente encaixado no equipamento de destilação, foi adicionado cuidadosamente NaOH (50%) até que a amostra apresentasse coloração marrom escura.
- Para a titulação: Foi realizado teste em branco com solução padronizada de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N, até coloração alaranjada clara. Para as demais amostras, a coloração do branco foi tomada como padrão.

A concentração do nitrogênio total Kjeldahl foi calculada pela Equação 4:

$$N_{NTK} = \frac{(V_1 - V_2)}{V_{am}} * N_{ácido} * 14.000 \quad (4)$$

Em que:

$N_{NTK}$  = Concentração do nitrogênio total Kjeldahl, em mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L;

$V_1$  = Volume da solução de ácido utilizado para titular a amostra (mL);

$V_2$  = Volume da solução de ácido utilizado para titular o branco (mL);

$V_{am}$  = Volume da amostra (mL);

$N_{ácido}$  = Normalidade da solução de ácido utilizado na titulação.

### 3.3.6 Determinação De Cátions e Ânions

Foram determinadas a concentrações de cátions (Na, K, Mg, Ca e NH<sub>4</sub>) e ânions (Cl, SO<sub>4</sub>, F, Br, NO<sub>3</sub> e PO<sub>4</sub>) presentes no efluente têxtil. A determinação dos

cátions foi realizada com um cromatógrafo 761 Compact IC 817 Bioscan. A coluna utilizada foi METROSEP C3 250/4,0 (Metrohm), 250 mL x 4,0 mmID. As condições analíticas foram: HNO<sub>3</sub> 3,5 mM, 1,0 mL/min, 40°C, volume de amostra de 20 µL, 11,2 MPa. Um cromatograma padrão foi preparado com os seguintes sais: CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>Cl e FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (SYDNEY *et al.* 2011).

Para os ânions, a coluna utilizada foi uma METROSEP a Supp 5 250/4.0 (Metrohm), 250 ml x 4,0 mm de ID. As condições analíticas foram as seguintes: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1,0 mM, 0,7 ml/min, 25°C, volume de amostra de 20 µL, 11,3 MPa. Um cromatograma padrão foi preparado com os seguintes sais: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, NaF, NaNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e KBr (SYDNEY *et al.* 2011).

### 3.4 OTIMIZAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

Levando em consideração os resultados obtidos nos testes preliminares foi elaborado um planejamento experimental tipo Superfície de resposta. Em que as variáveis independentes foram pH, relação carbono/nitrogênio e fósforo, e a variável dependente a produção de biomassa.

A otimização foi realizada usando uma ferramenta estatística intitulada como *Experimental Essential Design*, versão 2.213. O planejamento composto de 3 ponto central com 3 variáveis e 5 níveis. A concentração de fósforo variou de 0,2 a 1,4 g.L<sup>-1</sup>, valores de pH 3 a 8 relação e C/N de 5 a 30, sendo que o valor do nitrogênio permaneceu constante em 0.178 g.L<sup>-1</sup>, variando assim a concentração de glicose afim de obter a relação C/N.

Com os resultados da primeira otimização foi realizada uma nova otimização composta de 3 ponto central (amostras 1, 2 e 7) com 2 variáveis e 5 níveis. Em que as variáveis foram relação C/N (0 a 30) e valores de pH (7 a 13), o fósforo foi mantido fixo no ponto central (Tabela 2).

**Tabela 2: Otimização baseada nos primeiros resultados**

Experimento	pH	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )
1	10,5	6,50
2	10,5	6,50
3	14,0	6,50
4	10,5	13,00
5	8,0	1,90
6	8,0	11,10
7	10,5	6,50
8	7,0	6,50
9	13,0	11,10
10	13,0	1,90
11	10,5	0,00

Fonte: Autoria Própria

Também foi calculado o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para determinar a qualidade de ajuste aos dados e o teste de Durbin-Watson para independência dos erros, considerando 5% de nível de significância.

### 3.5 PRODUÇÃO DE PEROXIDASE

Antes do efluente ir para o biorreator o fungo *P. Chrysosporium* foi testado quanto à sua capacidade de produzir peroxidase quando inoculado no efluente em estudo com as condições ótimas encontradas nos testes anteriores.

Para a verificação da produção de peroxidase foi empregada a metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975), com modificação, contendo: 100 ml do efluente, 1,1 g de glicose, 0,08 g de  $K_2HPO_4$ , 0,084 g de  $(NH_4)_2SO_4$ , 10  $\mu$ L de guaiacol, 1,6 g de ágar.

O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos, após o resfriamento, foi inoculado em câmara de fluxo laminar e levado a estufa de 37°C por 8 dias. O teste foi realizado com ajuste de pH no ponto ótimo encontrado e sem ajuste de pH.

A produção de cor avermelhada abaixo e ao redor da colônia do fungo foi considerada uma reação positiva resultante da oxidação do guaiacol em tretaguaiacol (ZERAİK *et al.* 2008).

### 3.6 CONFIGURAÇÃO DO BIORREATOR E CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Primeiramente foi realizada imobilização do fungo *P. chrysosporium*. O material utilizado para a imobilização da biomassa foi espuma de poliuretano, em que 8 g da espuma foram cortadas em cubos de 1 cm de arestas. Os cubos foram então agrupados com auxílio de gaze. O material foi previamente esterilizado, já dentro do biorreator, em autoclave a 121°C durante 15 minutos (SANTOS, 2017).

Posteriormente, o meio extrato de malte 2% estéril foi adicionado no biorreator juntamente com o inóculo na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Com a finalidade de otimizar a fixação dos esporos, o meio foi mantido por 24 horas sem a reação seguido de 48 horas com areação, conforme o procedimento descrito em Rodrigues *et al.* (2011). Ao final deste período o meio foi substituído pelo efluente têxtil esterilizado já na condição ótima de pH, fósforo e relação C/N (ver seção 3.4). A temperatura foi mantida em 37° C e rotação de 80 rpm.

O Biorreator foi monitorado quanto ao consumo de oxigênio, pH, rotação e temperatura. Ao final dos 8 dias o efluente foi retirado do biorreator e analisado o valor de DQO, açúcares totais e enzimas Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA MANGANÊS PEROXIDASE (MnP) E LIGNINA PEROXIDASE (LiP)

A atividade de MnP na solução enzimática bruta foi determinada avaliando-se a oxidação do vermelho de fenol na presença de manganês e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30°C. Em uma mistura de reação composta de 100 µL de tampão lactato de sódio (0,25 mol.L<sup>-1</sup>), 50 µL de solução de MnSO<sub>4</sub> (2,0 mmol.L<sup>-1</sup>), 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão succinato de sódio (0,2 mol.L<sup>-1</sup>) em pH 4,5, 200 µL de albumina bovina (0,5%) e 600 µL da solução enzimática bruta (sobrenadante).

A reação foi iniciada com a adição de 100 µL de vermelho de fenol (0,1%) e a absorbância medida a 610 nm. Adicionou-se 40 µL de NaOH (2,0 N) como solução “stop” da reação após 10 minutos da primeira leitura. Uma unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de Mn<sup>+3</sup> por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $4,460 \times 10^3 \text{L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (Kuwahara *et al.*, 1984). A atividade da MnP é expressa em unidade de enzima por litro de caldo enzimático (U.L<sup>-1</sup>).

Para atividade de LiP, a solução enzimática bruta foi determinada a 30°C em uma mistura de reação composta de 0,2 mL de tampão tartarato de sódio (0,4 mol.L<sup>-1</sup>) em pH 3,0 contendo 2,0 mM.L<sup>-1</sup> de álcool veratrílico, 0,2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM.L<sup>-1</sup>) e 0,6 mL da solução enzimática bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico, medido a 310 nm. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar 9,3 x 10<sup>3</sup>L.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (TIEN eKIRK, 1983). A atividade da LiP é expressa em unidade de enzima por litro de caldo enzimático lignocelulotítico (U.L<sup>-1</sup>).

O cálculo das atividades ligninolíticas é determinada pela seguinte Equação 5:

$$\text{Atividade Enzimática (U. L}^{-1}\text{)} = \left( \frac{(\Delta\text{Abs})}{\varepsilon. \text{R. T}} \right) \times 10^6 \quad (5)$$

Em que:

$\Delta\text{Abs}$  = absorbância [ $\text{Abs}_{\text{final}}(\text{T}_{10}) - \text{Abs}_{\text{inicial}}(\text{T}_0)$ ];

$\varepsilon$  = Coeficiente de absorção molar (L.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>);

R = Volume do caldo enzimático (mL);

T = Tempo da reação (min.).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CURVA DE CRESCIMENTO

O estudo do crescimento consistiu em acompanhar o aumento da concentração da biomassa fúngica (g de massa seca/L de meio de cultura) em função do tempo. A Figura 3 apresenta os *pellets* formados neste teste.

**Figura 3: Pellets de *P.chrysosporium* obtidos em cultivo.**

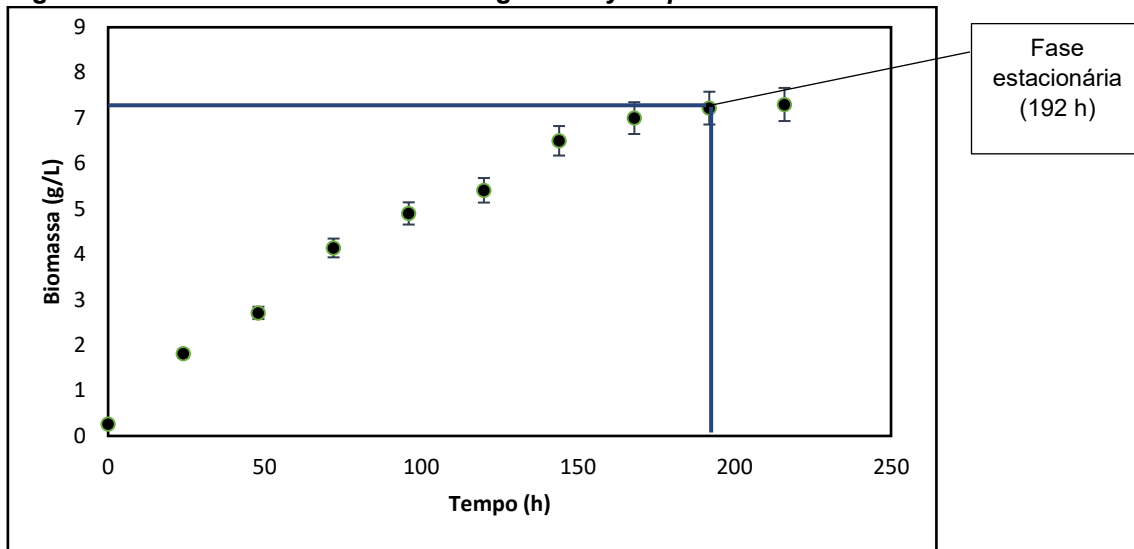


**Fonte: Aatoria Própria**

Na curva de crescimento não fica evidenciada a fase de adaptação celular (fase *lag*), observando-se imediatamente a fase exponencial, onde a velocidade de crescimento aumenta até atingir o seu máximo em 192 horas com uma concentração de biomassa de 7 g.L<sup>-1</sup>, em seguida tem-se a fase de desaceleração. Na Figura 4, encontra-se o gráfico correspondente a curva (com barras de erro de 5%) de crescimento, do fungo *P.chrysosporium*.



**Figura 4: Curva de crescimento do fungo *P.Chrysosporium***



Fonte: Autoria Própria

Baseado na curva de crescimento as análises posteriores que envolviam o fungo foram realizadas no período de 192 horas.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

Os testes preliminares foram úteis para verificar se os parâmetros analisados estavam dentro dos limites da legislação para lançamentos de efluentes diretamente no corpo receptor e também para determinar condições operacionais como a necessidade de suplementação de nutrientes para o melhor crescimento do fungo. Na Tabela 3, encontra-se os resultados para os parâmetros analisados no teste preliminar, todos os testes foram realizados com o efluente têxtil já filtrado.

**Tabela 3: Valores dos parâmetros e limites de lançamento do efluente**

Parâmetros	Resultado	Limite de lançamento
pH	6,22	5 a 9*
DQO	587 mg.L <sup>-1</sup>	200 mg.L <sup>-1***</sup>
Sólidos totais	1160 mg.L <sup>-1</sup>	500 mg.L <sup>-1**</sup>
Sólidos fixos	520 mg.L <sup>-1</sup>	-
Sólidos voláteis	640 mg.L <sup>-1</sup>	-
Nitrogênio total Kjeldahl	42 mg.L <sup>-1</sup>	20mg.L <sup>-1*</sup>
Açúcares totais	241,48 g.L <sup>-1</sup>	-
Cl	81, 59 mg.L <sup>-1</sup>	250 mg.L <sup>-1**</sup>
SO <sub>4</sub>	208,95 mg.L <sup>-1</sup>	250 mg.L <sup>-1**</sup>
F	ND	10,0mg.L <sup>-1**</sup>
NO <sub>3</sub>	ND	10,0 mg.L <sup>-1**</sup>
PO <sub>4</sub>	ND	-
Na	253,1 mg.L <sup>-1</sup>	-
K	7,39 mg.L <sup>-1</sup>	-
Mg	11,09 mg.L <sup>-1</sup>	-
Ca	27mg.L <sup>-1</sup>	-
NH <sub>4</sub>	ND	-

\*RESOLUÇÃO CONAMA Nº 430. \*\* RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357. \*\*\* Parâmetros de Lançamentos de Efluentes Líquidos – IAP- RESOLUÇÃO CEMA 070/09 - ANEXO 7.

**Fonte: Autoria Própria**

Outros autores que realizaram trabalhos utilizando o fungo *P. chrysosporium* e efluente têxtil obtiveram valores iniciais de DQO variando entre 354,00 e 1600 mg.L<sup>-1</sup> e pH 5 e 6,4 (MIRANDA, *et al.* 2013; SEDIGHI *et al.* 2009). Apesar da grande variação nos valores que DQO dos efluentes estudados, ambos estão com os valores acima do permitido pela legislação para lançamento em corpo receptor, assim como o efluente têxtil utilizado neste trabalho. Isso confirma a necessidade de o efluente têxtil passar por um tratamento para remover parcialmente ou totalmente a DQO antes de ser lançado a um corpo receptor.

O alto valor de DQO está relacionado com a quantidade de produtos utilizados no processo de lavagem e descoloração das peças tais como espessantes, detergentes, dispersantes, emulsionadores, surfactantes, ácidos, bases, sais redutores, solventes orgânicos etc. (ANDRADE, 2003).

O pH dos trabalhos desenvolvidos por Miranda, *et al.* 2013 e Sedighi *et al.* 2009, assim como o efluente têxtil utilizado neste estudo estão em conformidade com as diretrizes de lançamento de efluentes líquidos que estabelece que o valor de pH deve estar entre 5 e 9. No entanto o valor de pH está abaixo do necessário para o crescimento do fungo que é de 8,9, sendo assim necessário realizar o ajuste do pH (com HCl e NaOH), para que o fungo *P. chrysosporium* possa crescer no efluente têxtil.

Os valores de limites de lançamento para os parâmetros de Na, K, Mg, Ca, açúcares totais, sólidos fixos e voláteis não estão estabelecidos na legislação brasileira vigente. Estes valores não foram medidos nos trabalhos desenvolvidos por Miranda, *et al.* 2013 e Sedighi *et al.* 2009.

O efluente têxtil utilizado no presente trabalho apresenta baixas quantidades de fonte de carbono (açúcares) e nitrogênio, no entanto tem outros micronutrientes como Na, Mg, Ca e K necessário para o crescimento do fungo *P. chrysosporium*. O que torna bastante interessante o processo proposto no trabalho, pois além de diminuir a quantidade de nutrientes que é necessário ser adicionado no meio para o microrganismo crescer este ainda utiliza os nutrientes presentes no efluente e que seriam descartados.

#### 4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE BIOMASSA EM EFLUENTE INDUSTRIAL

A primeira otimização foi realizada utilizando o pH variando de 3 a 8,  $K_2HPO_4$  de 0,2 a 1,4 g.L<sup>-1</sup> e relação C/N de 5 a 30, com resposta em produção de biomassa (g.L<sup>-1</sup>), como pode ser observado na Tabela 4.

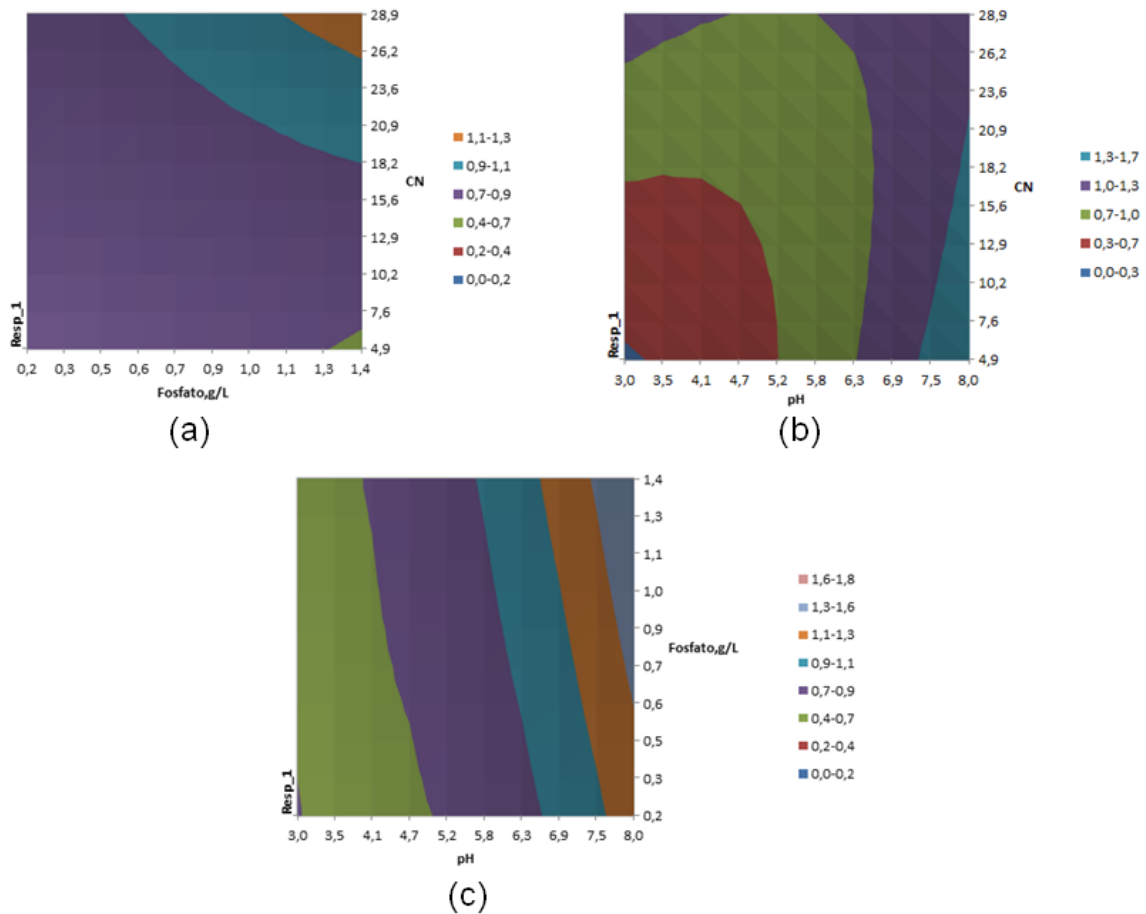
Tabela 4: Otimização

<i>Exp #</i>	<i>pH</i>	<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(g.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Glicose,(g.L<sup>-1</sup>)</i>
1	5,50	1,40	7,60
2	5,50	0,80	7,60
3	8,00	0,80	7,60
4	6,99	1,16	4,39
5	5,50	0,20	7,60
6	4,01	0,44	10,81
7	6,99	0,44	4,39
8	4,01	1,16	4,39
9	4,01	0,44	4,39
10	5,50	0,80	7,60
11	5,50	0,80	13,00
12	5,50	0,80	7,60
13	4,01	1,16	10,81
14	5,50	0,80	2,20
15	6,99	0,44	10,81
16	6,99	1,16	10,81
17	3,00	0,80	7,60

Fonte: Aatoria Própria

Considerando os dados obtidos o pH se mostrou uma variável significativa com p-valor de 0,035, o mesmo não aconteceu com a variável fosfato que se mostrou não significativa. Porém, notou-se que não foi possível obter uma superfície de resposta adequada, ficando as condições que resultaram em maior produção situadas nas extremidades superiores das faixas avaliadas para as variáveis independentes, conforme Figura 5.

Figura 5: Resultado da primeira otimização: (a) fosfato x CN, (b) pH x CN e (c) fosfato x pH.



Fonte: Autoria Própria

Levando em consideração os resultados obtidos na primeira otimização e com finalidade de melhorar a produção de biomassa foi realizada uma nova otimização em que o pH variou de 7 a 13, a relação C/N de 0 a 30 e a concentração de fosfato foi fixada no ponto central uma vez que não se mostrou significativo. Os resultados encontrados estão na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados da segunda otimização

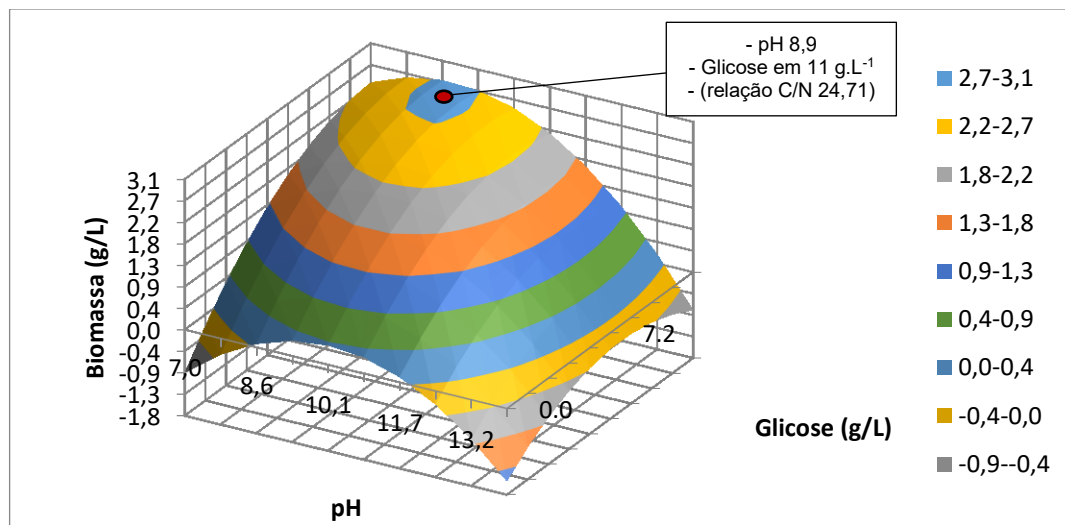
Exp	pH	C/N	Biomassa g/L
1	10,5	14,60	1,8
2	10,5	14,60	2,32
3	14,0	14,60	0
4	10,5	29,21	3,02
5	8,0	4,27	1
6	8,0	24,94	2,24
7	10,5	14,60	2,28
8	7,0	14,60	1,4
9	13,0	24,94	0
10	13,0	4,27	0
11	10,5	0,00	0

Fonte: Autoria Própria

A otimização da produção e biomassa em efluente industrial teve como objetivo identificar indiretamente a melhor condição para produção de enzimas ligninolíticas, já que essas enzimas têm estreita relação com o crescimento de fungos (ANG *et al.* 2011). Enzimas ligninolíticas provavelmente evoluíram para apoiar fungos no crescimento em substratos recalcitrantes de estruturas aleatórias, como substratos lignocelulósicos que não são acessíveis à maioria das bactérias (BONUGLI-SANTOS *et al.* 2012).

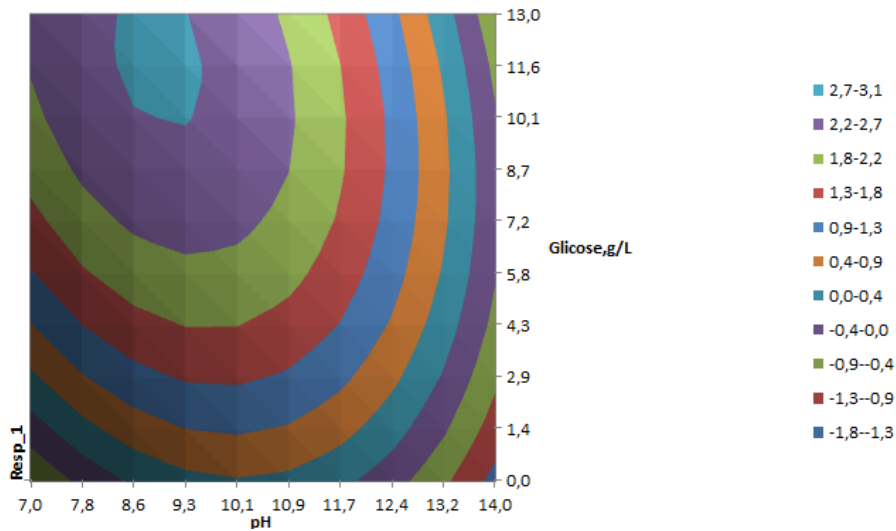
Com os resultados obtidos na Tabela 5, foi possível plotar uma curva de superfície de resposta, apresentada nas Figura 6 e 7.

Figura 6: Curva superfície de resposta



Fonte: Autoria Própria

**Figura 7: Superfície de resposta**



Fonte: Autoria Própria

O modelo de superfície de resposta pode ser explorado para determinar condições ótimas para se trabalhar ou a sensibilidade da variável resposta a mudanças dos níveis dos fatores de interesse.

Através do gráfico de contorno acima (Figura 6), é evidente que, o ponto ótimo de rendimento é obtido quando o pH está em 8,9 e a concentração de Glicose em 11 g.L<sup>-1</sup> o que corresponde em 24,71 em relação C/N.

Zhou *et al.* 2007, estudaram a influência da alimentação com glicose na produção de enzimas ligninolíticas de *Phanerochaete chrysosporium* em um meio limitado em nitrogênio (relação C/N é 56/8,8 mmol/L. Os resultados mostraram que a alimentação com 2 g.L<sup>-1</sup> de glicose no primeiro dia da cultura (24 horas após a inoculação) estimulou o crescimento de biomassa fúngica e a produção de enzimas. A atividade da peroxidase de manganês (MnP) foi 2,5 vezes maior que a produzida em culturas sem alimentação com glicose.

No trabalho desenvolvido por Xu *et al.* 2018, foi investigada a biorremediação do sedimento contaminado com 4-nonilfenol (4NP) e cádmio (Cd) por compostagem com inoculação de *P. chrysosporium*. Sendo que a inoculação de *P. chrysosporium* e proporções C/N adequadas (25,51) aceleraram o processo de compostagem.

No trabalho desenvolvido por Miranda *et al.* 2013, no qual realizou investigações sobre biodegradação de efluentes têxteis em um biorreator, o pH do meio foi ajustado para 7,5. O trabalho utiliza um efluente da indústria têxtil e o pH em que foi realizado o estudo ficou próximo ao encontrado como ótimo neste trabalho, o que reforça que as condições encontradas estão coerentes.

O modelo matemático que se encaixa satisfatoriamente nos resultados é uma quadrática (Tabela 6). A variável pH apresenta um p-valor de 0,02314 mostrando ser uma variável significativa, já a relação C/N pareceu pouco significativa uma vez que o p-valor é 0,08250, sendo que o nível de confiança estipulado foi de 5%.

**Tabela 6:** Equação do modelo quadrático completo que melhor se ajusta aos resultados alcançados na otimização.

$Resp\_1 = b_0 + b_1 * pH * pH + b_2 * Glicose, g/L + b_3 * pH + b_4 * Glicose, g/L * Glicose, g/L + b_5 * pH * Glicose, g/L$							
		P value	StdError	-95%	95%	t Stat	VIF
<b>b0</b>	-12,93	0,04183	4,755	-25,15	-0,705	-2,719	
<b>b1</b>	-0,129	0,02314	0,03992	-0,232	-0,02643	-3,233	103,09
<b>b2</b>	0,673	0,08250	0,311	-0,125	1,472	2,167	48,32
<b>b3</b>	2,623	0,02825	0,859	0,416	4,830	3,056	106,99
<b>b4</b>	-0,01824	0,176	0,01157	-0,04799	0,01151	-1,576	12,43
<b>b5</b>	-0,02724	0,335	0,02553	-0,09288	0,03839	-1,067	40,98

Fonte: Autoria Própria

Também foi obtido o coeficiente de Determinação ( $R^2$ ), este traduz a capacidade explicativa do modelo pesquisado. É uma medida do grau de proximidade entre os valores estimados e observados da variável dependente dentro da amostra utilizada para estimar a regressão, sendo uma medida do sucesso da estimativa. O  $R^2$  encontrado para o nosso modelo foi de 0,870 sendo um coeficiente de determinação  $R^2$  elevado, o que indica um bom ajuste aos dados experimentais.

O teste de Durbin-Watson é utilizado para detectar a presença de autocorrelação entre os resíduos (erros de predição) de um modelo de regressão. O valor encontrado para o teste de Durbin-Watson foi  $d=1,502$ , consultando a tabela DW para o nível de significância de 5%, 2 variáveis independentes e tamanho da amostra  $n = 11$ , temos que ( $d_L:0,658 < d < d_U:1,604$ ) constatando uma autocorrelação inconclusiva. Porém o valor da autocorrelação de primeira ordem foi 0,171 o que indica uma autocorrelação positiva fraca entre os resíduos.

A análise ANOVA apresentada na Tabela 7 mostrou um baixo percentual de resíduos, indicando que as respostas previstas estão próximas das obtidas.



**Tabela 7: Resultado da análise estatística ANOVA**

ANOVA						
<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>SS%</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F Signif</i>	<i>df</i>
<b>Regression</b>	11,26	87	2,252	6,670	0,02881	5
<b>Residual</b>	1,688	13	0,338			5
<b>LOF Error</b>	1,521	12 (90)	0,507	6,0534	0,145	3
<b>PureError</b>	0,167	1 (10)	0,08373			2
<b>Total</b>	12,95	100				10

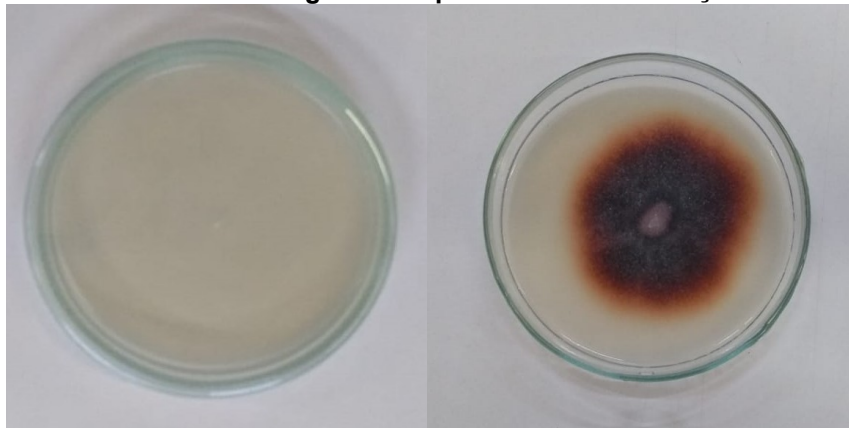
Fonte: Autoria Própria

Em resumo, o teste F confirma que o modelo é válido em um intervalo de confiança de 95% ( $F_{\text{signif}} < \text{intervalo de confiança}$ ). A variável pH se mostrou significativa e a variável relação C/N pouco significativa. As condições ótimas de operação foram de pH 8,9 e relação C/N 24,71. O tempo de permanência do efluente no biorreator é de 8 dias (de acordo com a curva de crescimento).

#### 4.4 PRODUÇÃO DE PEROXIDASES

Após o período de incubação do fungo (nas condições encontradas para o ponto máximo, item 4.3), observou-se a existência do halo de crescimento avermelhado (âmbar) no meio de cultivo (Figura 8b). Essa coloração deve-se a oxidação do guaiacol, presente no meio, em tetraguaiacol. Isso confirma a capacidade de atividade lignolítica do fungo, já que a oxidação do guaiacol ocorre por meio de peroxidase.

**Figura 8: (a) Meio de contendo guaiacol no momento da inoculação (b) Desenvolvimento de halo avermelhado em meio contendo guaiacol após 8 dias de incubação.**



Fonte: Autoria Própria

Desta forma, com as otimizações realizadas e com a confirmação de que o fungo *P. chrysosporium* é capaz de produzir peroxidase nas condições estabelecidas, o efluente suplementado pode ser colocado no biorreator para a produção de enzimas.

Foi analisado também a produção de enzimas peroxidase em um meio sem o ajuste do pH, ou seja, com o pH natural do efluente que era 6,22, conforme Figura 9.

**Figura 9: Meio com guaiacol e sem ajuste de pH após 8 dias de incubação**



Fonte: Aatoria Própria

Como é possível observar não houve o aparecimento do halo avermelhado, característico de produção de enzimas peroxidase, o que reforça que a variável pH é um fator significativo para o crescimento do fungo e conseqüentemente produção de enzimas.

#### 4.5 CULTIVO EM BIORREATOR

O biorreator, Figura 10, foi operado em sistema batelada por um período de 8 dias, sendo que as variáveis pH, temperatura, agitação e pressão foram mantidas constantes, no entanto a variável demanda de oxigênio variou durante o processo de acordo com o desenvolvimento do fungo. Após o período de fermentação o efluente foi quantificado quanto ao valor de DQO, açúcares totais e atividade das enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase.

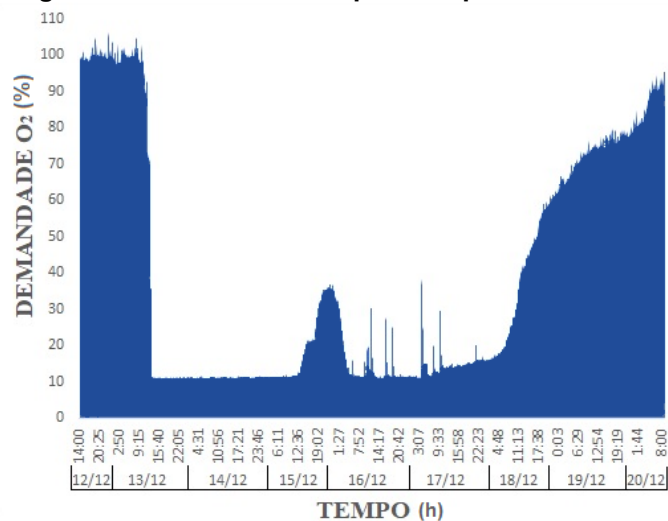
Figura 10: (a) Biorreator utilizado no processo; (b) Biorreator com o efluente suplementado e o fungo *P. chrysosporium*



Fonte: (a) (TECNAL, 2020). (b) Autoria própria.

De acordo com o Figura 11, é possível observar que demanda de oxigênio chega em torno de 10% após 24 horas da inoculação do efluente suplementado com o fungo *P. chrysosporium*, este valor de demanda de oxigênio permanece praticamente constante até aproximadamente 144 horas após a inoculação. A partir das 144 horas até o final do processo a demanda de oxigênio começa a aumentar o que indica um menor consumo de oxigênio pelo fungo e que ele está entrando em sua fase estacionária.

Figura 11: Demanda de O<sub>2</sub> pelo tempo.



Fonte: Autoria Própria

O consumo de oxigênio observado na Figura 11, está de acordo com a curva de crescimento apresentado na Figura 4, pois até aproximadamente 144 horas tem-se a fase exponencial onde a população do fungo está crescendo e consequentemente consumindo oxigênio, após as 144 horas de acordo com a curva de crescimento o fungo começa a desacelerar seu crescimento entrando em uma fase estacionária. O pH durante todo o processo foi mantido constante em seu valor otimizado de 8,9.

A DQO medida no final do processo foi de 2450 mg.L<sup>-1</sup> e o valor de açúcares totais também medida no final do processo foi de 698,74 mg.L<sup>-1</sup>. A fonte de carbono utilizada no estudo foi a glicose, convertendo 698.74 mg.L<sup>-1</sup> de glicose para DQO, tem-se um valor de DQO de 795,50 mg.L<sup>-1</sup>. Portanto parte da DQO restante no efluente é glicose, que não foi consumida na fermentação.

Esse alto valor de DQO pode ser justificado pela necessidade de suplementação do efluente com fonte de carbono e significa que o processo proposto, da forma como está, não evita a necessidade de tratamento do efluente. Porém, a matéria orgânica restante (glicose) pode ser facilmente removida em sistemas de tratamento de efluentes tradicionais.

#### 4.6 PRODUÇÃO DE MANGANÊS PEROXIDASE (MnP) E LIGNINA PEROXIDASE (LiP) POR FERMENTAÇÃO

Após a fermentação foi medida a atividade da enzima manganês peroxidase a qual apresentou 15, 32 U.L<sup>-1</sup> e da enzima lignina peroxidase 70 U. L<sup>-1</sup>. Na Tabela 8, encontra-se os valores obtidos para lignina peroxidase e manganês peroxidase em outros trabalhos.

**Tabela 8: Valores comparativos encontrados em outros estudos**

<b>Autor</b>	<b>Substrato</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>MnP (U.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LiP (U.L<sup>-1</sup>)</b>
Este trabalho	Efluente têxtil/Glicose	<i>P. Chrysosporium</i>	15,32	70
(ZACAN <i>et al.</i> 2015)	Resíduos lignocelulósicos	<i>Pleurotus</i> sp 0,01	18,67	5,67
(COUTO <i>et al.</i> 2001)	Semente de Uva	<i>P. Chrysosporium</i>	-	1620
(SEDIGHI <i>et al.</i> 2009)	Efluente têxtil/Meio nutritivo	<i>P. Chrysosporium</i>	52	17
(MIRANDA <i>et al.</i> 2013)	Efluente têxtil/Meio nutritivo	<i>P. Chrysosporium</i>	392	39

**Fonte: A autoria Própria**

No trabalho desenvolvido por Sedighi *et al.* (2009), as atividades máximas de lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) foram (U.L<sup>-1</sup>): 17 e 52, respectivamente. O trabalho foi desenvolvido em vários cenários. Adicionando Tween 80, os valores de MnP foram significativamente maiores do que os obtidos na cultura de controle (sem Tween 80) e também foram detectadas atividades de LiP baixas. Ao suplementar o meio com VA, as atividades de MnP não mudaram significativamente, porém as atividades de LiP não foram visivelmente mais altas. Os diferentes níveis de manganês não tiveram influência perceptível na atividade de MnP. A formação de LiP foi inibido completamente em todas as concentrações de MnSO<sub>4</sub>. Como o Mn<sup>2+</sup> não aumentou a atividade de MnP, pode resultar que já havia Mn<sup>2+</sup> suficiente para induzir a atividade máxima de MnP.

O presente trabalho não utilizou Tween 80 nem álcool veratrilico, pois estes causariam um custo maior ao processo. No entanto, mesmo sem a adição de indutor de atividade enzimática, o presente trabalho apresentou uma maior produção da enzimas lignina peroxidase, comprovando a hipótese deste trabalho.

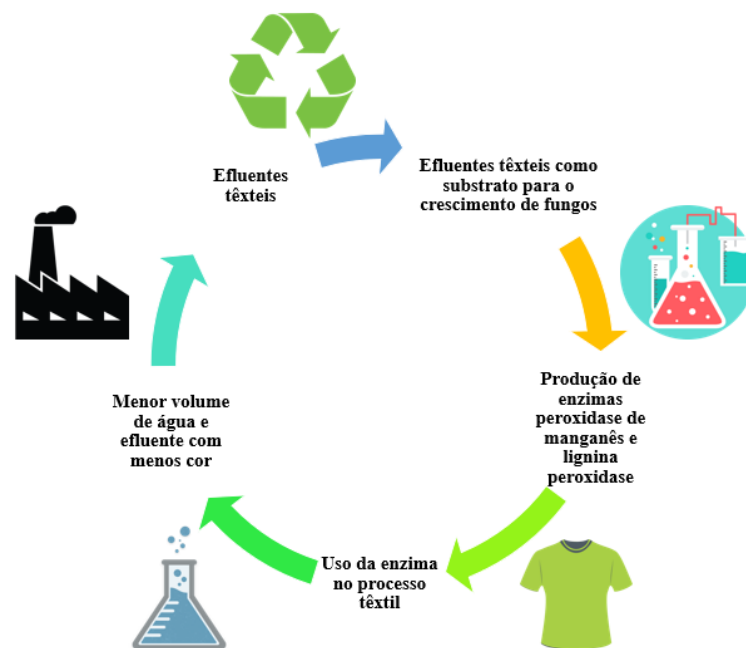
Os resíduos de peróxido de hidrogênio utilizados na etapa de alvejamento em contato com pigmentos sensíveis à oxidação podem sofrer pequenas alterações na tonalidade (quantidades de 15ppm de peróxido residual causam redução na cor). No processo convencional, os resíduos de peróxido de hidrogênio são removidos através de vários enxágues ou da adição de um redutor inorgânico. No entanto, estes causam grande carga de sais nos efluentes. Neste caso, pode-se utilizar as peroxidases para reduzir o peróxido de hidrogênio, os produtos (efluentes) desta reação não causam problemas ecológicos, como a elevada carga de sais, e a quantidade de enzimas

usada é muito menor que a quantidade de agente redutor inorgânico. As peroxidases também podem ser utilizadas após o tingimento, para a redução de corantes residuais. Sendo assim o emprego da peroxidase favorece a queda do consumo de produtos químicos, de energia e de água.

Uma empresa líder no ramo de enzimas destaca em seus produtos que a nova solução de branqueamento a frio é baseada em enzimas conhecidas como peroxidases, e essa inovação é formulada para funcionar sem oxigênio extra do ar ou da água. Essa nova peroxidase tem uma velocidade de reação muito rápida - 90% da reação termina em 10 minutos.

Na Figura 12 encontra-se o esquema de economia circular promovido pelo processo estudado neste trabalho.

**Figura 12: Processo circular resultante do uso de águas residuais têxteis para a produção de peroxidases por *P.chryso sporium*.**



Fonte: Autoria Própria

O fungo *P. Chryso sporium* foi capaz de utilizar o efluente têxtil, não apenas para crescer, mas também para gerar produtos de interesse, ou seja, o efluente têxtil se apresenta como uma matéria-prima vantajosa tanto do ponto de vista ambiental, quanto econômico. O fungo escolhido para a utilização no processo também possui vantagem importantes, como tolerar diferentes tipos de substâncias contaminantes. Com a aplicação de enzimas produzidas a partir do efluente têxtil da própria indústria

têxtil, originando uma economia circular. A economia ocorre porque a enzima pode ser usada na indústria em que foi produzida. Assim, gerando valor para o efluente e economia durante o processo. Podendo evitar etapas dispendiosas do processo, como reduzir as lavagens ou adicionar uma solução inorgânica redutor para remover o peróxido de hidrogênio.

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho é inovador no que se refere a produção de enzimas ligninolíticas (manganês peroxidase e lignina peroxidase) a partir de um efluente da indústria têxtil, com a finalidade de utilizar essas enzimas ligninolíticas na própria indústria têxtil.

A partir das análises estatísticas foi possível observar que a variável pH era significativa e a variável relação C/N pouco significativa, desta forma foi possível otimizar as condições de operação do processo.

O fungo *P. chrysosporium* foi capaz de não apenas tolerar a condições adversas das águas residuais têxteis, mas usá-las como fonte de nutrientes para produção de biomassa. Associado à produção de biomassa, foram produzidas duas enzimas (manganês peroxidase 15,32 U.L<sup>-1</sup> e lignina peroxidase 70 U.L<sup>-1</sup>) com aplicações na indústria têxtil. O uso de águas residuais da indústria têxtil para a produção de peroxidases que podem ser usadas no estágio de branqueamento da produção têxtil resulta em um processo circular onde são gerados benefícios ambientais e econômicos.

Vale ressaltar a necessidade de se realizar novos estudos para o aperfeiçoamento do processo visando aumentar a produção de enzimas manganês peroxidase e lignina peroxidase, a eficiência na remoção dos compostos presentes e verificar a sua toxicidade de antes e após o processo.



## REFERENCIAS

- ABIT. Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (São Paulo). **Perspectivas do Setor Têxtil e de Confecção Desafios e Oportunidades**. 2019. Disponível em: <<http://www.abit.org.br/cont/cartilha-industria-textil>>. Acesso em: 16 jan. 2019.
- ANDRADE, Flavio. **Remoção de cor de efluentes têxteis com tratamento de lodos ativados e um polieletrólito orgânico**. 2003. Tese de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.
- ANG, Teck Nam; NGOH, GekCheng; CHUA, AdelineSeak May. A Quantitative Method for Fungal Ligninolytic Enzyme Screening. **Studies Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, Vol.6(4), pp.589-595, 2011.
- APHA. **American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater**, 19th edition, 1999.
- ARAKAKI, Ricardo L. M. **Estudo do crescimento, atividade enzimática e degradação do Herbicida Diurom pelo Basidiomiceto *Dacryopinaxelegans* SXS323 em meio líquido agitado com baixa atividade de água**. 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado) –Curso de Microbiologia, UNESP, São José do Rio Preto, 2011.
- BEHNOOD, M.; NASERNEJAD, B.; NIKAZAR, M.; Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. Vol. 20, n. 4, pp.1879-1885, 2014.
- BONUGLI-SANTOS, Rafaella; DURRANT, Lucia; SETTE, Lara. The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents. **Water, Air, & Soil Pollution**, Vol.223(5), pp.2333-2345, 2012.
- CARDOSO, G. B. **Avaliação de diferentes tratamentos de efluentes têxteis simulado contendo o azocorante preto de dioresul**. 2010. Dissertação (Mestrado), Curso Engenharia de Processos – Universidade Tiradentes, Sergipe, 2010.
- CUNHA, A. L. *et al.* Degradação de corante azo por *Phanerochaete chrysosporium* em sistema de reatores em bateladas sequenciais operados em série. In: **VII CONNEPI**, Palmas – TO, 2012.

CUNHA, R. **A economia circular e a bioeconomia são a base de uma nova indústria da moda sustentável**. Publicado em 2016. Disponível em <<https://www.stylourbano.com.br/a-economia-circular-e-a-bioeconomia-sao-a-base-de-uma-nova-industria-da-moda-sustentavel/>>. Acesso em: 25 jun. 2020.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for determination of sugars and related compounds. **Analytical Chemistry**, Vol. 28, n.3, p.350-356, 1956.

ELY, C.; Kempka, A. P.; Skoronski, E. Aplicação de Peroxidases no Tratamento de Efluentes. **Rev. Virtual Quim.** Vol XX, 2016.

FARIA, Priscila Esteves de. **Produção industrial sustentável: e se não fosse a biotecnologia?** 2019. Disponível em <<https://profissaobiotec.com.br/producao-industrial-sustentavel-e-se-nao-fose-biotecnologia/>>. Acesso em: 25 jun. 2020. FERRANTE, Elisângela. **Biotecnologia Aplicada à Indústria Têxtil**. 2011.

Disponível em: <<https://textileindustry.ning.com/profiles/blogs/biotecnologia-aplicada-a-6>>. Acesso em: 03 jan. 2019.

FILHO, Marcos A. de M. **Avaliação do potencial biotecnológico de *Phanerochaete chrysosporium* UCP 963 e *Cunninghamella elegans* UCP 596 na remoção de cobre e zinco**. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2005.

FREIRE, Renato S.; PELEGRINI, Ronaldo; KUBOTA, Lauro T.; DURÁN, Nelson. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, Vol. 23, n. 4, p.504-511, 2000.

GUO, Xia-Li; ZHU, Zheng-Wei; LI, Hong-Li. Biodegradation of sulfamethoxazole by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Molecular Liquids**, Vol.198, pp.169-172, October 2014.

MASARIN, Fernando *et al.* **Polpação quimiomecânica de *Eucalyptus grandis* biotratado por *Phanerochaete chrysosporium***. 2018. Disponível em <[http://www.eucalyptus.com.br/icep03/05\\_Masarin\\_Vincentim\\_Ferraz.pdf](http://www.eucalyptus.com.br/icep03/05_Masarin_Vincentim_Ferraz.pdf)>. Acesso em: 10 dez.2018.

MIRANDA, Rita de Cássia M. de; GOMES, Edelvio de Barros; PEREIRA, Nei; MARIN-MORALES, Maria Aparecida; MACHADO, Katia Maria Gomes; GUSMÃO, Norma Buarque de. Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181. **Bioresource Technology**, Vol.142, pp.361-367, August 2013.

MONTEIRO, Lilian. Bioinovação na indústria têxtil resulta em redução de custos. **Correio Braziliense**. 2010. Disponível em <[https://www.correio braziliense.com.br/app/noticia/ciencia-e-saude/2010/09/15/interna\\_ciencia\\_saude,213050/bioinovacao-na-industria-textil-resulta-em-reducao-de-custos.shtml](https://www.correio braziliense.com.br/app/noticia/ciencia-e-saude/2010/09/15/interna_ciencia_saude,213050/bioinovacao-na-industria-textil-resulta-em-reducao-de-custos.shtml)>. Acesso em: 03 fev. 2019.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, New York, Vol. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**. Vol.35, p.109-116, 2002.

HUANG, Dan-Lian. *et al.* Mycelial growth and solid-state fermentation of lignocellulosic waste by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* under lead stress. **Chemosphere**. Vol. 81, p. 1091-1097, 2010.

JGI Genoma Portal. Disponível em <[genome.jgi.doe.gov/Phchr1/Phchr1.home.html](http://genome.jgi.doe.gov/Phchr1/Phchr1.home.html)>. Acesso em: jan. de 2019.

KAPDAN K.I.*et al.* Biological decolorization of textile dyestuff by *Coriolus versicolor* in a packed column reactor. **Environmental Technology**, Vol.21, p. 231-236, 2000.

KAMIDA, Hélio M.; DURRANT, Lucia R.; MONTEIRO, Regina T. R.; ARMAS, Eduardo D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, São Paulo, Vol. 28, n. 4, p. 629-632, jul./ago. 2005.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Microbiology Letters**, Vol. 169, p. 247-250, 1984.

PIRES, Josiane F. **Avaliação do potencial enzimático de fungos endofíticos de *Coffea arabica* (café), sob cultivo orgânico e convencional, na remediação de efluentes têxteis**. 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2013.

QUEIROZ, Marluce T. A. *et al.* Gestão de resíduos na indústria têxtil e sua relação com a qualidade da água: Estudo de caso. **Iberoamerican Journal of Industrial Engineering**, Florianópolis, SC, Brasil, Vol. 8, n. 15, p. 114-135, 2016.

RESENDE, Rodrigo R.; SOCCOL, Carlos R.; FRANÇA, Luiz R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria**. 1 ed. Vol 4. p. 1069, 2017.

RODRIGUES, K.; LIMA, K. M.; SILVA, G. M.; SILVA, G.; CUNHA, P. PESSOA, R. Remoção de corante por uso de *Aspergillus niger* AN400 em reator em bateladas sequenciais. **Química Nova**, Vol.34, n.7, 2011.

SANTOS, Andreza D. O. **Biorremediação de efluente têxtil por *Phanerochaete chrysosporium* imobilizado em reator operado em semibateladas e em bateladas sequenciais**. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Tecnologia e Gestão Ambiental, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Fortaleza, 2017.

SEDIGHI, M; KARIMI, A; VAHABZADEH, F. (Involvement of ligninolytic enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* in treating the textile effluent containing Astrazon Red FBL in a packed-bed bioreactor). **Journal of Hazardous Materials**, Vol.169(1), pp.88-93, 2009.

SHARARI, M.; ROOHANI, M.; JAHAN, Latibari, A.; GUILLET, A.;AUROUSSEAU, M.; SHARARI, A. Treatment of bagasse preparation effluent by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam: Enzyme production versus pollution removal. **Industrial crops and products**, Vol.46, pp.226-233, 2013.

SHIMPI, Navinchandra; BORANE, Mahesh; MISHRA, Satyendra; KADAM, Meghraj; SONAWANE, S. S. Biodegradation of Isotactic Polypropylene (iPP)/Poly(lactic acid) (PLA) and iPP/PLA/Nano Calcium Carbonates Using *Phanerochaete chrysosporium*. **Advances in Polymer Technology**, Vol.37(2), pp.522-530, March 2018.

SOUZA, Gleison de. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação de compostos poluentes**. 2012. 112f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, 2012.

TECNAL. Biorreator compacto. Disponível em: <[https://tecnal.com.br/pt-BR/produtos/detalhes/11964\\_biorreator](https://tecnal.com.br/pt-BR/produtos/detalhes/11964_biorreator)>. Acesso em: 11 fev. 2020.

THECONSCIOUSCHALLENGE. WATER & CLOTHING. 2019. Disponível em: <https://www.theconsciouschallenge.org/ecologicalfootprintbibleoverview/water-clothing>. Acesso em: 04 outubro 2020.

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Science.**, Vol. 221, p. 661-663, 1983.

XU, Piao; LAI, Cui; ZENG, Guangming; HUANG, Danlian; CHEN, Ming; SONG, Biao; PENG, Xin; WAN, Jia; HU, Liang; DUAN, Abing; TANG, Wangwang Enhanced bioremediation of 4-nonylphenol and cadmium co-contaminated sediment by composting with *Phanerochaete chrysosporium* inocula. **Bioresource Technology**, Vol.250, pp.625-634, 2018.

ZERAIK, Ana E.; SOUZA, Fernanda S. de; FILHO, Orlando F.; LEITE, Oldair D. Development of a spot test for peroxidase activity monitoring during a purification procedure. **Química Nova**, Vol.31 n.4 São Paulo, 2008.

ZHANG, Ting; CAI, Ling; XU, Bentuo; LI, Xicheng; QIU, Wenhui; FU, Caixia; ZHENG, Chunmiao. Sulfadiazine biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*: Mechanism and degradation product identification. **Chemosphere**, Vol.237, December 2019.

ZHENG, Guanyu; SELVAM, Ammaiappan; WONG, Jonathan W.C. Oil-in-water microemulsions enhance the biodegradation of DDT by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, Vol.126, pp.397-403, December 2012.

ZHOU, Xiaoyan; WEN, Xianghua; FENG, Yan. Influence of glucose feeding on the ligninolytic enzyme production of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Front. Environ. Sci. Eng. China** 1, 89–94 (2007).

YU, Guoce; WEN, Xianghua; QIAN, Yi. Production of the ligninolytic enzymes by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in an air atmosphere World **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Vol.21(3), pp.323-327, 2005.

**ANEXO A - Depósito na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico**

## **Depósito na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico**

Foi realizado o depósito da linhagem em estudo na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico da UTFPR-PG. A Identificação molecular da linhagem em estudo foi realizado pelos membros da CMIB.

## **Identificação molecular**

### **Extração DNA**

O DNA genômico total do fungo foi extraído, utilizando o protocolo de extração de DNA descrito por Vicente et al. (2008). Para a extração realizou-se a etapa de extração de DNA cultivando-se a linhagem em Ágar Sabouraud Dextrose e incubada a 28°C por 7 dias. Após esse período aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> da cultura foi transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 300 µL de CTAB 2% e 80mg de uma mistura de sílica em pó (sílica gel/celite 2:1). O material foi incubado em freezer -20°C por 10min e posteriormente foi triturado manualmente por aproximadamente 5 minutos utilizando pistilos de plásticos esterilizados. Em seguida, 200 µL de tampão CTAB foram adicionados e a mistura obtida foi incubada em banho seco a 65°C por 10 min. Após período de incubação, adicionou-se 500µL de CIA (24:1). Posteriormente, procedeu-se centrifugação por 7 min a 20.500 g, e o sobrenadante foi coletado em novos tubos de 1,5mL. Em seguida, 800µL de etanol a 96% gelado foi acrescentado para a precipitação do DNA. Após a precipitação, o DNA extraído foi lavado com álcool 70% gelado, posteriormente foi seco à temperatura ambiente e na sequência adicionado 100 µL de água. A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio.

### **Amplificação DNA e Sequenciamento**

As reações de PCR e de sequenciamento foram realizadas usando os iniciadores universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3'), visando obter a amplificação da região ITS.

As reações de amplificação (PCR) foram preparadas num volume de 25 µL contendo 14 µL de água ultrapura, 2,5 µL de tampão de PCR 10X, 1,3 µL de MgCl<sub>2</sub>,

2,5 µL de dNTPs, 1,2 µL de cada um dos iniciadores (10 pmol), 0,3 µL de DNA polimerase (1U/mL) e 2 µL do DNA extraído

As condições de amplificação foram: 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial, 94°C por 45 segundos para a desnaturação, 52°C por 45 segundos para o anelamento, 72°C por 2 minutos para a extensão e 72°C por 7 minutos para a extensão final. A reação foi realizada em 35 ciclos.

Os produtos de amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,4%, corado com brometo de etídio.

Os produtos de amplificação obtidos foram então purificados com PEG8000 (polietilenoglicol). O produto de PCR purificado foi enviado para sequenciamento pela empresa ACTGene (<https://actgene.com.br/>), o qual foi preparado de acordo o solicitado pela empresa.

### **Análise das sequencias**

As sequências obtidas foram ajustadas usando o pacote Staden (Staden, Judge e Bonfield, 2001), para posteriormente serem comparadas com o banco de dados NCBI usando o BLAST - Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### **RESULTADO**

A linhagem de fungo em estudo foi identificada com base no sequenciamento da região ITS do rDNA, posteriormente procedeu-se uma análise comparativa da sequência obtida com a base de dados do National Center for Biotechnology Information - NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por meio da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) com sequências de referência.

A análise dos dados da sequência obtida indicou que a linhagem em estudo pertencia a espécie *Phanerochaete chrysosporium*, tendo 99% de similaridade com a sequência LT963542.1 depositada no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT963542.1>).



## REFERENCIA

VICENTE, V. A.; et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Studies In Mycology*, [s.l.], v. 61, p.137-144, 2008. Elsevier BV.

>Consensus

```
ACTGCGGAGATCATTACCGAGTGCGGGCTCGCCTTCTTGCGCGGCCCAACCTC
CCACCCGTGACTATTCGTACCTCACGTTGCTTCGGCGCGGCCGCGCCGTGCCCGC
CGGAGACCCCCTCCTGAACGCTGTTCTAGAAAGGGAATTGCAGTCTGAGTCGAT
TGATGCAAATCGGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTC
CGAGCGTCATTACTGCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGTTGGAC
```